



**HAL**  
open science

# Amibes libres de l'environnement : résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les Chlamydiales

Céline Coulon

► **To cite this version:**

Céline Coulon. Amibes libres de l'environnement : résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les Chlamydiales. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114806 . tel-00665238

**HAL Id: tel-00665238**

**<https://theses.hal.science/tel-00665238>**

Submitted on 1 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : MICROBIOLOGIE / THERAPEUTIQUES ANTIINFECTIEUSES

DISCIPLINE : MICROBIOLOGIE

ANNÉE 2010 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1104

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 08/04/2011

par

Céline COULON

Amibes libres de l'environnement : Résistance aux  
traitements de désinfection et interactions avec les  
*Chlamydiales*

**Directeur de thèse :** Pr Anne COLLIGNON, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry

**Co-directeur de thèse :** Dr Vincent THOMAS, STERIS SA, Fontenay-aux-Roses

**Composition du jury :**

*Président du jury :* Pr Yann HÉCHARD, Université de Poitiers

*Rapporteurs :* Pr Yann HÉCHARD, Université de Poitiers

Pr Philippe HARTEMANN, Faculté de Médecine de Nancy

*Membre invité :* Dr Jean-François LORET, SUEZ Environnement, Le Pecq



# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Anne Collignon et Vincent Thomas qui m'ont permis de réaliser cette thèse et l'ont encadrée.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une Convention CIFRE, en partenariat entre le laboratoire de microbiologie de STERIS SA, dirigé par Vincent Thomas et le laboratoire Ecosystème Microbien Digestif et Santé, sous la responsabilité d'Anne Collignon.

Je souhaite aussi remercier Gerald McDonnell pour m'avoir également permis de réaliser ce travail.

Je remercie particulièrement Yann Héchard et Philippe Hartemann qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également Jean-François Loret pour sa participation au jury de thèse.

Je n'oublie pas mes collègues du quotidien Guillaume Fichet pour son accueil notamment et surtout Mickael Eterpi pour son aide et son soutien durant ces 3 années.

Je remercie également toutes les personnes du bâtiment qui ont participé à ma thèse qui m'ont notamment formée aux différentes procédures, matériels...ainsi que toutes celles qui ont participé à l'intendance...

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire : Nathalie Deschamps, Jan Bayer et Annette Schmitz pour leur collaboration en cytométrie; l'équipe du laboratoire de la faculté de pharmacie pour leur aide lors de mes manipulations dans leurs locaux, et les différents intervenants avec qui j'ai travaillé, notamment en microscopie.

Enfin, je remercie tout particulièrement mes parents pour leur soutien durant toutes mes années d'études. Merci également à Julien qui était là dans les bons comme dans les mauvais jours. En cette fin de thèse, j'ai également une pensée pour mon arrière-grand-mère qui, je pense aurait été heureuse de voir cela.

# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>1</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Chapitre I : Introduction .....</b>	<b>10</b>
<b>I/ Les <i>Acanthamoebae</i>.....</b>	<b>12</b>
1/ Biologie des <i>Acanthamoebae</i> .....	12
2/ Ecologie des <i>Acanthamoebae</i> .....	14
3/ Phylogénie et classification.....	15
4/ Cycle réplicatif et enkystement.....	18
4.1 Cycle réplicatif .....	18
4.2 Enkystement .....	19
4.3 Désenkystement .....	24
4.4 Les facteurs induisant l'enkystement .....	25
5/ Nutrition des amibes .....	25
6/ Pathologies humaines.....	27
6.1 La kératite amibienne.....	27
6.2 L'encéphalite granulomateuse amibienne (GAE).....	30
6.3 L'amibiase cutanée.....	32
6.4 Les autres pathologies liées aux <i>Acanthamoebae</i> .....	32
<b>II/ La désinfection des <i>Acanthamoebae</i> .....</b>	<b>34</b>
1/ Les biocides chimiques .....	34
1.1 Les biocides cationiques .....	34
1.2 Les composés halogénés .....	35
1.3 Les agents oxydants .....	36
1.4 Les aldéhydes .....	38
1.5 Les alcools.....	38
2/ Les biocides physiques .....	38
2.1 Les hautes températures .....	38
2.2 Les ultraviolets (UV).....	39
2.3 Les radiations gamma .....	39
2.4 Les autres traitements.....	39
<b>III/ Interactions avec les autres micro-organismes .....</b>	<b>41</b>
1/ Les virus.....	41
1.1 Les Mimiviridae .....	41
1.2 Les Marseilleviridae.....	42
1.3 Coxsackievirus .....	42

1.4	Adénovirus .....	43
1.5	Les autres virus .....	43
2/	Les levures .....	43
3/	Les protozoaires .....	43
4/	Les bactéries.....	44
<b>IV/</b>	<b>Les <i>Chlamydiales</i> .....</b>	<b>54</b>
1/	Description des <i>Chlamydiales</i> .....	54
2/	Phylogénie et classification des <i>Chlamydiales</i> .....	55
3/	Les familles de <i>Chlamydiales</i> .....	60
3.1	Les <i>Chlamydiaceae</i> .....	60
3.2	Les <i>Parachlamydiaceae</i> .....	62
3.3	Les <i>Criblamydiaceae</i> .....	65
3.4	Les <i>Waddliaceae</i> .....	65
3.5	Les <i>Simkaniaceae</i> .....	67
3.6	Les <i>Rhabdochlamydiaceae</i> .....	69
4/	Diagnostic des <i>Chlamydia-like</i> .....	69
5/	Traitement des infections à <i>Chlamydia-like</i> .....	70
6/	Interactions avec les amibes.....	72
<b>Chapitre II:</b>	<b>Problématique et objectifs de la thèse.....</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre III :</b>	<b>La résistance aux biocides des <i>Acanthamoebae</i> .....</b>	<b>86</b>
1 <sup>ère</sup>	Publication .....	87
2 <sup>e</sup>	Publication .....	100
	Travaux complémentaires .....	119
<b>Chapitre IV :</b>	<b>L'étude des <i>Chlamydia-like</i>.....</b>	<b>122</b>
3 <sup>e</sup>	Publication:.....	123
<b>Chapitre V :</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>150</b>
<b>Communications</b>	<b>.....</b>	<b>157</b>
<b>Annexes</b>	<b>.....</b>	<b>158</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>.....</b>	<b>175</b>

# Liste des figures

Figure 1: Schéma de la structure d'une amibe.....	12
Figure 2: Mouvement amiboïde .....	13
Figure 3: Acanthopodes d'un trophozoïte d' <i>Acanthamoeba</i> en microscopie à balayage .....	14
Figure 4: Classification des <i>Acanthamoebae</i> basée sur des données génétiques.....	15
Figure 5: Kystes d' <i>Acanthamoebae</i> représentant les différents groupes morphologiques I (a), II (b) et III (c).....	16
Figure 6: Arbre phylogénétique du genre <i>Acanthamoeba</i> basé sur une région de 1450 pb de l'ADNr 18S.....	17
Figure 7: Cycle réplcatif des amibes.....	18
Figure 8: A/ Trophozoïte d' <i>Acanthamoeba</i> sous microscope à contraste de phase. B/ Kyste d' <i>Acanthamoeba</i> en MET .....	19
Figure 9: Coupe transversale d'une amibe en cours d'enkystement après 15h en tampon d'enkystement .....	21
Figure 10: Amibe enkystée après 46h en tampon d'enkystement .....	22
Figure 11: Les différentes étapes du déenkystement d' <i>A. culbertsoni</i> .....	24
Figure 12: Microscopie à balayage montrant la "bouche" d'un phagosome .....	26
Figure 13: Cycle de vie des <i>Acanthamoebae</i> .....	27
Figure 14: Anatomie de l'œil.....	28
Figure 15: Kératite amibienne.....	28
Figure 16: Section d'hémisphères cérébraux avec des nécroses corticales et sub-corticales. Cas fatal de GAE.....	30
Figure 17: Schéma de structure du Mimivirus.....	41
Figure 18: Cycle de développement des <i>Chlamydiae</i> .....	54
Figure 19: Arbre phylogénétique des <i>Chlamydiaceae</i> basé sur l'alignement des séquences d'ADN ribosomal 16S.....	59
Figure 20: Comparaison de l'efficacité des biocides selon la méthode de production des kystes. Résultats en Log-10 de réduction .....	120

# Liste des tableaux

Tableau I: Classification des <i>Acanthamoebae</i> .....	16
Tableau II: Réactivité des enveloppes de surface des kystes et pseudokystes d' <i>Acanthamoeba</i> spp. à différentes lectines .....	23
Tableau III: Sensibilité des <i>Acanthamoebae</i> spp. aux biocides .....	40
Tableau IV: Interactions des bactéries pathogènes avec les amibes libres (espèces bactériennes recensées dans la liste des micro-organismes pathogènes publiée par l'Agence de Protection de l'Environnement,.....)	47
Tableau V: Interactions de bactéries potentiellement pathogènes avec les amibes (espèces bactériennes non recensées dans la liste des micro-organismes pathogènes publiée par l'Agence de Protection de l'Environnement).....)	52
Tableau VI: Liste des <i>Chlamydiaceae</i> et les infections associées .....	61
Tableau VII: Activité des antibiotiques sur les différentes <i>Chlamydiaceae</i> .....	71
Tableau VIII: Liste des endosymbiontes isolés dans des amibes .....	72
Tableau IX: Spectre d'hôte des <i>Chlamydia</i> -like.....	74
Tableau X : Récapitulatif de la désinfection des amibes .....	163



# Liste des abréviations

°C	degré Celsius
µm	micromètre
Å	ångström
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomal
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ATP	Adénosine triphosphate
CD4	cluster de différenciation 4
CHG	chlorexhydine
CSI	cellulose synthétase I
CSII	cellulose synthétase II
DMSO	diméthylsulfoxyde
EB	elementary body ou corps élémentaire
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FLA	free-living amoeba
GAE	granulomatous amoebic encephalitis
h	heure
IL6	interleukine 6
kGy	kilo gray
LPS	lipopolysaccharide
MEB	microscopie électronique à balayage
MET	microscopie électronique à transmission
mg/L	milligramme/litre
mg/mL	milligramme/millilitre
mJ cm <sup>-2</sup>	milli joules/centimètre carré
mJ s <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	milli joules/seconde/centimètre carré
mOsmol	milliosmole
Mpb	mega paire de bases
nm	nanomètre
OmpA	Outer membrane protein A
OPA	orthophtalaldéhyde
PAA	acide peracétique
pb	paire de bases
PCR	Polymerase chained reaction
PHMB	Polyhexaméthylène biguanide
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
Ppm	partie par million
PYG	Peptone Yeast extract Glucose
RB	reticulate body ou corps réticulé
siRNA	silencing RNA

SubSP	subilisin-like serine proteinase
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
UV	ultra-violet
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

# Chapitre I : Introduction

Le terme « amibe » (du grec amoibê qui signifie « transformation ») regroupe un grand nombre de protistes étudiés depuis leur découverte avec les débuts du microscope. Les amibes sont des êtres vivants unicellulaires eucaryotes anciennement classés dans le grand groupe des protozoaires et ayant pour points communs : une forme amiboïde et un mouvement « rampant ».

Les amibes sont caractérisées par un corps cellulaire déformable émettant des prolongements de forme changeante, les pseudopodes, qui leur permettent de ramper sur un support ou de capturer des proies microscopiques par phagocytose.

Ce sont pour la plupart des espèces libres vivant des les eaux, les sols humides, mais certaines peuvent être à l'origine de pathologies diverses.

On distingue deux catégories d'amibes en fonction de leur habitat :

- les amibes parasites survivent dans l'environnement mais s'y développent généralement peu. Elles vivent et se développent essentiellement dans le tube digestif de diverses espèces animales (y compris l'homme), dans les pays tropicaux et tempérés (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*). Chez l'homme, la prévalence de ces protozoaires varie considérablement dans les différents groupes de population et est généralement étroitement liée aux conditions socio-économiques. Les taux les plus élevés sont retrouvés dans des endroits dépourvus d'installations sanitaires comme les égouts et l'eau potable. Il arrive que certaines amibes parasites ne déclenchent pas de syndrome pathologique chez l'hôte ; on parlera alors préférentiellement de commensalisme.

- les amibes libres ou telluriques sont totalement indépendantes de l'homme et des autres espèces animales et donc capables de mener une existence autonome dans le milieu naturel (aquatique et sol humide). Certains genres sont capables d'amphizoïdie, c'est-à-dire qu'ils sont tantôt libres dans le milieu extérieur, tantôt parasites chez l'animal ou l'homme en y induisant une pathologie le plus souvent grave (cérébrale, oculaire, cutanée, auditive, sinusienne...). Dans ce cas, elles ne sont jamais pathogènes par ingestion, mais par effraction, inhalation...

## I/ Les *Acanthamoebae*

Les *Acanthamoebae* sont des amibes très largement répandues dans l'environnement. Ces micro-organismes se présentent sous deux formes : le trophozoïte qui est métaboliquement actif et le kyste qui est la forme dormante. Au fil du temps, le rôle pathogène des *Acanthamoebae* vis-à-vis de l'homme a été démontré et a pris de l'importance.

### 1/ Biologie des *Acanthamoebae*

La découverte des *Acanthamoebae* remonte à 1930, il s'agissait alors d'un contaminant de culture fongique de *Cryptococcus pararoseus* [1]. Le potentiel pathogénique de ces amibes a été mis en évidence pour la première fois sur des cellules rénales de singe et sur des animaux de laboratoire [2]. Dans les années 1970, elles sont décrites comme des agents responsables d'encéphalite granulomateuse [3], puis de kératite [4].

Les *Acanthamoebae* sont des organismes eucaryotes et sont donc organisées en structures complexes (Figure 1).

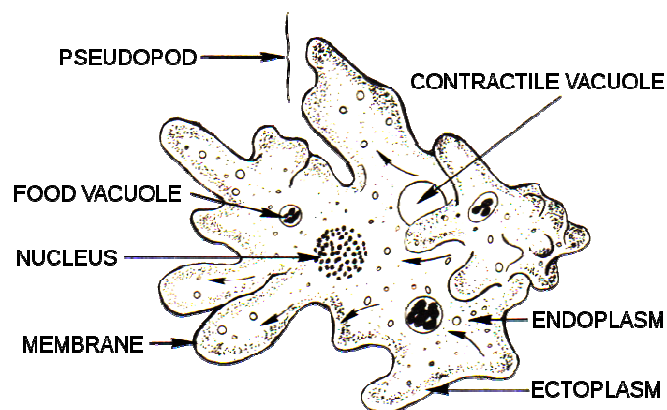


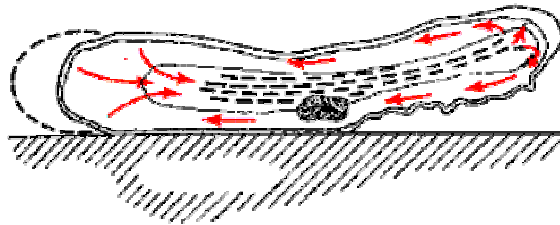
Figure 1: Schéma de la structure d'une amibe

[http://image.wistatutor.com/content/feed/u1330/Amoeba\\_new.png](http://image.wistatutor.com/content/feed/u1330/Amoeba_new.png)

Les principales structures des amibes sont les suivantes [5]:

-les pseudopodes: pour la locomotion. Le mouvement caractéristique produit par les pseudopodes est appelé mouvement amiboïde. Il est rendu possible par la présence de deux types de cytoplasme: l'ectoplasme qui a la texture d'un gel, et l'endoplasme granulaire qui est plus fluide. L'ectoplasme, retrouvé en périphérie, agit un peu à la manière d'un boyau d'où jaillit l'endoplasme vers l'extrémité du pseudopode naissant. Rendu à la périphérie, l'endoplasme change d'état et se transforme en gel. L'ectoplasme dans la partie arrière de l'amibe reprend l'état fluide et se transforme en endoplasme pour alimenter le mouvement (Figure 2).

[http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/notes/Les\\_Protozoaires.htm](http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/notes/Les_Protozoaires.htm)

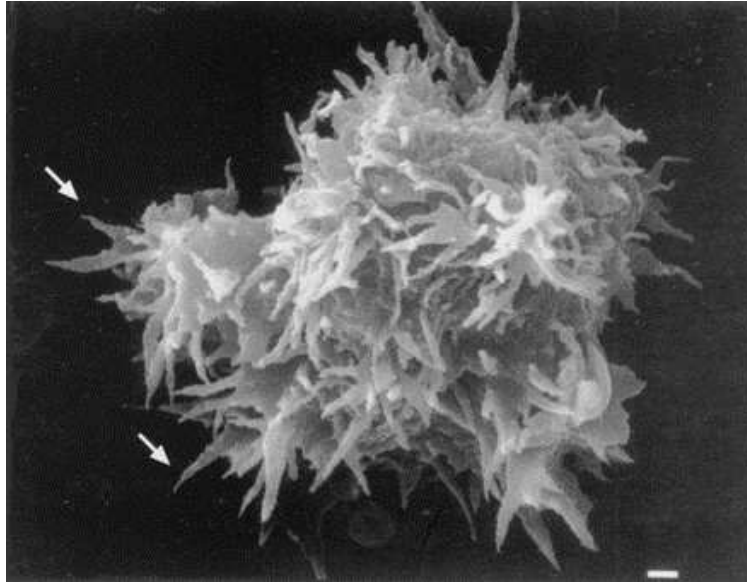


**Figure 2: Mouvement amiboïde**

[http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/notes/Les\\_Protozoaires.htm](http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/notes/Les_Protozoaires.htm)

- l'ectoplasme: couche superficielle vitrée
- l'endoplasme: partie centrale de l'amibe
- la membrane cellulaire: délimite l'amibe
- la vacuole contractile: vacuole interne capable de se contracter et d'expulser l'excès d'eau hors de l'amibe. Cette vacuole est impliquée dans la régulation osmotique.
- la vacuole alimentaire: vacuole responsable de la digestion
- le noyau: organe central de l'amibe contenant le matériel génétique et régulant l'expression des différents gènes ainsi que les activités de la cellule.

Les *Acanthamoebae* sont des amibes rondes ou ovales d'un diamètre de 13.5 à 22.5µm [1]. Les trophozoïtes présentent des pseudopodes (Figure 3) et la forme enkystée, une double paroi [1].



**Figure 3: Acanthopodes d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba* en microscopie à balayage [6]**

## **2/ Ecologie des *Acanthamoebae***

Les *Acanthamoebae* sont naturellement présentes dans des environnements divers : mer, sédiments océaniques [7], plages, eaux stagnantes, rivières [8, 9], lacs [10, 11] mais aussi la poussière [12] et la terre [13] ou encore dans l'air [14-18]. Leur présence en Antarctique a même été démontrée [19] ainsi que dans le désert [20, 21]. Il s'agit véritablement de protozoaires ubiquitaires.

Les *Acanthamoebae* ont aussi été retrouvées dans des environnements créés par l'homme [22-25] tels que les usines de production d'eau potable, les réseaux de distribution d'eau potable, les tours aéro-réfrigérantes [26, 27], les climatiseurs, les piscines [28, 29], les bouteilles d'eau minérale [30], l'eau distillée, mais aussi sur des légumes [31], des instruments chirurgicaux, des unités de soins dentaires [32] ou encore des lentilles de contact [33, 34].

Ces amibes sont régulièrement mises en évidence dans les hôpitaux [12, 35-37]. Leur présence a même été documentée par le passé au niveau d'unités de dialyse [38], dans les stations de lavage des yeux.[39], ...

### 3/ Phylogénie et classification

Au fil du temps, la classification des amibes a beaucoup évolué. Elle était dans un premier temps basée sur des critères morphologiques tels que l'apparence des kystes et la locomotion. Puis l'essor de la biologie moléculaire a permis d'établir une classification plus précise basée sur l'étude de différents gènes (Figure 4).

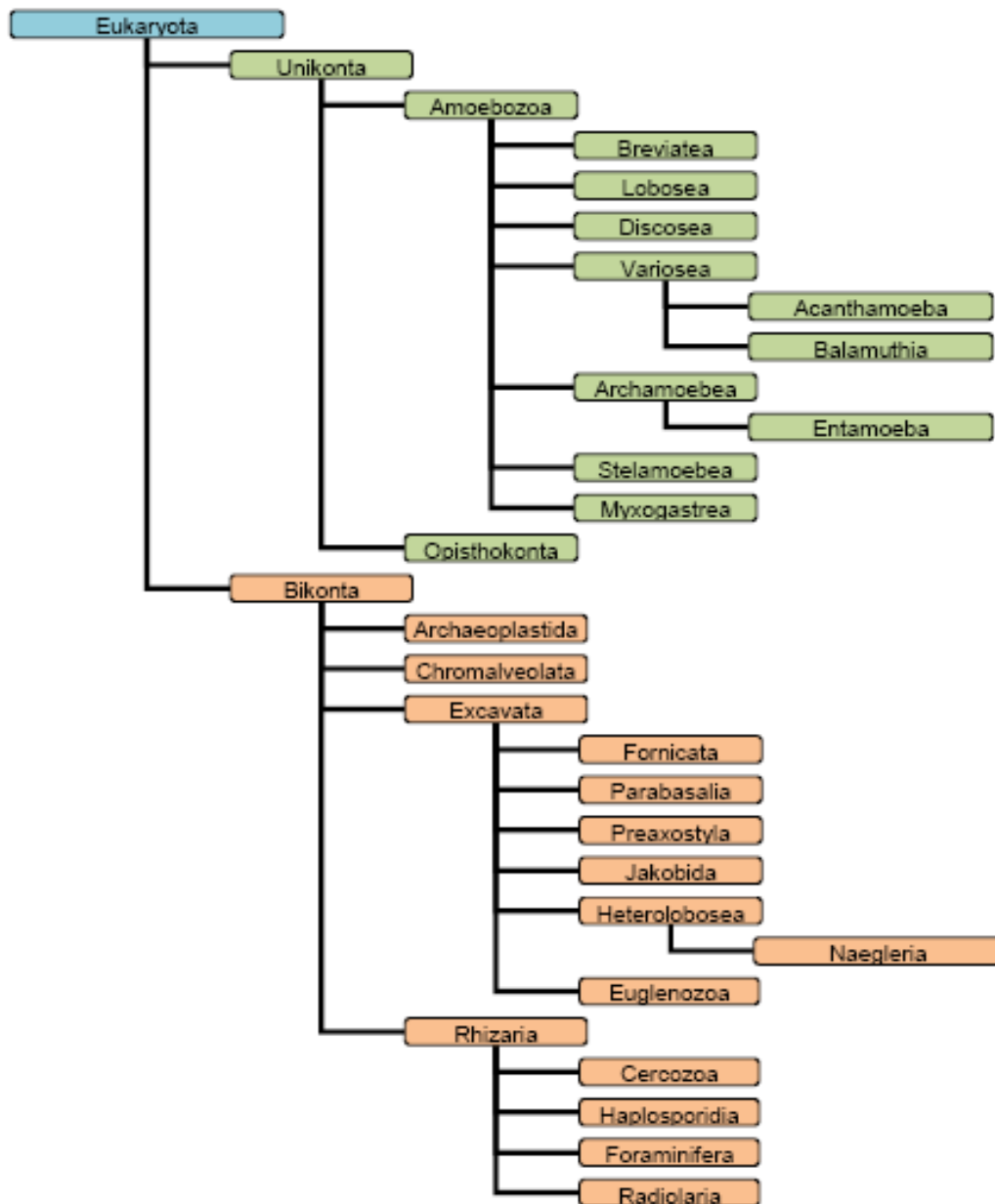


Figure 4: Classification des *Acanthamoebae* basée sur des données génétiques

[40]

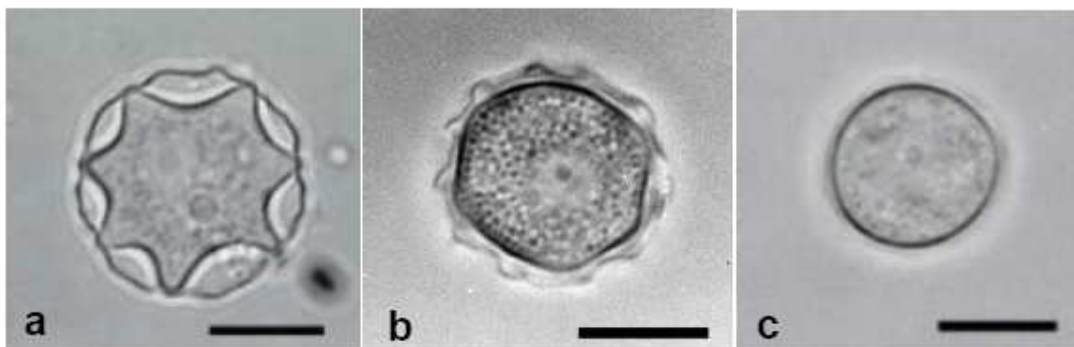


Le genre *Acanthamoeba* appartient à la classe des *Variosea* elle-même incluse dans le phylum des *Amoebozoa*.

En 1977, le genre *Acanthamoebae* a été divisé en 18 espèces différentes, incluant 8 nouvelles espèces et subdivisant le genre en 3 groupes en fonction de la morphologie et la taille des kystes [41]. Cependant, une classification basée sur la morphologie des kystes ne peut pas être fiable, en effet, la morphologie des kystes change en fonction des conditions de culture [42, 43](Tableau I) (Figure 5).

**Tableau I: Classification des *Acanthamoebae***  
[6, 44, 45]

Group I	Group II	Group III
<i>A. astronyxis</i> T7	<i>A. castellanii</i> T4	<i>A. culbertsoni</i> T10
<i>A. comandoni</i> T9	<i>A. divionensis</i>	<i>A. healyi</i> T12
<i>A. echinulata</i>	<i>A. griffini</i> T3	<i>A. jacobsi</i>
<i>A. pearcei</i> T3	<i>A. hatchetti</i> T11	<i>A. lenticulata</i> T5
<i>A. tubiashi</i> T8	<i>A. lugdunensis</i> T4	<i>A. palestinensis</i> T2
	<i>A. mauritaniensis</i> T4	<i>A. pustulosa</i> T2
	<i>A. polyphaga</i> T4	<i>A. royeba</i> T4
	<i>A. quina</i>	
	<i>A. rhyodes</i> T4	
	<i>A. stevensoni</i> T11	
	<i>A. triangularis</i> T4	



**Figure 5: Kystes d'*Acanthamoebae* représentant les différents groupes morphologiques I (a), II (b) et III (c)**  
[46]

Les *Acanthamoeba* sont le plus souvent classées en fonction de l'ADNr 18S [47]. En analysant plus de 50 souches issues des 3 différents morphogroupes, 12 génotypes ont été identifiés et nommés T1 à T12 [48, 49]. Cette même approche a été adoptée par d'autres groupes ce qui a conduit à la mise en évidence de 3 nouveaux génotypes T13 à T15 [50-52], et plus récemment un 16<sup>e</sup> groupe (T16) a été découvert [47].

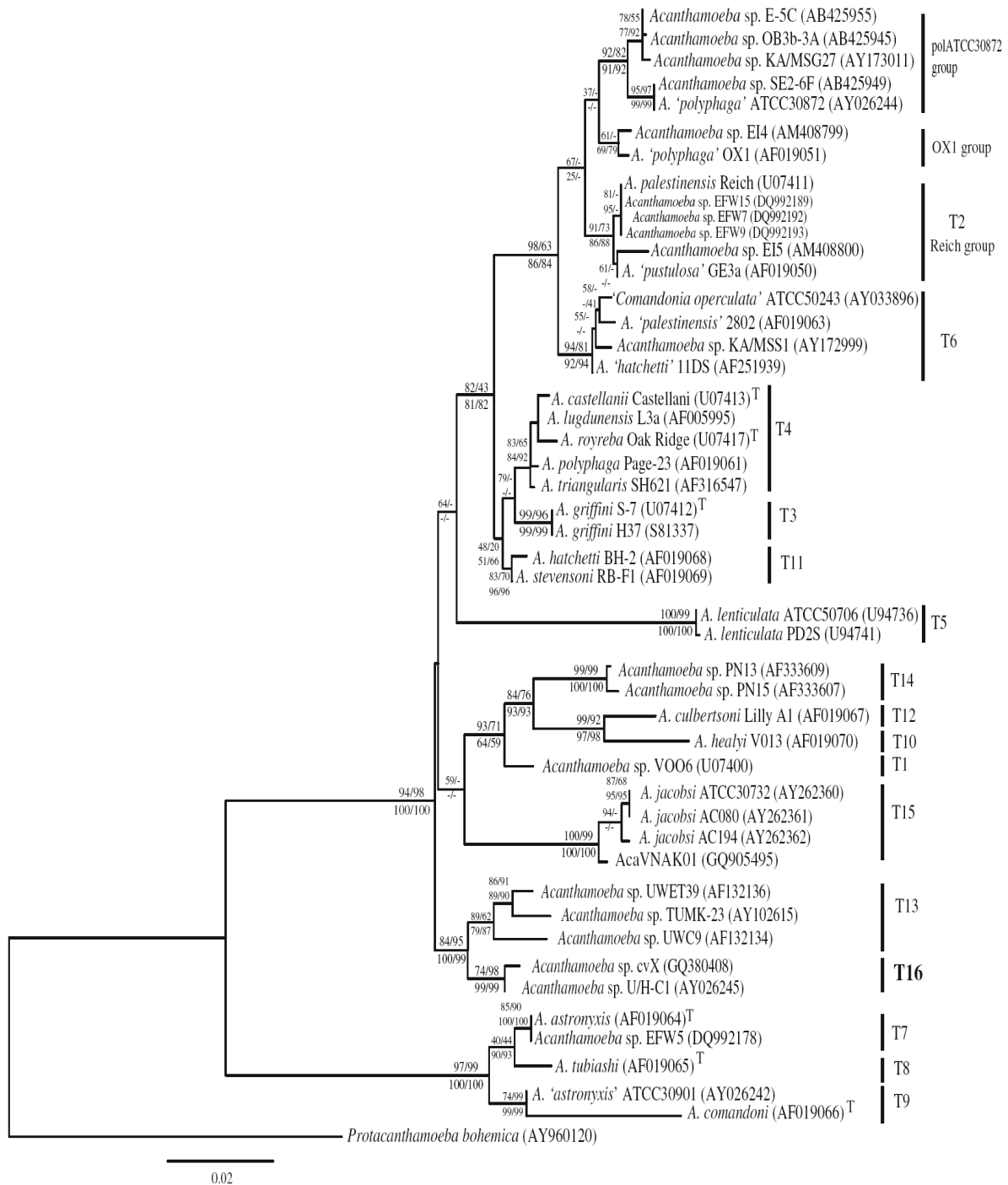


Figure 6: Arbre phylogénétique du genre *Acanthamoeba* basé sur une région de 1450 pb de l'ADNr 18S [47]

## 4/ Cycle répliatif et enkystement

### 4.1 Cycle répliatif

De manière comparable à de nombreuses autres espèces d'amibes libres, deux formes cellulaires distinctes existent au cours du cycle de développement des *Acanthamoebae*:

- une forme libre, métaboliquement active : le trophozoïte
- une forme résistante, métaboliquement inactive : le kyste

Les trophozoïtes sont la forme majoritaire lorsque les conditions de croissance sont optimales: nutriments en abondance, pH neutre, température aux environs de 30°C et osmolarité moyenne [5]. Le temps de génération varie d'un isolat à l'autre de 8 à 24 heures durant lesquelles le trophozoïte subit de discrètes modifications, calées sur le cycle cellulaire. Le cycle de répliation de ces amibes est asexué et se produit par fission binaire, donnant lieu à 2 amibes « filles » génétiquement identiques (Figure 7).

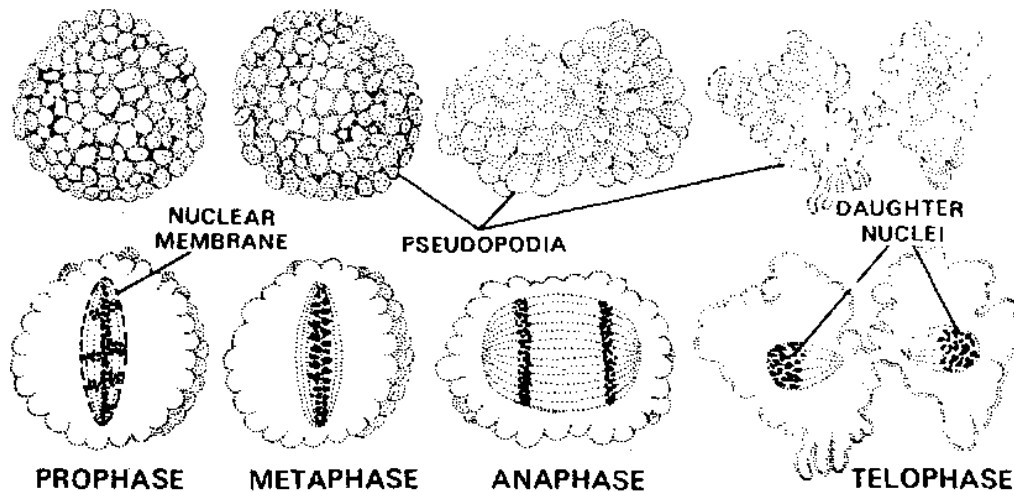


Figure 7: Cycle répliatif des amibes

<http://www.tutornext.com/help/nuclear-fission-animation-video>

## 4.2 Enkystement

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, les trophozoïtes induisent leur transformation en kyste via un processus d'enkystement [53, 54] (Figure 8). L'enkystement peut également survenir après une phase de croissance. Il s'accompagne de changements morphologiques, biochimiques et d'un ralentissement du cycle cellulaire. Le trophozoïte devient métaboliquement moins actif, il s'arrondit, son volume cellulaire diminue et il se condense en un kyste avec une double paroi, telle une carapace.

L'enkystement se déroule en 3 phases sous contrôle du noyau :

- le processus commence par une étape de pré-enkystement qui intervient au bout de 4 à 6 heures,
- puis la synthèse de la paroi débute et dure de 20 à 24 heures. La paroi externe est synthétisée en premier puis après une courte pose, la paroi interne se met en place,
- dans un 3<sup>e</sup> temps, le kyste entre dans une phase de « dormance » qui dure de 2 à 7 jours.

L'initiation de l'enkystement est donc restreinte à environ 30 minutes durant lesquelles le trophozoïte perd sa mobilité et prend une forme sphérique.

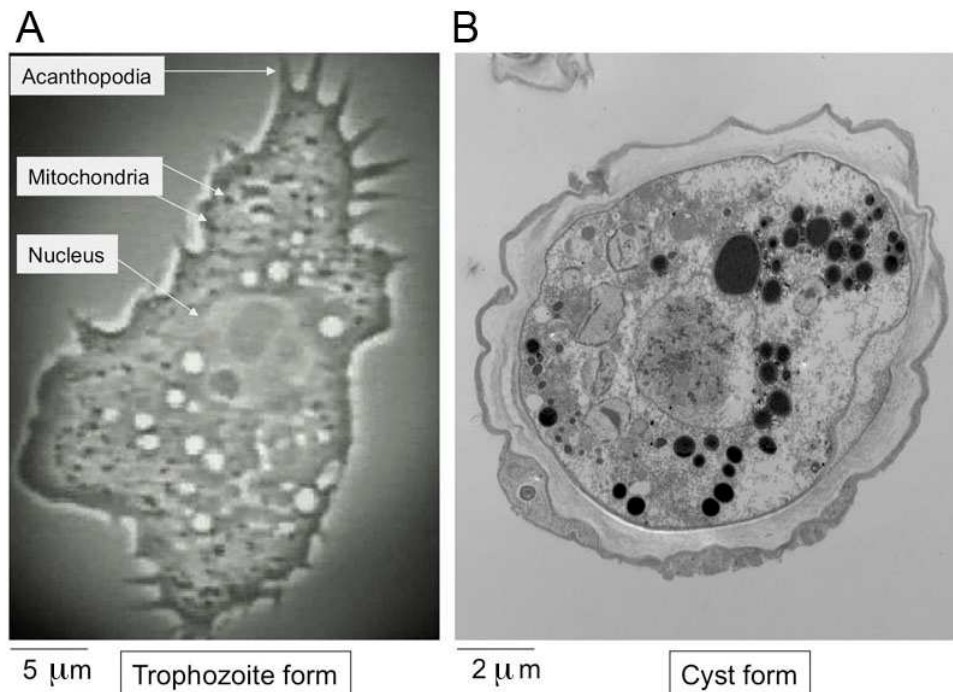


Figure 8: A/ Trophozoïte d'*Acanthamoeba* sous microscope à contraste de phase. B/ Kyste d'*Acanthamoeba* en MET [5]

Lors de l'enkystement le diamètre de l'amibe diminue considérablement, la souche Neff perd 65% de sa surface et 80% de son volume [55], quant au noyau, il perd 40% de son volume et le nucléole 75%. Une expulsion d'une partie de la chromatine périphérique est aussi observée. Il est important que le noyau et le nucléole restent fonctionnels durant l'enkystement car même après l'induction de ce processus, la synthèse d'ADN est poursuivie à un faible niveau (Figure 9, Figure 10).

Les modifications les plus visibles se situent au niveau de la paroi cellulaire. Le trophozoïte se condense en une structure ronde et synthétise une paroi cellulaire complexe qui mature en une double paroi, composée d'un ectokyste et d'un endokyste.

L'ectokyste apparaît en premier, avant même que la cellule devienne totalement ronde. Il mesure 250-300 nm d'épaisseur, présente également une couche d'environ 30-40 nm compacte et fibreuse [56]. L'ectokyste est composé de protéines et de polysaccharides.

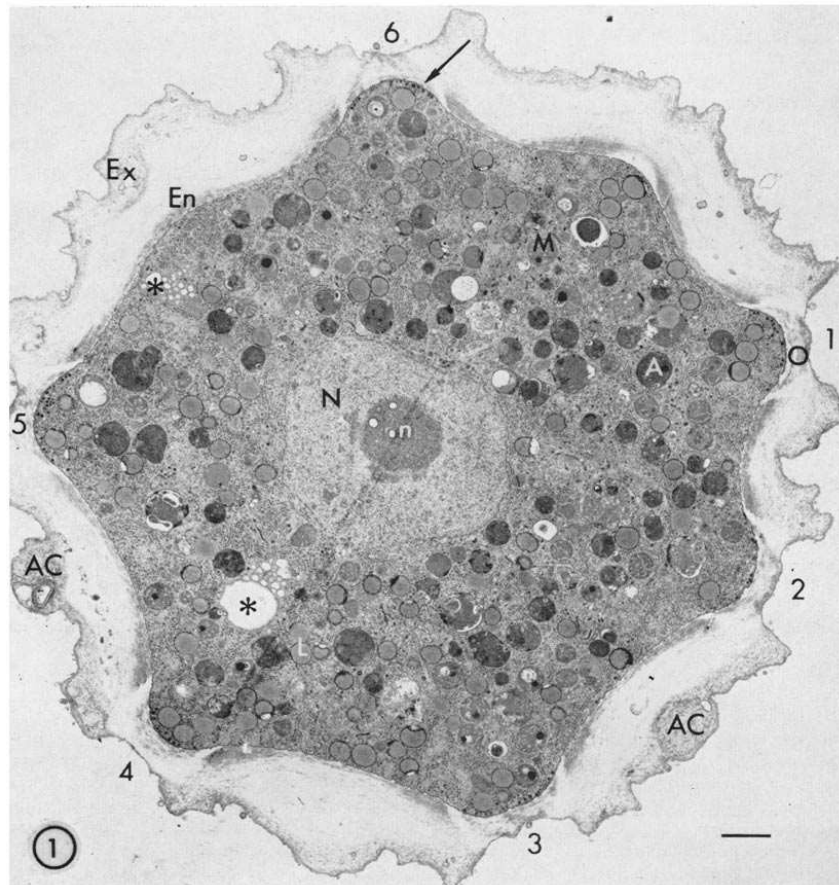
L'endokyste mesure 200-300 nm d'épaisseur et est composé de fines fibrilles formant une matrice granuleuse ainsi que de cellulose.

Les deux enveloppes superposées, et séparées par un espace d'environ 100 nm, se raccordent en certains points formant des orifices ou ostioles obturés par un opercule. C'est à partir de ces points que progresse l'enkystement.

Des vésicules provenant de l'appareil de Golgi libèrent leur contenu à la surface de la cellule afin de former la double paroi du kyste [57]. Cette même étude a montré que la cellulose synthétisée par l'amibe proviendrait du métabolisme des sucres. L'analyse de ces carbohydrates révèle la présence majoritaire de galactose et de glucose ainsi que de faibles quantités de mannose et de xylose [58].

Le kyste mature de la souche Neff est composé pour 1/3 de cellulose, 1/3 de protéines, 8% de minéraux, 5% de lipides, le reste des composés étant plus ou moins bien identifié [53]. La composition des kystes varie selon l'espèce et la souche considérée [59].

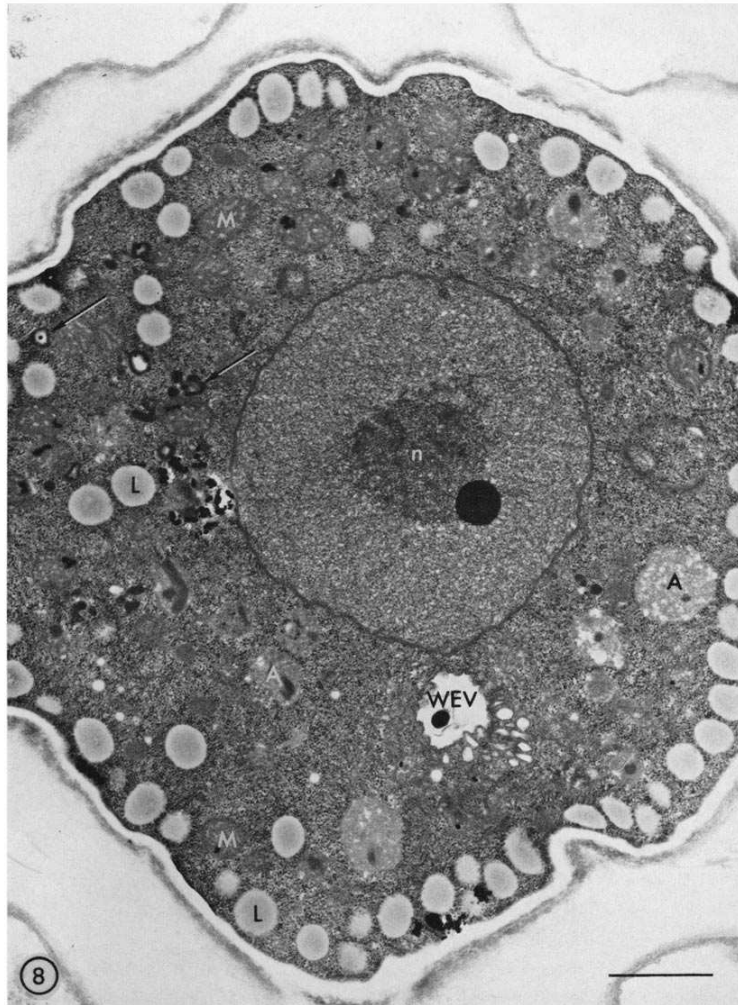
Les kystes sont très résistants et peuvent rester viables durant de nombreuses années [60]. Sous cette forme, la dissémination des amibes dans l'environnement est aussi facilitée.



**Figure 9: Coupe transversale d'une amibe en cours d'enkystement après 15h en tampon d'enkystement**  
[55]

Le cytoplasme dense contient un grand nombre de gouttelettes de lipides (L), des mitochondries sphériques (M) ainsi que des autolysosomes (A). Le cytoplasme forme des renflements à chaque ostiole (1-6), il y a des accumulations des vésicules de Golgi (flèches) au niveau de la membrane plasmatique. La paroi du kyste est composée de 2 couches, un ectokyste (Ex) et un endokyste (En) qui forment des opercules (0) sur les ostioles. Des débris cellulaires (AC) dérivant des autolysosomes sont également présents.

N : noyau ; n : nucléole ; \* : vésicule d'eau à expulser  
x 7620



**Figure 10: Amibe enkystée après 46h en tampon d'enkystement**  
[55]

Un nucléole (n) avec une gouttelette dense est présent dans le noyau. Les gouttelettes de lipides (L) ont atteint la périphérie sous la membrane plasmatique. Les vésicules d'expulsion d'eau (WEV) et les structures associées sont les seuls éléments qui restent libres.

A : autolysosomes ; M : mitochondrie ; flèches : gouttelettes issues des mitochondries  
x 18600

Récemment, une nouvelle forme de résistance a été décrite, induite par un stress chimique: les pseudokystes [61, 62].

Les pseudokystes apparaissent lorsque des trophozoïtes sont incubés avec différents produits chimiques (méthanol, acétone, DMSO) à de faibles concentrations (0.1% à 10%). Ce phénomène a également été observé avec le propylène glycol, un produit utilisé dans certains désinfectants pour lentilles de contact [62].

Les cellules s'arrondissent et se détachent de la surface d'adhésion. Ce phénomène dose-dépendant est également influencé par la température. Après 2 heures d'incubation, une membrane simple, lisse et épaisse est observable à la surface du pseudokyste. Les pseudokystes

ne sont pas capables, même après 7 jours d’incubation dans ce milieu, de se transformer en kystes avec une double paroi. Ils doivent au préalable repasser par la forme trophozoïte.

La simple membrane observée sur les pseudokystes est composée d’une fine couche fibrillaire semblable à du glycocalyx. Cette membrane mesure environ 80-100 nm d’épaisseur et est soit en contact direct avec le plasma soit via une fine inter membrane de 10 nm.

Deux types de pseudokystes matures ont été observés par Microscopie Electronique à Transmission (MET) : les premiers avec une membrane plasmatique lisse laissant passer les électrons et les seconds, denses aux électrons, avec une membrane rugueuse.

Après 2 heures d’incubation en solvant, la membrane des pseudokystes est seulement composée de mannose et de glucose contrairement aux kystes matures dont la membrane est plus complexe (mannose, glucose, galactose, N-acetylglucosamine et N-acetylgalactosamine) (Tableau II).

**Tableau II: Réactivité des enveloppes de surface des kystes et pseudokystes d'*Acanthamoeba* spp. à différentes lectines**  
[61]

Reactivity of surface envelopes of cysts and pseudocysts of *Acanthamoeba* spp. with various lectins.

Lectin	Carbohydrate specificity	Exocyst	Endocyst	Pseudocyst
Concanavalin A	$\alpha$ -glucose, mannose	+	+	+
Griffonia simplicifolia lectin	$\alpha$ -N-acetylglucosamine/ $\alpha$ -galactose	+	-	-
Wheat germ agglutinin	N-acetylglucosamine	+	+	-
Ricinus communis agglutinin I	galactose/N-acetylgalactosamine	+	-	-
Peanut agglutinin	galactosyl- $\beta$ -N-acetylgalactosamine	+	-	-
Dolichos biflorus agglutinin	$\alpha$ -N-acetylgalactosamine	+	-	-
Lens culinaris agglutinin	$\alpha$ -mannose/ $\alpha$ -glucose	+	+	-
Soyabean agglutinin	$\alpha$ / $\beta$ -N-acetylgalactosamine	+	-	-

Il a également été mis en évidence l’absence d’expression d’une protéine spécifique de l’enkystement CSP21 [63] lors de la formation des pseudokystes. Néanmoins, l’expression de 2 celluloses synthétases (CSI et CSII) intervient dans la formation des kystes et des pseudokystes [61].

Les pseudokystes se sont avérés moins résistants à la température, au pH et à la dessiccation que les kystes matures, mais plus que les trophozoïtes.

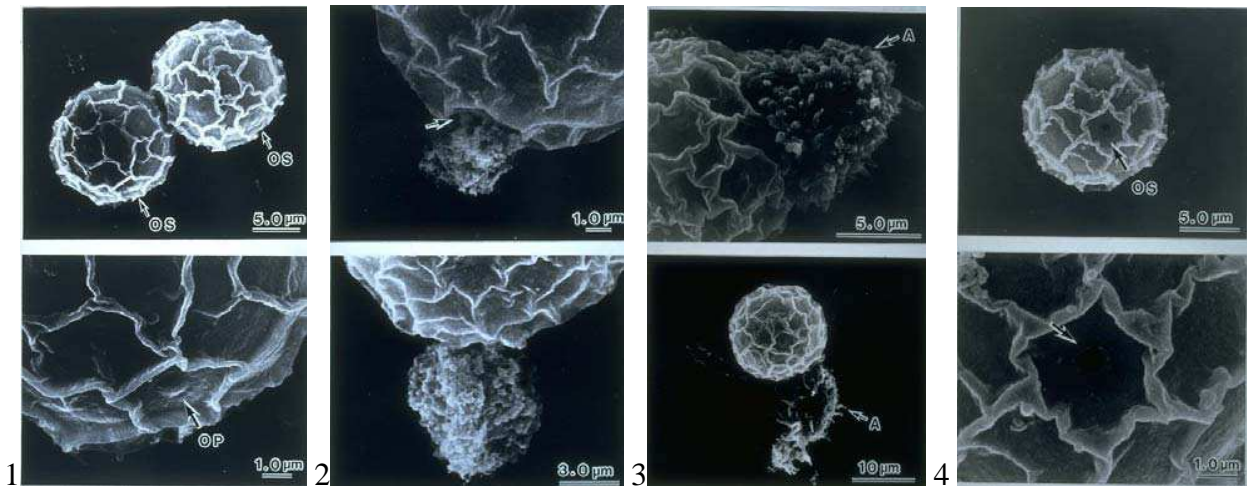


### 4.3 Désenkystement

Les kystes possèdent des pores nommés ostioles qui semblent servir à monitorer les changements environnementaux. Lorsque les conditions redeviennent favorables, les kystes se transforment en trophozoïtes.

Dans un premier temps, la vacuole contractile redevient visible et se déplace vers la paroi. Le trophozoïte se sépare alors de l'endokyste et bouge librement dans la paroi du kyste. Le trophozoïte poursuit alors son désenkystement, se sépare totalement de la paroi du kyste, développe à nouveau des acanthopodes et reprend son cycle de division (Figure 11).

Ce phénomène serait rendu possible par la sécrétion précoce par les kystes de 2 protéases, une cellulase et une chitinase [64].



**Figure 11: Les différentes étapes du désenkystement d'*A. culbertsoni***

- (1) Kyste mature
- (2) Pré-émergence
- (3) Emergence du trophozoïte
- (4) Kyste vide

<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Sarcodina/acanth/03.html>

Les études d'inhibition des sérines protéases menées par Dudley ont montré que ces protéases jouent un rôle particulier dans la différenciation d'*A. castellanii*, aussi bien dans les mécanismes d'enkystement que dans le désenkystement. En effet, le désenkystement est clairement inhibé quand les kystes sont incubés en milieu PYG en présence de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) ou de siRNA interférant avec les ARNm de la sérine protéase SubSP [65].

#### 4.4 Les facteurs induisant l'enkystement

Plusieurs facteurs sont responsables de ce processus d'enkystement, le manque de nutriments en est une des raisons principales. Une trop grande densité de cellules peut aussi être à l'origine de cette métamorphose, mais aussi des conditions de pH ou d'osmolarité détectées par des récepteurs transmembranaires. Des facteurs chimiques tels que des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN (fluodeoxyuridine, mitocine C), des mitochondries, ou de la synthèse protéique (érythromycine, chloramphénicol) peuvent aussi provoquer l'enkystement [66-68].

### 5/ Nutrition des amibes

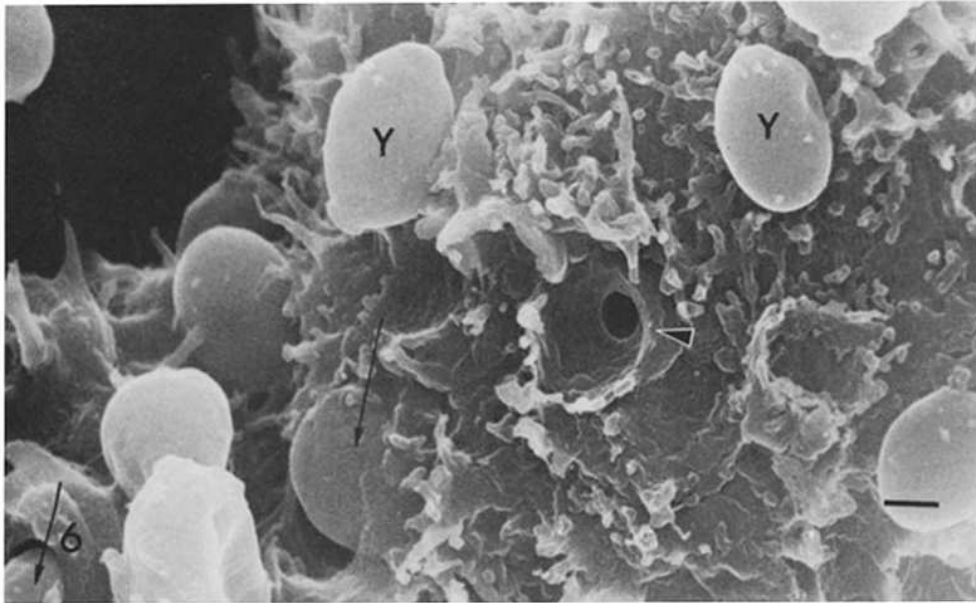
Les *Acanthamoebae* se nourrissent de micro-organismes présents sur les surfaces, dans différents environnements et aussi à l'interface entre l'air et l'eau. Des structures épineuses ou les acanthopodes peuvent aussi être utilisés pour capturer des particules alimentaires, qui sont le plus souvent des bactéries, mais aussi des levures ou d'autres protistes.

Les *Acanthamoebae* sont dépendantes de la pinocytose et de la phagocytose pour obtenir des nutriments, processus nécessitant de l'énergie. La phagocytose est une forme particulière d'endocytose alors que la pinocytose est un processus non spécifique, continu chez les cellules en croissance, permettant d'internaliser de grandes quantités de milieu et de solutés via une invagination de la membrane (Figure 12).

Concernant la phagocytose, il existe une taille optimale pour la formation de vésicules, déterminée grâce à des billes de différents diamètres (1.3 à 2.7 $\mu$ m) [69]. Les éléments plus petits sont accumulés à la surface jusqu'à atteindre une taille suffisante pour être phagocytés ensembles dans une vésicule. S'en suit alors la formation de phagosomes dans le cytoplasme, qui sont fusionnés avec des lysosomes afin de digérer les nutriments.

Le turn-over de la paroi des *Acanthamoebae* est d'environ 10-50% par heure ce qui est bien supérieur à la majorité des autres cellules [70, 71].

Les *Acanthamoebae* peuvent aussi être cultivées de façon axénique, c'est-à-dire en absence de bactérie mais en milieu de culture, le plus souvent, du PYG (Peptone Yeast Glucose).

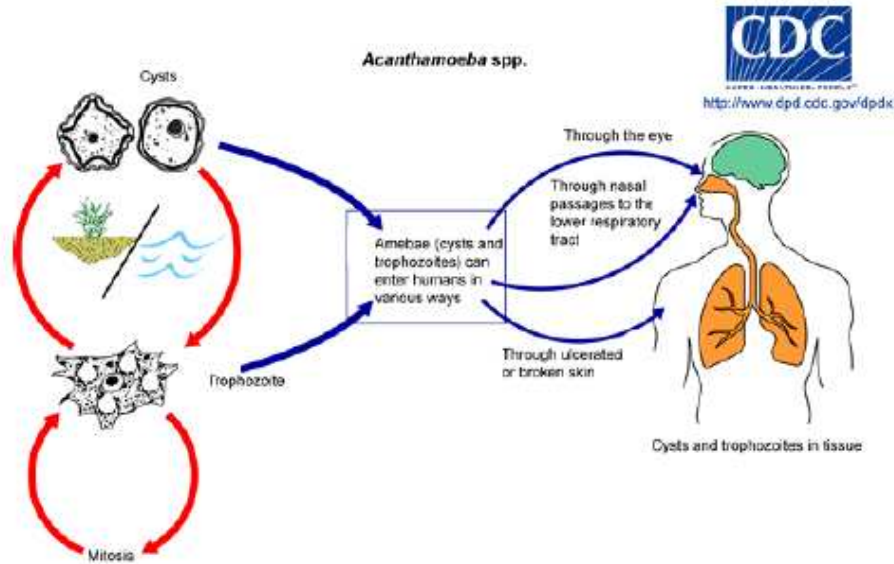


**Figure 12: Microscopie à balayage montrant la “bouche” d’un phagosome**  
[72]

La surface de l’amibe est parsemée de multiples acanthopodes, certains entourant des levures (Y). Les flèches indiquent deux levures en cours d’ingestion

## 6/ Pathologies humaines

Les *Acanthamoebae* peuvent être responsables de plusieurs pathologies chez l'homme, les deux plus fréquentes étant la kératite amibienne et l'encéphalite granulomateuse (Figure 13). On trouve également quelques cas d'amibiases cutanées.



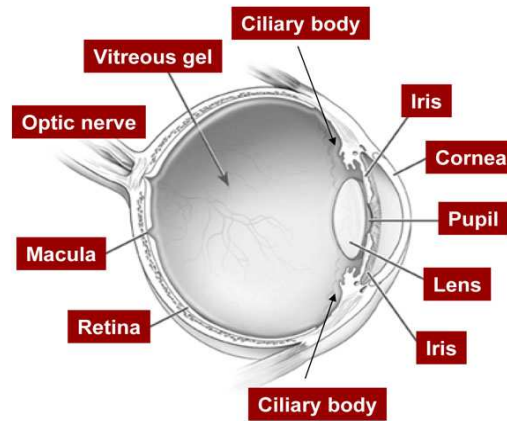
**Figure 13: Cycle de vie des *Acanthamoebae***  
<http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>

### 6.1 La kératite amibienne

Décrite au début des années 1970, la kératite amibienne est devenue une pathologie assez fréquente. Il s'agit d'une inflammation de la cornée, accompagnée de douleurs intenses, pouvant aller jusqu'à la cécité (Figure 14). Le facteur prédominant dans cette pathologie est le port de lentilles de contact associé à un contact avec de l'eau contaminée.

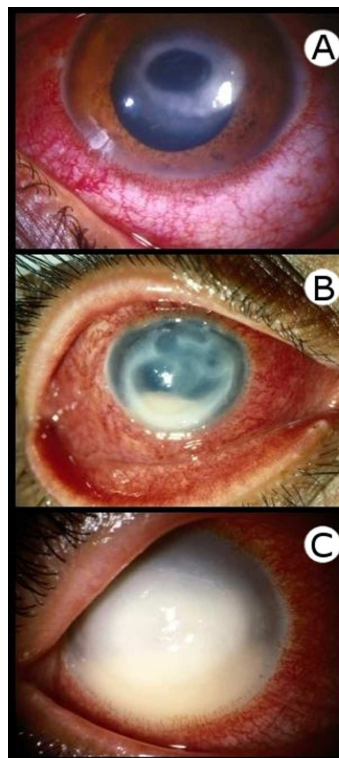
Il s'agit d'un processus multifactoriel :

- port prolongé de lentilles de contact,
- manque d'hygiène,
- mesures de nettoyage des lentilles inappropriées,
- formation d'un biofilm sur les lentilles,
- exposition à de l'eau contaminée par des *Acanthamoebae*.



**Figure 14: Anatomie de l'œil**  
[5]

L'infection d'un œil par des *Acanthamoebae* provoque une rupture de la barrière épithéliale, une invasion du stroma par le pathogène, suivie d'une déplétion des kératocytes et l'induction d'une intense réaction inflammatoire (Figure 15). Il s'en suit une nécrose du stroma [73, 74]. La destruction des kératocytes passe par une apoptose, un phénomène de nécrose mais aussi l'activité phagocytaire du parasite [75].



**Figure 15: Kératite amibienne**  
[76]

- A : kératite avec une infiltration circulaire
- B : kératite avec de multiples infiltrats circulaires
- C : kératite avec une suppuration quasi-totale

Les trophozoïtes sont capables d'adhérer à la quasi-totalité des lentilles de contact grâce à la présence d'acanthopodes, de lobopodes et de filopodes. Les kystes sont également capables d'adhérer aux lentilles, préférentiellement aux lentilles souples, plus riches en eau mais leur attachement est inférieur à celui des trophozoïtes.

Il semble que l'adhésion soit augmentée lors du port des lentilles par la présence de molécules telles que des saccharides (mannose, glucose, galactose...), des protéines, des glycoprotéines, lipides... et ce, dès 30 minutes de port des lentilles [33, 77-80].

La formation d'un biofilm est une étape critique de l'infection. Ce biofilm se forme suite à une contamination bactérienne de la lentille et/ou de la boîte de rangement, ce qui est très fréquent. Une étude a révélé que 83/102 systèmes de rangement de lentilles étaient contaminés par des bactéries, sur ces 83 positifs, 7 étaient également infectés par des *Acanthamoebae* [34]. Le biofilm joue un rôle aussi bien dans l'adhésion de l'amibe à la lentille que dans sa nutrition.

Il semble que l'état général de la cornée soit aussi un facteur déterminant dans l'acquisition de l'infection. En effet, une étude a montré que des animaux avec une cornée intacte ne contractaient pas d'infection après un contact avec une lentille infectée [81].

La présence d'un traumatisme de la cornée paraît d'autant plus importante dans les cas de kératite chez les non-porteurs de lentilles. Dans ce cas, il suffit d'une exposition à de l'eau, de la poussière ou de la terre contaminées [82, 83]. Une étude plus récente a également montré que les kystes ne sont pas capables d'adhérer directement à la cornée, ils doivent se transformer en trophozoïtes avant d'initier l'infection [84].

Le premier cas de kératite amibienne a été diagnostiqué en 1973 sur un homme porteur d'un traumatisme oculaire et exposé à de l'eau contaminée. Dans les premiers temps, il s'agissait d'infections rares mais les kératites amibiennes se sont multipliées de part l'essor des lentilles de contact et l'amélioration du diagnostic. En effet, les porteurs de lentilles ont 80 fois plus de risques de contracter cette infection que les non-porteurs [85, 86]. Il y a environ 125 millions de porteurs de lentilles dans le monde et ce nombre est en augmentation [87]. L'incidence des kératites liées aux *Acanthamoebae* varie selon les régions du monde, elle est de 0.33 pour 10 000 à Hong Kong, 0.01 pour 10 000 aux USA [88], 0.19 pour 10 000 en Angleterre [89] ou encore de 1.49 pour 10 000 en Ecosse [90, 91]. Ces chiffres ne reflètent pas la distribution géographique des *Acanthamoebae* mais sont plutôt dus aux comportements, à la détection de l'infection ou encore aux facteurs environnementaux responsables ou non de la croissance de ces amibes (salinité, dureté de l'eau...).

Le diagnostic clinique de la kératite amibienne n'est pas toujours facile et passe parfois pour une kératite bactérienne, virale ou encore fongique. Il passe donc par la reconnaissance des symptômes mais aussi la mise en évidence des amibes.

Cette infection peut être traitée par cryochirurgie ou encore grâce à un traitement chimique à base de biguanide associé à de la diamidine.

## 6.2 L'encéphalite granulomateuse amibienne (GAE)

Les *Acanthamoebae* du groupe T4 sont majoritairement responsables de cette infection. Il s'agit d'une infection rare mais à l'issue presque toujours fatale. Dans la majorité des cas, la GAE touche les personnes immunodéprimées, sous traitement immunosuppresseur ou abusant des st ro ides. Le principal problème lié à la GAE est la disponibilité plus que limitée de traitements, en effet, dans 90% des cas cette infection s'avère mortelle. L'examen post-mortem de cerveaux infectés révèle un œdème sévère ainsi que des nécroses hémorragiques associées à une irritation des méninges et de l'encéphale (Figure 16).

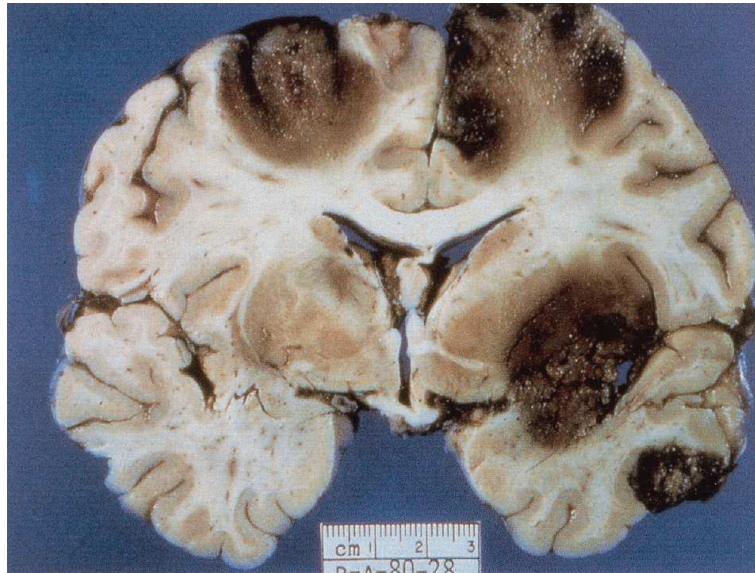


Figure 16: Section d'hémisphères cérébraux avec des nécroses corticales et sub-corticales. Cas fatal de GAE [6]



Il existe deux voies de contamination possible, via le nez ou le sang. Chez l'homme, les cas de contamination par des *Acanthamoebae* sont le plus souvent sanguins alors que pour les *Naegleria* spp. la voie nasale est majoritaire [2].

Il est admis que les *Acanthamoebae* peuvent passer par la voie respiratoire, ce qui induit une invasion des vaisseaux alvéolaires suivie par un passage dans le sang du pathogène. Des lésions épithéliales peuvent aussi créer une porte d'entrée vers le sang, sans passer par le système respiratoire. Les amibes passent alors ensuite la barrière hémato-encéphalique et se développent dans le cerveau [92].

Concernant la voie nasale, les amibes colonisent l'épithélium nasal et migrent le long de la fibre nerveuse jusqu'à envahir le bulbe olfactif [93, 94].

L'infection cérébrale est assez rapide et peut être fatale en quelques jours à quelques semaines. Les *Acanthamoebae* spp. peuvent aussi être responsables d'infections du système nerveux central chez les singes, les ovins, les bovins, les chevaux, les kangourous mais aussi les oiseaux, les amphibiens, les reptiles ou encore chez des invertébrés.

Il semblerait que cette pathologie soit responsable de 1.55 pour 10 000 décès de personnes infectées par le VIH aux USA, ce qui pour 1996 représentait 6 décès liés à une GAE [95]. Ce chiffre peut sembler faible néanmoins, le nombre de cas de GAE est sûrement beaucoup plus important dans d'autres pays ayant un climat tropical, favorisant la présence des amibes et des activités d'extérieur. Les cas de séropositifs au VIH étaient estimés en 2007 à 40-45 millions dans le monde ce qui représente un grand nombre de malades potentiels, d'autant plus que dans les pays en développement, l'accès aux traitements est très limité. Il est cependant difficile d'évaluer exactement le nombre de décès par an attribuables à la GAE de part le manque d'expertise et globalement de système de santé dans de nombreux pays.

Les symptômes observés sont ceux d'une méningite infectieuse : maux de tête, fièvre, modification du comportement, hémiparésie ou encore léthargie, aphasie, nausées, vomissements...

Le diagnostic est difficile à établir du fait de la rareté des cas et des symptômes compliqués pouvant faire penser à d'autres pathogènes. Il peut se faire par résonance magnétique ou encore par tomographie montrant alors les lésions cérébrales.

Il n'existe pas de traitement recommandé dans la mesure où la majorité des diagnostics se font post-mortem. En effet, ces amibes sont peu sensibles aux composés chimiques anti-amibiens, de plus, ces composés sont incapables de passer la barrière hémato-encéphalique.



Les traitements utilisés sont une combinaison de kétoconazole, fluconazole, sulfadiazine, amphotéricine B, azithromycine ou encore rifampicine.

### **6.3 L'amibiase cutanée**

L'amibiase cutanée est caractérisée par des nodules et des ulcérations de la peau. Chez les individus en bonne santé, ces infections sont rares et demeurent limitées. En revanche, chez les individus immunodéprimés, ces infections peuvent constituer une porte d'entrée vers la circulation sanguine pour les amibes, ce qui peut avoir des conséquences létales.

L'examen des lésions révèle la présence de trophozoïtes et de kystes amibiens même si de prime abord, cela ressemble à une infection causée par un champignon, un virus ou encore une bactérie. Le diagnostic peut se faire par marquage au « Calcofluor white », immunofluorescence, PCR ou encore isolement direct de l'amibe. Il n'existe pas de traitement recommandé, le plus souvent les patients sont traités par application d'itraconazole ou de kétoconazole.

### **6.4 Les autres pathologies liées aux *Acanthamoebae***

Les *Acanthamoebae* ont aussi été mises en évidence à partir de différents types de prélèvements physiologiques et/ou cliniques : cavités nasales [96-100] et de nombreux autres prélèvements provenant de patients [4, 76, 101-103].

Au Brésil, suite à l'observation occasionnelle d'amibes dans des échantillons d'urines par un laboratoire d'analyses clinique de microbiologie, une étude a été menée sur des patients hospitalisés en soins intensifs. L'urine de 200 patients porteurs de cathéter urinaire a été prélevée et analysée afin de détecter la présence d'amibes. 63 échantillons (26%) ont permis d'isoler des *Acanthamoebae*. La présence de ces amibes est difficile à expliquer néanmoins, les bactéries peuvent servir de nourriture aux amibes, qui peuvent elles-mêmes protéger les bactéries des traitements antibactériens, des désinfectants ainsi que du système immunitaire du patient, et ce, particulièrement sous la forme enkystée [101].

Dans une autre étude [102], des *Acanthamoebae* ont été isolées chez des patients immunodéprimés avec des symptômes de pneumonie. La présence d'amibes a été détectée dans deux broncho-aspirations de patients sous antibiothérapie, et dans deux lavages broncho-alvéolaires de patients avec une déficience respiratoire.

Chez les patients immunodéprimés, les infections à *Acanthamoebae* peuvent toucher la peau [104], les os [105]. Des cas de rhinosinusite [106, 107], de kératite [108-110], d'otite [111,

112], de vasculite [113, 114] ou encore d'endophtalmie [115] ont été décrits chez des patients souffrant de SIDA.

Des cas d'infection à *Acanthamoeba* ont également été reportés chez des patients ayant subi une transplantation de poumon, rein ou foie [116-121].

## II/ La désinfection des *Acanthamoebae*

Un des problèmes majeurs liés à l'évaluation de l'efficacité des biocides sur des micro-organismes est d'évaluer les différences de résultats obtenus ainsi que leur impact. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas des protozoaires puisqu'il n'existe à ce jour pas de méthode de référence standardisée comme pour les bactéries ou les virus. Les méthodes utilisées, notamment dans le cas des kystes d'*Acanthamoebae*, sont très variables. Le choix des souches testées, la composition du milieu de culture utilisé pour la croissance des trophozoïtes ou l'enkystement, le mode de préparation des kystes et leur âge ou encore la méthode utilisée pour évaluer la viabilité des kystes après traitement sont autant de variables à prendre en compte ce qui rend plus que complexe la comparaison des différentes études [122-125].

De plus, l'effet d'un biocide peut varier en fonction de la formulation associée, ce qui a été particulièrement démontré en ce qui concerne les produits de désinfection des lentilles de contact [126]. La plupart des études publiées s'intéressant à la désinfection des *Acanthamoebae* traitent plus particulièrement des biocides utilisés dans le cadre de la désinfection des lentilles de contact et du traitement de l'eau potable (Tableau III, Tableau X).

### 1/ Les biocides chimiques

#### 1.1 Les biocides cationiques

Ce sont des molécules chargées positivement qui en se fixant sur les membranes chargées négativement des micro-organismes provoquent des ruptures de cette membrane [127]. Les biocides cationiques sont très répandus notamment dans les savons et pansements antimicrobiens, les bains de bouche, produits pour les cheveux ou encore les désinfectants de surface [128]. Les biguanides (principalement la chlorhexidine (CHG) et le polyhexaméthylène biguanide (PHMB)) sont utilisés à faible concentration dans les produits pour lentilles mais aussi à plus forte concentration dans le cadre du traitement de la kératite amibienne. Les ammoniums quaternaires ont été moins étudiés du fait qu'ils sont très répandus comme désinfectants de surface et comme conservateur.

Les trophozoïtes d'*Acanthamoebae* spp., *A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. culbertsoni* sont sensibles à de faibles concentrations de CHG (0.005-0.006%) [129-132].

Des formulations d'ammoniums quaternaires sont efficaces contre différents trophozoïtes d'*Acanthamoebae* mais n'ont pas été testées contre des kystes [133].

Les biocides cationiques sont en général efficaces sur les trophozoïtes mais pas contre les kystes ce qui s'explique par la présence de cellulose dans leur paroi [134].

L'efficacité de ces biocides sur les kystes varie d'une étude à l'autre, par exemple les kystes d'*A. polyphaga* ont été décrits comme résistants à une solution de CHG durant plus de 2 jours [130] alors qu'une autre étude les a décrits comme très sensibles à des solutions contenant également de la CHG même sur une courte incubation [131]. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par l'importance de la formulation, en effet, la CHG 0.005% additionnée de thimerosal 0.001% et/ou d'EDTA 0.1% semble efficace contre les kystes [135, 136]. Le PHMB a été décrit comme efficace aussi bien sur les trophozoïtes que sur les kystes de diverses *Acanthamoebae* notamment isolées de kératites [137-142] alors que de faibles concentrations de ce même composé (0.00005%) et d'ammonium quaternaires (0.055-0.001%) ont été décrites comme inefficaces sur *A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. culbertsoni* [129-131, 135, 143]. Ces concentrations très basses correspondent à celles utilisées dans les produits de décontamination pour lentilles de contact. Plusieurs études ont démontré que certaines de ces solutions ne sont pas efficaces contre les kystes aux temps de contact recommandés par les fabricants [144-146]. En 2007, aux Etats-Unis est apparue une épidémie de kératite qui a été reliée à l'utilisation d'un produit à base de PHMB (0.0001%) présentant une efficacité limitée contre les kystes d'*Acanthamoebae* [147]. Une étude comparant l'efficacité de ce produit à d'autres produits à base de biguanides et de CHG a démontré qu'aucun de ces biocides n'était efficace contre les kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et d'*A. hatchetti* même après 24h d'incubation [126]. Le chlorure de benzalkonium à 0.04% est efficace contre les trophozoïtes et les kystes d'*A. castellanii* [135, 141, 142] et d'*A. polyphaga* [142]. Des concentrations plus faibles (0.003%-0.004%) se sont avérées inefficaces contre les kystes [129, 130, 132] alors que Turner *et al.* avaient démontré que la concentration minimale efficace contre les kystes d'*A. castellanii* était de 0.004% [134].

## 1.2 Les composés halogénés

Le chlore, l'iode et le brome sont des composés halogénés largement utilisés pour leur action biocide. Une fois dissous dans de l'eau, ces composés libèrent des espèces réactives possédant un fort pouvoir désinfectant. Leur mode d'action n'est, à ce jour, pas tout à fait élucidé, néanmoins, l'oxydation semble être leur principal mode d'action [128]. La teneur en composés organiques et inorganiques de l'eau influence l'efficacité de ces composés dans la mesure où ils

réagissent avec ces molécules. Le pH est également un élément critique, en effet, entre pH 4 et 7, la forme majoritaire pour le chlore est HOCl qui est l'espèce la plus biocide, c'est dans cette gamme de pH que le produit sera le plus actif. La température influence également l'efficacité de ces composés, une température froide entraînant une diminution de l'activité biocide.

Les trophozoïtes d'*Acanthamoebae* exposés à 5 mg/ml de chlore voient leur taille diminuer, 90% sont perméabilisés et le taux de thiol intracellulaire augmente [148]. Il a également été démontré que 99.9% de ces cellules ne sont plus cultivables après traitement, suggérant qu'environ 10% sont donc viables car non perméabilisées mais non cultivables. Une observation en microscopie électronique permet de voir la condensation des cellules, la perte des pseudopodes et la modification des organelles telles que les mitochondries et le noyau [148]. Différentes études ont montré l'inefficacité du chlore sur les kystes d'*Acanthamoebae* aux concentrations les plus fréquemment utilisées dans les réseaux d'eau (1-5 ppm) [149, 150]. Les kystes d'*Acanthamoebae* ont toujours été décrits comme résistants à de fortes concentrations de chlore, 100 mg/l durant 10 minutes [151] ou encore 50 mg/l durant 18 heures [152] sont inefficaces.

Les faibles concentrations de brome et d'iode ont également une efficacité limitée sur les kystes d'*Acanthamoebae* spp. Une étude récente a démontré que la povidone iodée seule ou en formulation inhibait la croissance des trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp, la concentration inhibitrice 50% varie selon les souches testées, de 90 à 370 ppm pour la povidone iodée seule et de 60 à 195 ppm pour la formulation [153]. Une autre étude a montré que la povidone iodée avait une efficacité très variable en fonction de la souche d'*Acanthamoeba* spp. testée [154]. Diluée en eau, une concentration comprise entre 0.031 et 0.062% est nécessaire pour inactiver les trophozoïtes de la souche la plus sensible, il faut 2.5 à 5% pour la plus résistante. Concernant les kystes, la concentration active varie entre <0.25% et >10% [154].

### **1.3 Les agents oxydants**

Bon nombre des biocides utilisés sont des agents oxydants: dioxyde de chlore, ozone, peroxyde d'hydrogène ou encore acide peracétique (PAA). Tous ces produits libèrent des molécules actives réagissant avec la surface des cellules et qui sont potentiellement capables d'entrer dans les cellules causant des dégâts irréversibles. Ces agents sont utilisés dans quasiment tous les domaines nécessitant un contrôle de la flore microbienne : traitement des eaux de boisson, antiseptie, désinfection de surface ou encore stérilisation de matériel [128].

Le dioxyde de chlore est un puissant agent oxydant, principalement utilisé pour le traitement de l'eau potable ou sous forme de gaz afin de réaliser des fumigations. Un traitement sur les *Acanthamoebae* est efficace après 30 minutes à une concentration de dioxyde de chlore de 3 mg/L [133]. En revanche, l'activité contre les kystes d'*A. polyphaga* est limitée même après 60 minutes à 5 mg/L [155], de plus, l'injection en continu dans des canalisations d'eau de 0.5 mg/L ne permet pas l'inactivation complète des amibes libres [149].

L'ozone est principalement utilisé dans le traitement de l'eau mais aussi pour des volumes d'air limités. Il ne possède pas ou peu d'activité résiduelle et est peu efficace à faible température. Il a été démontré que l'ozone est efficace à une concentration de 0.4 à 0.5 mg/L dans l'eau sur les kystes d'*Acanthamoebae*, excepté sur *A. polyphaga* CCAP 1501/3a [156]. Les effets sur les kystes d'*A. polyphaga* ont été confirmés par d'autres études, ce traitement ne permet pas d'inactiver les kystes même après 2 heures de traitement [155]. L'ozone permet de diminuer considérablement le nombre de kystes d'amibes dans les usines d'eau potable, néanmoins l'absence d'activité résiduelle permet la croissance des amibes après traitement [149, 157].

Les formulations à base de peroxyde d'hydrogène étant très utilisées pour la désinfection des lentilles de contact, leur efficacité sur les *Acanthamoebae* est très documentée [131, 136, 142, 145, 158, 159]. L'efficacité dépend du type de formulation mais également du temps de contact [158]. Deux études ont montré qu'un produit contenant 3% de peroxyde d'hydrogène était inefficace sur les *Acanthamoebae* spp. avec un contact recommandé de 30 minutes [135, 160]. Des temps de contact plus long (6 à 24 heures) sont en général recommandés pour les formulations à 3% sur les *Acanthamoebae*, en fonction du produit et de la souche testés [126]. L'efficacité contre les kystes peut être augmentée par addition de iodure de potassium ou d'autres peroxydases [161]. Sous forme de gaz, le peroxyde d'hydrogène semble efficace contre les kystes d'*A. polyphaga* et *A. castellanii* [162].

L'acide peracétique est très actif et présente une action rapide sur divers micro-organismes à de faibles concentrations [128]. Le PAA est efficace sur les trophozoïtes d'*Acanthamoebae* après 2 heures à une concentration de 15 mg/L, pour les kystes, il faut 150 mg/L durant 18 heures. En formulation, les trophozoïtes d'*A. polyphaga* sont tués après 30 minutes mais il reste des kystes viables après 24 heures de traitement [163].

### 1.4 Les aldéhydes

Trois principaux aldéhydes sont utilisés comme désinfectants : la glutaraldéhyde, l'orthophtalaldéhyde (OPA) et le formaldéhyde [128]. Chez les bactéries, ces produits agissent en dénaturant les protéines et en inhibant la synthèse de l'ADN, l'ARN et d'autres macromolécules. De par sa structure, l'OPA doit avoir une meilleure pénétration dans les micro-organismes [128].

Peu de données sont disponibles concernant l'efficacité des aldéhydes sur les amibes. La glutaraldéhyde à 2% semble peu active sur les trophozoïtes d'*A. polyphaga* après une incubation de 30 minutes à 2 heures [163]. Une autre étude a montré que 10% de formaline était efficace contre les kystes d'*A. castellanii* en 30 minutes [159].

### 1.5 Les alcools

L'éthanol et le n-propanol sont très utilisés comme désinfectants et antiseptiques. Leur principal mode d'action est de former des liaisons hydrogène entre les protéines, menant à une perte de structure, de fonction et une coagulation [128]. La concentration optimale est située entre 60 et 70% , au delà, les protéines externes sont coagulées mais il n'y a pas de pénétration du produit dans la cellule [128].

Les produits contenant 20% d'alcool isopropylique sont efficaces contre les kystes d'*A. castellanii* après plusieurs heures d'exposition [129, 159].

## 2/ Les biocides physiques

### 2.1 Les hautes températures

Il est admis que les protozoaires ne résistent pas aux températures élevées (>100°C) et aux temps de contacts prolongés utilisés pour la désinfection et la stérilisation notamment pour le matériel médical [164]. Des températures plus faibles ont une efficacité variable en fonction de l'espèce considérée. D'après Turner *et al.*, les trophozoïtes d'*A. castellanii* sont inactivés par 30 minutes à 46°C alors qu'une température de 56°C est nécessaire pour les kystes [134]. Il a également été démontré que les kystes d'*A. castellanii* ne survivent pas à 5 minutes à 65°C [159] alors qu'une autre étude montre que les kystes d'*A. castellanii* et d'*A. polyphaga* nécessitent une exposition de 10 minutes à une chaleur humide de 80°C pour être inactivés [160]. Dans le cas des

*Acanthamoeba* spp. thermotolérantes, ces mêmes conditions ne sont pas suffisantes pour inactiver totalement les kystes [151].

## 2.2 Les ultraviolets (UV)

Les UV sont fréquemment utilisés pour la désinfection de l'eau; il y a néanmoins peu de données disponibles concernant leur efficacité sur les amibes libres. Une étude a décrit le mode d'action des UV sur les amibes et a démontré que les *Acanthamoeba* spp. étaient très résistantes aux UV [165]. Les UV semblent être efficaces uniquement sur les trophozoïtes [166]. En revanche, les kystes d'*Acanthamoeba* spp. sont résistants à une exposition aux UV-C à 253.7 nm,  $1.1 \text{ mJ s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  [167], les kystes d'*A. castellanii* sont eux capables de résister aux UV-B ( $800 \text{ mJ cm}^{-2}$ ). Une autre étude a montré une réduction de  $4 \log_{10}$  sur les kystes d'*A. polyphaga* après une exposition à  $40 \text{ mJ cm}^{-2}$  [168], ce qui indiquerait une différence de sensibilité en fonction des souches et des espèces étudiées. L'efficacité du traitement aux UV semble améliorée en association avec un inhibiteur de la réparation de l'ADN [169].

## 2.3 Les radiations gamma

Les radiations gamma sont utilisées pour la stérilisation et la désinfection dans un grand nombre d'applications : boissons, nourriture, produits pharmaceutiques, médicaux... Ce sont d'importantes sources d'énergie possédant une bonne pénétration et ayant un pouvoir biocide rapide [128]. Les kystes d'*A. castellanii* sont résistants à 2.5 kGy d'irradiation gamma [159] ce qui suggère que les amibes possèdent un bon système de réparation de l'ADN.

## 2.4 Les autres traitements

De nombreux autres traitements existent et sont décrits dans la littérature. Les trophozoïtes et kystes de plusieurs souches d'*Acanthamoebae* sont tués par 3 minutes au micro-onde [170]. La cryothérapie peut également être utilisée pour traiter in vitro et en clinique les kystes d'*Acanthamoeba* spp. mais n'est pas totalement efficace même après plusieurs cycles rapides de congélation à environ  $-100^{\circ}\text{C}$  [171, 172]. Des cycles répétés de congélation/décongélation ont également une efficacité limitée sur les kystes d'*A. castellanii* (5 cycles  $-160^{\circ}\text{C}/45^{\circ}\text{C}$ ) [159].



**Tableau III: Sensibilité des *Acanthamoebae* spp. aux biocides**  
[173]

<b>Biocides cationiques</b>		<b>Composés halogénés</b>			<b>Agents oxydants</b>			
		Chlore (Cl <sub>2</sub> )	Brome (Br <sub>2</sub> )	Iode (I <sub>2</sub> )	Dioxyde de chlore (ClO <sub>2</sub> )	Ozone (O <sub>3</sub> )	Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Acide peracétique (PAA)
M		H	H	H	H	M	M	M

<b>Alcools</b>		<b>Aldéhydes</b>			<b>Traitements physiques</b>			
Ethanol	Isopropylique	Formaldéhyde	Glutaraldéhyde	OPA	Chaleur	Ultraviolets (UV)	Radiations Gamma	Autres
F	F	M	H	M	M	M/H	M	M/H

F : faible résistance ; M : résistance moyenne ; H : haute résistance

La sensibilité aux biocides variant grandement selon les souches d'*Acanthamoebae*, la méthode utilisée et les biocides considérés, ces résultats sont des moyennes.

Un tableau plus complet est disponible en annexe (Tableau X).

### III/ Interactions avec les autres micro-organismes

Les *Acanthamoebae* peuvent contenir différents endosymbiontes tels que des virus, des levures ou encore des bactéries dont certains sont pathogènes pour l'homme.

Différentes études ont également montré que la virulence des micro-organismes pathogènes vis-à-vis des amibes est le reflet de leur virulence pour les humains et/ou les animaux [174, 175].

#### 1/ Les virus

##### 1.1 Les Mimiviridae

Les *Acanthamoebae* sont connues pour héberger le plus gros virus connu : le Mimivirus (Figure 17). Il s'agit d'une particule de 400 nm, comparable à la taille d'un mycoplasme. Ce virus possède un ADN double-brin et se développe dans les *Acanthamoebae*. Son génome est composé de 1.2 million de paires de bases comprenant plus de 900 gènes codant pour des protéines [176, 177].

Le Mimivirus constitue un mystère de l'évolution, en effet, la taille et la complexité de son génome le placent à mi-chemin entre les virus et les organismes cellulaires. Sa découverte a mené à la proposition d'une nouvelle famille de virus : les Mimiviridae

Ce virus semble capable de provoquer des infections respiratoires chez l'homme mais aussi chez la souris [177-179].

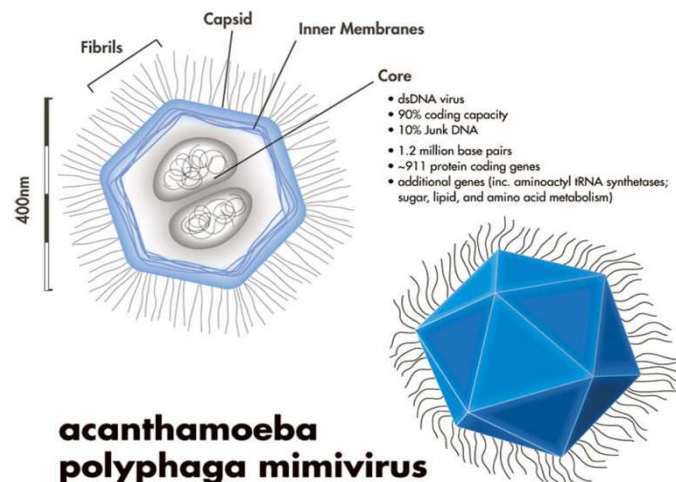


Figure 17: Schéma de structure du Mimivirus

[www.uniprot.org/taxonomy/212035](http://www.uniprot.org/taxonomy/212035)

Dans un second temps, un virus assez semblable a également été isolé, cette fois d'une *A. castellanii* présente dans le réseau d'eau d'un système de climatisation [180]. Ce virus s'est avéré avoir un génome encore plus grand que celui du Mimivirus et a été nommé Mamavirus (2 millions de paires de bases). Il a également été mis en évidence que ce virus était lui-même infecté par un autre virus : Sputnik.

Le second nouveau virus de petite taille (50 nanomètres et 18 000 paires de base) est capable d'infecter Mamavirus et Mimivirus lors de leur phase de réplication, en infectant directement le site de multiplication de ces virus géants dans l'amibe appelé «usine à virus».

Cette infection d'un virus par un autre virus est un mécanisme totalement inédit. De plus, cette infection a un effet pathogène sur les virus géants dont la croissance se ralentit. Il est alors possible d'observer des formes anormales.

De façon intéressante, le génome de Sputnik est une mosaïque de gènes provenant de virus qui infectent les trois domaines du vivant : les eucaryotes, les bactéries et les archaebactéries illustrant le transfert de gènes entre les virus de ces différents mondes. Cette découverte ouvre ainsi des perspectives sur l'évolution des génomes viraux et plus largement sur l'évolution des espèces vivantes.

## 1.2 Les *Marseilleviridae*

D'autres virus ont également été découverts comme le Marseillevirus, avec un génome plus petit que le Mimivirus (368 kpb) pour un diamètre d'environ 250 nm [181].

Un autre virus, le Lausannevirus, très proche génétiquement du Marseillevirus, a été mis en évidence dans des prélèvements d'eau de la Seine par coculture amibienne [182].

## 1.3 *Coxsackievirus*

Des études ont montré que les *Acanthamoebae* pouvaient jouer un rôle dans la survie et la transmission des virus Coxsackie et plus précisément du virus B3. L'utilisation de l'immunofluorescence a montré une adsorption du virus à la surface des amibes et leur accumulation dans les amibes. La survie du virus semble indépendante de la réplication et de l'enkystement des *Acanthamoebae* infectées. De plus, les amibes infectées peuvent libérer du virus lors d'interactions avec les macrophages humains. Les *Acanthamoebae* pourraient donc jouer le rôle dans la survie du virus mais aussi dans sa transmission à l'homme [183].

#### 1.4 Adénovirus

Une étude ayant recherché la présence d'Adénovirus dans 236 amibes potentiellement pathogènes, isolées dans les sources aux îles Canaries a mis en évidence la présence d'adénovirus dans 34 amibes par PCR. D'après ces données, les amibes peuvent être considérées comme un réservoir potentiel d'adénovirus ce qui pourrait leur permettre de transmettre ces virus à l'homme ou à d'autres espèces [184].

#### 1.5 Les autres virus

D'autres études ont montré que les trophozoïtes d'*Acanthamoebae* n'étaient pas capables d'adsorber le poliovirus ou le virus de la stomatite vésiculaire. De plus, après enkystement dans un milieu contenant ces deux virus, les kystes ne contiennent pas de virus. Le virus de la polio ne semble pas s'accumuler ni en surface ni à l'intérieur des *Acanthamoebae* même après 21 jours d'incubation. Concernant les echovirus, ils peuvent se fixer à la surface des amibes et persister de 52 à 75 jours. Les *Acanthamoebae* semblent donc jouer un rôle de transporteur dans la survie des echovirus [185, 186].

### 2/ Les levures

*Cryptococcus neoformans* peut être phagocyté et se répliquer à l'intérieur des *Acanthamoebae* conduisant à la mort de l'hôte. Une souche de *C. neoformans* dépourvue de capsule ne peut, quant à elle, pas survivre lors d'une incubation avec des amibes. *C. neoformans*, comme plusieurs champignons, est capable de produire de la mélanine. Cette mélanisation permet la protection contre les amibes ce qui suggère que ces caractéristiques pourraient permettre la virulence vis-à-vis des mammifères et aussi la survie dans les amibes et les champignons [5, 187, 188].

### 3/ Les protozoaires

Les *Acanthamoebae* sont capables d'internaliser jusqu'à 6 oocystes de *Cryptosporidium* par trophozoïte. L'élimination de ces oocystes dans le milieu est très lente, *Acanthamoeba* semble

donc jouer un rôle de transporteur et faciliter la transmission de *Cryptosporidium* [189]. Il en va de même pour les oocystes de *Toxoplasma gondii* [190].

#### 4/ Les bactéries

L'intérêt de l'infection des amibes par des bactéries remonte principalement à la découverte de *Legionella pneumophila* dans les amibes, dans les années 1980. Suite à des épidémies de Maladie du Légionnaire, des investigations ont mis en évidence l'association entre *L. pneumophila* et les *Acanthamoebae* dans les réseaux d'eau et de nombreuses installations propices au développement des amibes.

Par la suite, de nombreuses autres interactions entre des bactéries et les *Acanthamoebae* ont été mises en évidence. A ce jour, un très grand nombre de bactéries survivant à la phagocytose par les amibes ont été recensées. Les amibes peuvent servir d'hôte pour les bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes pour l'homme ou des espèces animales.

Environ 25% des souches d'*Acanthamoebae* isolées en clinique ou dans l'environnement sont infectées par un endosymbionte [191]. Dans plusieurs cas, une amibe était même porteuse de deux endosymbiontes bactériens [192]. Il semble également que les amibes isolées de tour aéro-réfrigérantes soient plus souvent infectées par des bactéries (55%) que les amibes provenant d'environnements naturels (7.5%) [27].

Plusieurs types de relations entre les amibes et les bactéries ont été décrites, l'amibe peut être un réservoir dans lequel la bactérie se multiplie ou bien être un « cheval de Troie » dans lequel la bactérie ne se multiplie pas mais survit uniquement. L'amibe peut également jouer un rôle de vecteur dans ce cas, la bactérie est adsorbée à sa surface. Il est parfois difficile d'établir quel est le lien entre la bactérie et l'amibe.

Globalement, l'amibe permet à la bactérie résistante de croître à l'abri. Certaines de ces bactéries sont également capables de résister à l'enkystement des amibes, leur permettant ainsi de résister à un environnement délétère comme la présence de biocide, par exemple [152, 193, 194].

Nombre de ces bactéries sont reconnues comme pathogènes pour l'homme comme *L. pneumophila*, *Escherichia coli* (O157H7), *Klebsiella pneumoniae*, de nombreuses mycobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Vibrio cholerae* et *Yersinia pestis* (Tableau IV).

Il a été établi que les *Acanthamoebae* pouvaient servir de réservoir pour *L. pneumophila* ainsi que pour d'autres pathogènes humains [195]. Les amibes peuvent également jouer un rôle dans la propagation et la distribution de *Legionella* spp. dans les réseaux d'eau ainsi que dans l'infection humaine [196], en effet, certaines *Legionella* peuvent survivre et se multiplier (x1000) dans les amibes libres. Les hommes pourraient donc théoriquement être infectés par l'inhalation de vésicules ou d'amibes contenant ces bactéries [196]. Les amibes enkystées peuvent protéger les bactéries des effets du chlore [152]. De plus, des vésicules remplies de *Legionella* peuvent être générées par une exposition d'*Acanthamoeba* spp. aux biocides [197] ce qui peut protéger les bactéries contre l'action des biocides. Ce phénomène pourrait expliquer la difficulté d'éliminer les légionelles des réseaux d'eau [198].

De nombreuses descriptions d'interactions entre les amibes et les mycobactéries ont été faites. *Mycobacterium leprae* a été la première mycobactérie décrite survivant dans les amibes, sans multiplication bactérienne ni lyse amibienne [199]. Il a également été montré *in vitro* que les mycobactéries peuvent croître dans les amibes [200] et une coculture amibienne a permis d'isoler une nouvelle espèce « *Mycobacterium massiliense* » d'une expectoration de patient [201]. La plupart des mycobactéries comme *M. chelonae* et *M. abscessus* sont capables de survivre dans les kystes d'amibes [202]. Il est également documenté que *M. avium* peut se multiplier dans les trophozoïtes d'*A. castellanii*. Cette croissance intra-amibienne permettrait d'augmenter la virulence des mycobactéries vis-à-vis d'autres amibes, d'une lignée cellulaire épithéliale intestinale ainsi que des macrophages [200]. La capacité de *M. avium* à coloniser l'intestin et à se répliquer dans le foie et la rate du modèle murin utilisé pour l'infection à *M. avium* serait également augmentée [200]. La croissance intra-amibienne de *M. avium* serait aussi responsable d'une augmentation de la résistance à certains antibiotiques tels que la rifabutine, l'azithromycine et la clarithromycine [203].

Certaines espèces bactériennes interagissant avec les amibes mais ne figurant pas dans la liste des espèces bactériennes pathogènes « CCL3 universe » publiée par l'Agence de Protection de l'Environnement ([http://www.epa.gov/safewater/ccl/pdfs/report\\_ccl3\\_microbes\\_universe.pdf](http://www.epa.gov/safewater/ccl/pdfs/report_ccl3_microbes_universe.pdf)) sont considérées comme potentiellement pathogènes, que ce soit à cause de quelques cas d'infections rapportés ou de fortes présomptions dues à des preuves indirectes (sérologies positives, détection par PCR) (Tableau V). C'est le cas notamment des nouvelles espèces de *Chlamydiae*.

En effet, ces dernières années, des bactéries apparentées aux *Chlamydiae* ont été mises en évidence dans des interactions avec des amibes. Nommés *Chlamydia-like*, ces nouveaux micro-organismes semblent être des pathogènes émergents aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Dans la mesure où il s'agit de bactéries souvent isolées des *Acanthamoebae* et pour lesquelles, à ce jour, peu d'informations sont disponibles, nous avons choisi d'étudier leurs interactions avec les amibes du genre *Acanthamoeba*. Nous nous sommes également intéressés à l'une des *Chlamydiales* les plus connues : *Chlamydia trachomatis*, afin d'avoir des éléments de comparaison pour l'étude de ces *Chlamydia-like*.

**Tableau IV: Interactions des bactéries pathogènes avec les amibes libres (espèces bactériennes recensées dans la liste des micro-organismes pathogènes publiée par l'Agence de Protection de l'Environnement, [http://www.epa.gov/safewater/ccl/pdfs/report\\_ccl3\\_microbes\\_universe.pdf](http://www.epa.gov/safewater/ccl/pdfs/report_ccl3_microbes_universe.pdf) [204, 205])**

Bacterial species	Described interaction with protozoa	Threat list					References
		Emerging Infectious Diseases	CDC notifiable	NIAID bioterror agents	Food & Water Pathogens	HHS Select Agents	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Co-culture and cell lysis (Ap Linc AP-1)						[206, 207]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc AP-1, Ac ATCC 30010)	x					[207, 208]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc AP-1)	x					[207]
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Co-culture (Ac ATCC 30010)						[208]
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Co-culture (Ac ATCC 30010)						[208]
<i>Acinetobacter junii</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc AP-1, Ac ATCC 30010)						[207, 208]
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Co-culture (Ac ATCC 30010)						[208]
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Co-culture (Ac ATCC 30010)	x					[208]
<i>Aeromonas caviae</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)						[209]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)						[209]
<i>Aeromonas veronii</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)						[209]
<i>Bacillus cereus</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)	x			x		[207, 210]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Co-culture ( <i>Naegleria fowleri</i> HB-1, Ac ATCC 30010)						[208, 211]
<i>Bacillus pumilus</i>	Co-culture (Ac ATCC 30010)						[208]
<i>Bacillus subtilis</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc Ap-1)						[207]
<i>Brevundimonas diminuta</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)						[210]
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc Ap-1)						[207]
<i>Burkholderia cepacia</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1), IC survival (Ap ATCC 50372)	x					[212, 213]
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	IC survival ( <i>Acanthamoeba astronyxis</i> CCAP 1534/1)	x		x		x	[214]
<i>Campylobacter coli</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)						[215]
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)						[215]



<i>Campylobacter jejuni</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)	x		x	x	[215]
<i>Campylobacter lari</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)					[215]
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)	x				[216]
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Co-culture with complete cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Co-culture with partial cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Citrobacter freundii</i>	IC survival (Ac ATCC 30234), co-culture (Ac ATCC 30010)					[193, 208]
<i>Coxiella burnetii</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)		x	x		x [217]
<i>Delftia acidovorans</i>	Co-culture with partial cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Edwardsiella tarda</i>	IC survival (Tp)					[193]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Enterobacter cloacae</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1), IC survival (Ac ATCC 30234), co-culture (Ac ATCC 30010)					[193, 208, 210]
<i>Escherichia coli</i> (includ. 0157H7)	IC multiplication (Ac, Ap), IC survival (Tp)	x	x	x	x	[218, 219]
<i>Francisella tularensis</i>	IC multiplication & IK survival (Ac ATCC 30234)	x	x	x		x [220]
<i>Hafnia alvei</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Helicobacter pylori</i>	IC survival (Ac)	x				[221]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	IC survival (Ac ATCC 30234), co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[193, 207]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IC survival (Ac ATCC 30234), co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)	x				[193, 207]
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)					[207]
<i>Legionella anisa</i>	IC multiplication (Tp, Ac ATCC 30010, Ap Linc-Ap1)					[37, 222-224]
<i>Legionella feeleii</i>	IC multiplication (Tp), Co-culture ( <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> )					[222, 225]
<i>Legionella hackeliae</i>	IC multiplication (Tp)					[222]
<i>Legionella longbeachae</i>	IC multiplication ( <i>Acanthamoeba</i> sp., Tp)					[226, 227]
<i>Legionella oakridgensis</i>	IC multiplication (Tp)					[222]
<i>Legionella pneumophila</i>	IC multiplication & IK survival (more than 20 FLA species*)	x	x			For a review see [228]
<i>Legionella rubrilucens</i>	Co-culture (Ap)					[229]
<i>Listeria ivanovii</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)					[230]
<i>Listeria monocytogenes</i>	IC multiplication (Tp), IC survival (Ac ATCC 30234)		x	x	x	[230-232]

<i>Listeria seeligeri</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)		[230]
<i>Listeria welshimeri</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)		[230]
<i>Methylobacterium mesophilicum*</i>	Co-culture and cell lysis (Ap Linc-Ap1)		[207]
<i>Morganella morgani</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)		[207]
<i>Mycobacterium abscessus</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)	x	[202]
<i>Mycobacterium avium</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30234 & CCAP 1501/1B, Ap Linc-Ap1 & CCAP 1501/3B, Dd AX2, Tp ATCC 30202), IK survival (Ap ATCC 30872 & Linc-Ap1)	x	[200, 202, 233] [234-237]
<i>Mycobacterium bovis</i>	IC & IK survival (Ac CCAP 1501/1A)	x	[238]
<i>Mycobacterium chelonae</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)		[202]
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30234), IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)	x	[200, 202]
<i>Mycobacterium gordonae</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1), co-culture (Ac ATCC 30010)		[37, 202, 208, 224]
<i>Mycobacterium kansasii</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30010), IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)	x	[175, 202]
<i>Mycobacterium leprae</i>	IC survival ( <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> ATCC 30171)		[199, 239]
<i>Mycobacterium malmoense</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)		[202]
<i>Mycobacterium marinum</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30234, Dd AX2), IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)	x	[200, 202, 240]
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)		[202]
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)		[202]
<i>Mycobacterium porcinum</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)		[202]
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	IC multiplication & IK survival (Tp ATCC 30202)		[234]
<i>Mycobacterium simiae</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1), IC survival (Ac)		[202, 241]
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1), IC survival (Ac)		[202, 241]
<i>Mycobacterium szulgai</i>	IC & IK survival (Ap Linc-Ap1)		[202]
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	IC survival (Ac, Ap)	x	[241, 242]
<i>Mycobacterium xenopi</i>	IC multiplication & IK survival (Ap Linc-Ap1), co-culture (Ac ATCC 30010)	x	[37, 224, 243]
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)		[207]
<i>Pantoea agglomerans</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)		[207]
<i>Pasteurella multocida</i>	IC multiplication (Ap ATCC 50372)		[244]
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30234)		[245]
<i>Prevotella intermedia</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30234)		[245]
<i>Providencia alcalifaciens</i>	Co-culture with partial cell lysis (Ap Linc-Ap1)		[207]

<i>Providencia rettgeri</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)								[207]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IC multiplication (Ap ATCC 30461, <i>Echinamoeba</i> sp.)	x							[246, 247]
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	IC multiplication (Ap Linc-Ap1)								[210]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Co-culture with cell lysis (Ap Linc-Ap1, Ac ATCC 30010)								[207, 208]
<i>Pseudomonas putida</i>	Co-culture with partial cell lysis (Ap Linc-Ap1, Ac ATCC 30010)								[207, 208]
<i>Rahnella aquatilis</i>	Co-culture and cell lysis (Ap Linc-Ap1)								[207]
<i>Ralstonia pickettii</i>	IC multiplication (Ac, <i>Naegleria lovaniensis</i> ATCC 30808)	x							[248]
<i>Rhodococcus equi</i>	Co-culture (Ac ATCC 30010)	x							[208]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Co-culture (Ac ATCC 30010)								[208]
<i>Rothia dentocariosa</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)								[210]
<i>Salmonella typhimurium</i>	IC multiplication (Ap Linc-Ap1)	x	x	x	x				[249]
<i>Serratia ficaria</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)								[207]
<i>Serratia marcescens</i>	Co-culture with complete cell lysis (Ap Linc-Ap1)								[207]
<i>Serratia plymuthica</i>	IC multiplication (Ap Linc Ap-1)								[210]
<i>Serratia proteamaculans</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)								[207]
<i>Shigella boydii</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)		x	x	x				[207]
<i>Shigella dysenteriae</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30234)		x	x	x				[250]
<i>Shigella sonnei</i>	IC multiplication (Ac ATCC 30234 & 30010)		x	x	x				[250, 251]
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	IC multiplication (Ap), IK survival (?)		x		x				[252, 253]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Co-culture with complete cell lysis (Ap Linc-Ap1)								[207]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	IC multiplication ( <i>A. polyphaga</i> Linc-Ap1)		x						[210]
<i>Tatlockia micdadei</i>	IC multiplication & IK survival (Ap Linc Ap-1, Ac, Hv, Tp, <i>A. culbertsoni</i> , <i>H. cantabrigiensis</i> )	x							[222, 254]
<i>Vibrio cholerae</i>	IC multiplication & IK survival (Ac ATCC 30234, <i>Naegleria gruberi</i> 1518/1e)		x	x					[255, 256]
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Co-culture (Ac ATCC 30234)	x		x	x				[257]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IC survival (Ac ATCC 30234)			x	x				[193]
<i>Yersinia pestis</i>	IC survival ( <i>Hartmannella rhyodes</i> )		x	x					[258]
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Co-culture without cell lysis (Ap Linc-Ap1)								[207]

Ac: *Acanthamoeba castellanii*

Ap: *Acanthamoeba polyphaga*

Dd: *Dictyostelium discoideum*

Hv: *Hartmannella vermiformis*

Tp: *Tetrahymena pyriformis*

\* Liste des amibes permettant la croissance de *Legionella pneumophila*: *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba griffini*, *Acanthamoeba lenticulata*, *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba royreba*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Balamuthia mandrillaris*, *Dictyostelium discoideum*, *Echinamoeba exundans*, *Hartmannella cantabrigiensis*, *Hartmannella vermiformis*, *Naegleria australiensis*, *Naegleria fowleri*, *Naegleria jadini*, *Naegleria lovaniensis*, *Naegleria gruberi*, *Platyamoeba placida*, *Saccamoeba* spp., *Vahlkampfia jugosa*, *Vexillifera* spp., *Willaertia* spp.

\*\* Now “*Legionella micdadei*”

IC: Intra cellulaire

IK: Intra kyste

**Tableau V: Interactions de bactéries potentiellement pathogènes avec les amibes (espèces bactériennes non recensées dans la liste des micro-organismes pathogènes publiée par l'Agence de Protection de l'Environnement) [204]**

Bacterial species	Described interaction with protozoa	References
<b>Alpha Proteobacteria</b>		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	IC multiplication ( <i>Ap Linc-Ap1</i> )	[210]
<i>Bosea</i> sp.	Co-culture ( <i>Ap Linc-Ap1</i> , <i>Ac ATCC30010</i> )	[229, 259, 260]
<i>Bradyrhizobium</i> sp	Co-culture ( <i>Ap Linc-Ap1</i> , <i>Ac ATCC30010</i> )	[37, 224, 229, 260]
<i>Rasbo bacterium</i>	Co-culture ( <i>Ap Linc-Ap1</i> , <i>Ac ATCC30010</i> )	[37, 224, 229, 260]
<i>Roseomonas gilardii</i>	Co-culture ( <i>Ac ATCC30010</i> )	[37, 224]
<b>Gamma Proteobacteria</b>		
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	Partial cell lysis ( <i>Ap Linc-Ap1</i> )	[210]
<i>Aeromonas salmonicida</i>	IC multiplication ( <i>Ap Linc-Ap1</i> )	[210]
<i>Legionella Like Amoebal Pathogens</i>	IC multiplication (various <i>FLA</i> species depending on LLAP isolate considered)	[261-263]
<i>Pseudomonas mendocina</i>	IC multiplication ( <i>Ap Linc-Ap1</i> )	[210]
<i>Klebsiella variicola</i>	Complete cell lysis ( <i>Ap Linc-Ap1</i> )	[210]
<b>CFB group bacteria</b>		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Co-culture and cell lysis ( <i>Ap Linc AP-1</i> )	[207]
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	IC multiplication ( <i>Ap Linc-Ap1</i> )	[210]
<b>High GC% Gram+</b>		
<i>Kocuria kristinae</i>	Co-culture ( <i>Ac ATCC 30010</i> )	[208]
<i>Mobiluncus curtisii</i>	IC multiplication ( <i>A. culbertsoni</i> A1 & others <i>Acanthamoeba</i> spp.)	[264]
<i>Mycobacterium bohemicum</i>	IC & IK survival ( <i>Ap Linc-API</i> )	[202]
<i>Mycobacterium goodii</i>	IC & IK survival ( <i>Ap Linc-API</i> )	[202]
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	IC & IK survival ( <i>Ap Linc-API</i> )	[202]
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	IC & IK survival ( <i>Ap Linc-API</i> )	[202]
<i>Mycobacterium mageritense</i>	IC & IK survival ( <i>Ap Linc-API</i> )	[202]

*Mycobacterium septicum* IC & IK survival (Ap Linc-API) [202]

*Mycobacterium tusciae* IC & IK survival (Ap Linc-API) [202]

**Bacilli**

*Staphylococcus pasteurii* IC multiplication (Ap Linc-API) [210]

---

Ac: *Acanthamoeba castellanii*

Ap: *Acanthamoeba polyphaga*

Dd: *Dictyostelium discoideum*

Hv: *Hartmannella vermiformis*

IC: Intra cellulaire

IK: Intra kyste

## IV/ Les *Chlamydiales*

On doit la première description de *Chlamydiae* à Halberstaedter and von Prowazek, en 1907, après avoir observé la transmission d'un trachome d'un homme à un orang-outang en grattant son épithélium conjonctif.

### 1/ Description des *Chlamydiales*

Les *Chlamydiales* sont des bactéries intracellulaires obligatoires, leur cycle de réplication passe donc systématiquement par l'infection d'un hôte eucaryote. Elles possèdent un cycle de développement caractéristique en deux phases et bien connu aujourd'hui grâce notamment à l'analyse microscopique de Bedson et Bland au début des années 1930 [265]. Ce cycle complexe, unique au sein du monde bactérien, est une caractéristique commune de la plupart des espèces bactériennes appartenant à l'ordre des *Chlamydiales* (Figure 18).

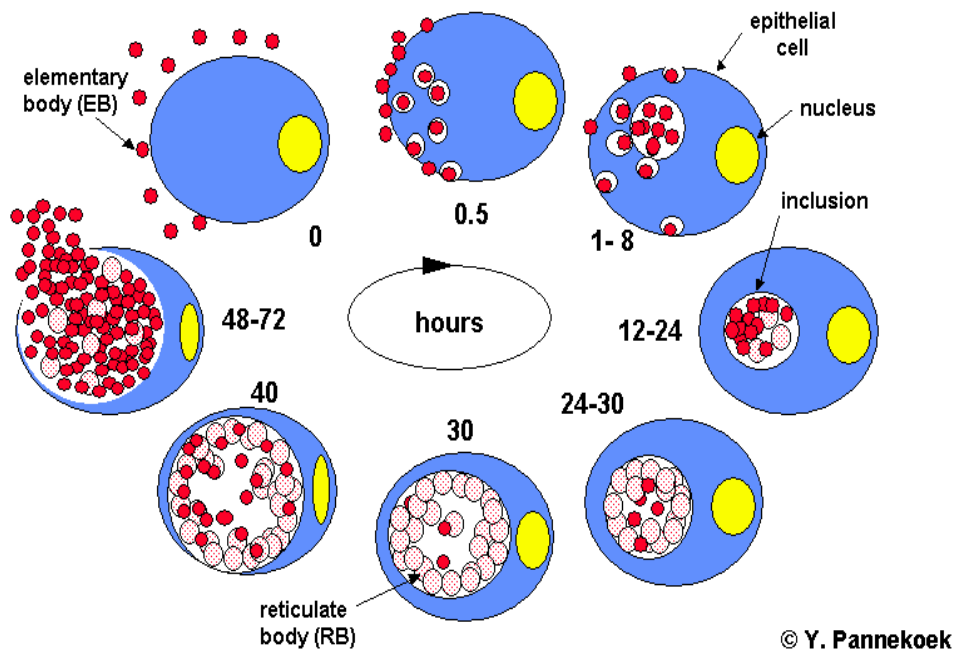


Figure 18: Cycle de développement des *Chlamydiae*

[www.chlamydiae.com/docs/biology/biol\\_devreg.asp](http://www.chlamydiae.com/docs/biology/biol_devreg.asp)

Les corps élémentaires (EB) sont en rouges et les corps réticulés (RB) en division sont en rose.

Une cellule hôte est infectée par la phagocytose d'un ou plusieurs corps élémentaire(s) (EB) qui sont ensuite internalisés dans les vésicules d'endocytose. La fusion phago-lysosome est inhibée ce qui permet leur différenciation en corps réticulés (RB), de plus grande taille et métaboliquement actifs. Ce sont alors les RBs qui se divisent par fission binaire, leur accumulation conduit à la formation de vésicules appelées « inclusions ». Dès la 20<sup>e</sup> heure, la population des inclusions devient hétérogène car certains RBs se transforment en EBs. L'inclusion grossit progressivement jusqu'à l'éclatement de la cellule qui permet ainsi la libération de nombreux EBs dans le milieu.

Les EBs (environ 0.3 à 0.6 µm) et les RBs (environ 1µm) de la plupart des *Chlamydiae* sont coccoïdes bien que certaines *Chlamydia*-like nouvellement identifiées présentent des EBs allongés, en forme de bâtonnet ou encore d'étoile [224, 266, 267].

Le rôle principal des EBs, infectieux, semblables à des spores est de survivre en dehors d'une cellule hôte. Les EBs sont très bien adaptés à un environnement extracellulaire, longtemps réputés métaboliquement inactifs [268], il a été montré que les EBs sont en fait capables de capturer des acides aminés [269]. Ils possèdent un ADN très condensé [268], une membrane externe et une membrane interne, parfois séparées par un espace périplasmique. Les EBs sont Gram négatifs (*Chlamydiaceae*, *Simkaniaceae* ou *Waddliaceae*) ou Gram variable (*Parachlamydiaceae*) et très denses aux électrons contrairement aux RBs.

## 2/ Phylogénie et classification des *Chlamydiales*

Jusque récemment, l'ordre des *Chlamydiales* était constitué d'une seule famille (les *Chlamydiaceae*) et d'un seul genre (*Chlamydia*) [270]. En 1980, les "Approved Lists of Bacterial Names" citent deux espèces au sein du genre *Chlamydia* : *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci* [271]. Les souches de *Chlamydia trachomatis* se caractérisaient par une accumulation de glycogène au sein des inclusions et par leur sensibilité à la sulfadiazine alors que les souches de *Chlamydia psittaci* n'accumulaient pas de glycogène et, généralement, résistaient à la sulfadiazine [272-274].

En 1989, Grayston *et al.* proposent la nomenclature de *Chlamydia pneumoniae* pour des souches isolées de l'œil, du pharynx et de l'appareil respiratoire de l'homme [275]. Ces souches ressemblaient à celles de *Chlamydia psittaci* par l'absence de glycogène au sein des



inclusions et par leur résistance à la sulfadiazine. Toutefois, elles s'en distinguaient par la morphologie de leurs EBs, par leurs propriétés antigéniques et, surtout, par la composition de leur ADN (les hybridations ADN - ADN révèlent environ 10% d'homologie entre *Chlamydia pneumoniae* et *Chlamydia psittaci*).

De nombreux travaux avaient révélé que *Chlamydia psittaci* était très hétérogène et la réorganisation de cette espèce a débuté en 1992. En effet, en avril 1992, Fukushi et Hirai proposent la nomenclature de *Chlamydia pecorum* pour des souches isolées de ruminants et responsables de pneumonies, de polyarthrites, d'encéphalomyélites, de diarrhées et d'avortements. L'individualisation de cette nouvelle espèce repose sur les homologies ADN - ADN, sur la valeur du G + C %, sur l'analyse des fragments de restriction de l'ADN et sur la séquence du gène *omp1* (ou *ompA*) codant pour la protéine majeure de la membrane externe [276].

Les espèces *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae* et *Chlamydia psittaci* se caractérisent par la présence d'un antigène commun et par de grandes homologies de séquence des ADNr 16S ce qui justifie leur regroupement dans une même famille, la famille des *Chlamydiaceae* [277].

Au sein de cette famille, l'analyse de l'espace intergénique 16S-23S (environ 232 pb) et du domaine I (environ 620 pb) de l'ARNr 23S mettent en évidence l'existence de deux lignées. La première comprend l'espèce *Chlamydia trachomatis* et la deuxième comprend les autres espèces.

La "lignée *trachomatis*" est constituée de 3 groupes génomiques correspondant à l'espèce *Chlamydia trachomatis* (souches d'origine humaine), à un génomospecies regroupant les souches proches de *Chlamydia trachomatis* mais isolées du porc et à un génomospecies correspondant aux souches proches de *Chlamydia trachomatis* mais isolées de la souris et du hamster. Dans la "lignée non *trachomatis*" 6 groupes génomiques ont été mis en évidence : *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae* et 4 génomospecies (*Chlamydia psittaci* souches d'origine aviaire, *Chlamydia psittaci* souches d'origine féline, *Chlamydia psittaci* souches responsables d'avortements et *Chlamydia psittaci* souches isolées du cobaye)[277].

A partir de 1995, deux nouveaux groupes bactériens, apparentés aux *Chlamydiae*, ont été décrits : le "micro-organisme Z" isolé de cultures cellulaires [278] et le "*Candidatus Parachlamydia acanthamoebae*" regroupant des souches isolées d'amibes [279].

Ultérieurement, en 1999, une bactérie isolée d'un avorton bovin (la souche WSU 86-1044), d'abord considérée comme une rickettsie, a été placée dans l'ordre des *Chlamydiales*. Toutes ces bactéries ont des ADNr 16S dont les séquences présentent entre 80 et 90% de similitude avec les ADNr 16S des représentants de la famille des *Chlamydiaceae* et ce sont toutes des bactéries parasites intracellulaires obligatoires présentant le cycle de développement caractéristique des *Chlamydiales* [280].

En 1999, Everett *et al.* prennent en compte les données phylogénétiques (analyse des ARNr 16S et 23S), les homologies ADN - ADN et les caractères phénotypiques ce qui leur permet de bouleverser la systématique des *Chlamydiales*. Les principales conclusions de ces auteurs sont les suivantes [279]:

L'ordre des *Chlamydiales* est constitué de quatre familles:

- la famille des *Chlamydiaceae*,
- la famille des *Parachlamydiaceae* (souches de "*Candidatus Parachlamydia acanthamoebae*"),
- la famille des *Simkaniaceae* ("micro-organisme Z"),
- et une quatrième famille (souche WSU 86-1044) pour laquelle Everett *et al.* ne proposent pas de nom. Cette quatrième famille sera baptisée *Waddliaceae* par Rurangirwa *et al.* en 1999.

Au sein de la famille des *Chlamydiaceae*, l'existence des deux grandes lignées permet de reconnaître deux genres. En accord avec les règles 39a et 39b du Code de Nomenclature, la dénomination de *Chlamydia* doit s'appliquer au genre contenant l'espèce type (*Chlamydia trachomatis*) de l'ancien genre *Chlamydia*. Le deuxième genre est baptisé *Chlamydophila* [279].

Récemment, cette classification a été revue, à ce jour, seul le genre *Chlamydia* est conservé [281].

La famille des *Parachlamydiaceae* (genre *Parachlamydia*, espèce *Parachlamydia acanthamoebae*) rassemble les bactéries isolées d'amibes. Des amibes infectées par *Parachlamydia acanthamoebae* sont parfois isolées de l'homme ou chez l'animal, la famille des *Parachlamydiaceae* présente donc un intérêt aussi bien en médecine humaine que vétérinaire [282-285]. En revanche, la famille des *Simkaniaceae* dont les représentants sont

des contaminants des cultures cellulaires ne semble pas être responsable d'infection vétérinaire. L'habitat de *Simkania negevensis* n'est pas connu mais des examens sérologiques et des techniques de PCR suggèrent que cette bactérie est largement répandue chez l'homme [286-288].

La famille des *Chlamydiaceae* et, dans une moindre mesure, celle des *Waddliaceae* (genre *Waddlia*, espèce *Waddlia chondrophila*) sont importantes en médecine vétérinaire mais aussi en médecine humaine [289].

Au fil du temps, de nouvelles espèces ont été découvertes et la classification en a été modifiée (Figure 19).

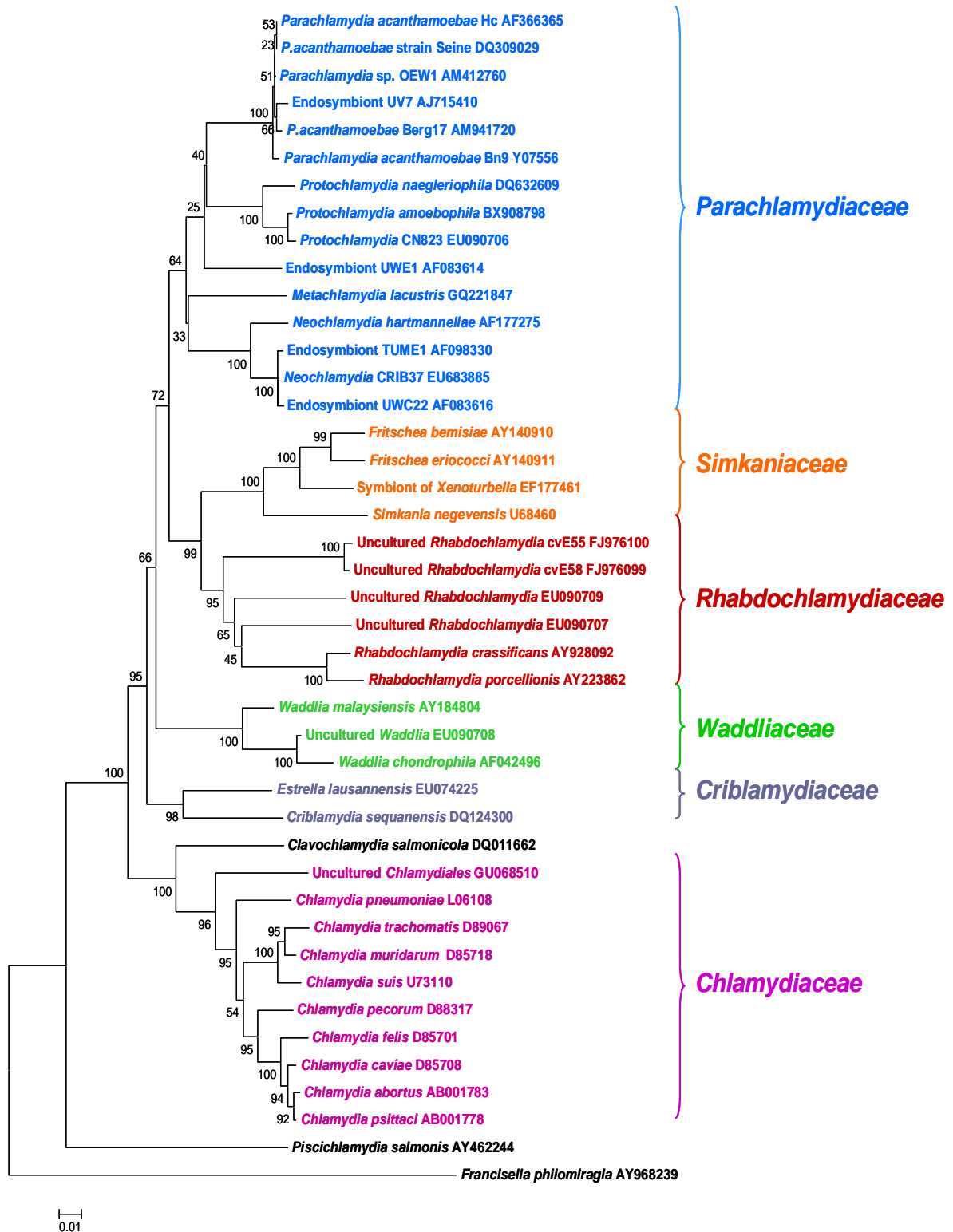


Figure 19: Arbre phylogénétique des *Chlamydiaceae* basé sur l'alignement des séquences d'ADN ribosomal 16S

### 3/ Les familles de *Chlamydiales*

Les représentants de l'ordre des *Chlamydiales* sont très ubiquistes dans le règne animal et ils ont été mis en évidence chez des amibes, des mollusques (plus de 25 espèces de mollusques bivalves), des crustacés (au moins 12 espèces), des poissons (plus de 35 espèces appartenant à 22 familles), des reptiles (caméléons, tortues), des oiseaux (plus de 139 espèces appartenant à 14 ordres et à 30 familles), des mammifères (bovins, caprins, chats, chevaux, chiens, cobayes, hamsters, koalas, ovins, porcs, souris) [290] ainsi que chez l'homme [267, 287, 290-299].

#### 3.1 Les *Chlamydiaceae*

A ce jour, la distinction entre les genres *Chlamydia* et *Chlamydophila* n'existe plus, seul le genre *Chlamydia* perdure, regroupant toutes les espèces décrites [281].

L'espèce la plus connue est *C. trachomatis* responsable, chez l'homme, d'infections oculaires et génitales telle que la lymphogranulomatose vénérienne. Les infections à *C. trachomatis* touchent environ 600 millions de personnes dans le monde avec une contamination croissante. Il s'agit de la première cause de cécité mondiale et est à l'origine d'infertilité [300].

Récemment, une souche de *C. trachomatis* a été isolée lors d'une campagne de prélèvements sur des patients atteints de kératite amibienne. Un patient était porteur d'une *Acanthamoeba* contenant pour endosymbionte une *Chlamydiaceae* très proche de *C. trachomatis* [301]. Cette découverte pourrait impliquer les *Acanthamoebae* dans le développement et la dissémination de *C. trachomatis*, important pathogène oculaire.

L'autre espèce responsable d'infections chez l'homme est *C. pneumoniae* qui est impliquée dans des infections respiratoires: pneumonie, bronchite, sinusite, pharyngite [302] mais joue aussi un rôle dans l'athérosclérose ou encore l'asthme [303, 304].

Il semble que *C. pneumoniae* soit capable d'entrer et de se multiplier dans *A. castellanii*, même si après une coculture prolongée sur amibes, des inclusions atypiques sont observées. Néanmoins, après lyse des amibes, les particules obtenues sont infectieuses et capables de produire un cycle de développement normal [216].

*C. abortus* semble, quant à lui, incapable de se multiplier dans les amibes, en effet, après infection, les bactéries disparaissent rapidement de l'amibe ce qui semble indiquer leur dégradation. *A. castellanii* ne semble pas être un réservoir naturel pour la propagation de *C. abortus* dans la mesure où les bactéries phagocytées semblent être digérées.

Les autres espèces sont responsables de diverses autres infections, principalement vétérinaires (Tableau VI).

**Tableau VI: Liste des *Chlamydiaceae* et les infections associées**

	Infection(s) associée(s)	Hôte
<i>C. trachomatis</i>	infection oculaire (trachome) infection génitale lymphogranulomatome vénérien	homme
<i>C. suis</i>	lésions nasales et pulmonaires	porc
<i>C. muridarum</i>	pneumonie	rongeur
<i>C. pneumoniae</i>	infection respiratoire athérosclérose asthme	homme
<i>C. pecorum</i>	pneumonie polyarthrite conjonctivite avortement encéphalomyélite entérite	mammifères
<i>C. felis</i>	pneumonie conjonctivite infection respiratoire haute (rhinite)	chat
<i>C. caviae</i>	infection oculaire	cochon d'Inde
<i>C. abortus</i>	infection génitale responsable d'avortement	ruminants
<i>C. psittaci</i>	chlamydie aviaire infection respiratoire humaine	oiseaux exceptionnellement l'homme

### 3.2 Les *Parachlamydiaceae*

Les *Parachlamydiaceae* sont des bactéries présentes naturellement au sein des amibes libres. Leur cycle de réplication est semblable aux *Chlamydiaceae*, comprenant toutefois en plus des EBs et des RBS, un troisième stade : le corps en croissant, particule infectante qui paraît spécifique des *Parachlamydiaceae* [305].

Comme les *Chlamydiae*, *Parachlamydia* peut entrer et se multiplier au sein des macrophages [306]. Cependant, contrairement à *C. pneumoniae*, *Parachlamydia* induit la mort des macrophages par apoptose, suggérant que les macrophages ne peuvent pas servir de niche répliquative ou de foyer de persistance à long terme [306]. Les *Parachlamydiaceae* sont également capable de réguler négativement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 ou le TNF- $\alpha$ , mais aussi de bloquer l'explosion oxydative, ce qui expliquerait au moins partiellement leur résistance aux macrophages [307]. Comme d'autres bactéries intracellulaires obligatoires, incapables de se multiplier en dehors des cellules, les *Parachlamydiaceae* possèdent une enzyme impliquée dans le parasitisme énergétique par échange d'ADP bactérien contre de l'ATP cellulaire [306]. Ainsi, la biologie très particulière des *Parachlamydiaceae* justifie à elle seule l'intérêt porté par de nombreux scientifiques pour ces bactéries découvertes très récemment.

#### Rôle pathogène des *Parachlamydiaceae*

Le premier indice de l'importance clinique des *Chlamydiales* résistantes aux amibes a été apporté par la découverte d'une souche de *Parachlamydia* dans une amibe isolée de l'eau d'un humidificateur lors de l'investigation d'une épidémie de fièvre dans une imprimerie. A cette occasion, Birtles *et al.* ont fait une étude sur les sérums de patients atteints de pneumopathies communautaires de cause indéterminée et ont détecté des anticorps dirigés contre *Parachlamydia* chez deux patients [262]. Dans un autre travail [308], 1,6% des cas de pneumonies (n = 121) et 2,35% des patients souffrant de pneumopathies communautaires se sont révélés séropositifs vis-à-vis de *Parachlamydia acanthamoebae*. Enfin, dans une étude incluant des patients hospitalisés aux soins intensifs, hautement exposés aux aérosols et par conséquent aux intracellulaires d'amibes, des anticorps (titre 1:100) dirigés contre *Parachlamydia* ont été détectés chez 13% des patients [309]. Les trois patients séronégatifs à l'admission et qui ont développé des anticorps spécifiques en cours de séjour souffraient tous

d'une pneumonie d'inhalation consécutive à une ventilation survenue suite à un traumatisme crânio-cérébral avec perte de connaissance [309]. *P. acanthamoebae* pouvant vivre dans des amibes libres présentes dans le nez de sujets sains, il semblerait que les patients aient été infectés lors d'une intubation ou d'une bronchoscopie.

En plus de ces données épidémiologiques et sérologiques, il existe des indices moléculaires appuyant l'hypothèse du rôle des *Chlamydiales* résistantes aux amibes dans les infections respiratoires. Ainsi, des séquences de l'ARNr 16S ont été amplifiées à partir d'échantillons prélevés au niveau des muqueuses nasales, pharyngées, ainsi qu'au niveau du tractus respiratoire inférieur de patients souffrant de bronchite ou de pneumopathie [310, 311]. Enfin, l'ADN de *Parachlamydia* a pu être amplifié de lavages broncho alvéolaires [312, 313], notamment chez un patient fortement immunodéprimé avec 80 cellules CD4 et souffrant d'une pneumonie d'étiologie inconnue.

Il a été démontré qu'une transmission materno-fœtale était possible avec ces bactéries [314]. De plus, les *Parachlamydiaceae* ont récemment été impliquées dans des cas d'avortements spontanés chez des bovins [282-284].

La présence de *Parachlamydiae* a aussi été démontrée par PCR dans du liquide céphalorachidien de patients atteints de sclérose, déjà positifs pour *C. pneumoniae* [315].

De plus en plus d'études semblent confirmer le rôle de *P. acanthamoebae* dans les infections pulmonaires [316]. En effet, ces bactéries sont également capables d'entrer et de se multiplier dans des pneumocytes et des fibroblastes [317], et, plus récemment un modèle murin de pneumonie à *P. acanthamoebae* a été validé [318].

#### Les différentes *Parachlamydiaceae*

##### *-Parachlamydia acanthamoebae*

Naturellement capables d'infecter les amibes, les souches Bn9 et Berg17 ont été isolées à partir d'amibes issues d'un prélèvement nasal de volontaires sains [319], alors que la souche Hall coccus a été isolée d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba* présent dans l'eau d'un humidificateur ayant provoqué de la fièvre [262]. Le génome de cette souche a été récemment séquencé [320].

La souche Seine a, quant à elle, été isolée dans des prélèvements d'eau de la Seine par Thomas *et al*, en 2006.

La souche UV-7 a été isolée dans des boues activées à Munich [321], cette souche est également capable de croître dans des cellules de mammifères (Vero, NCI et HeLa).



La souche OEW1 a, quant à elle, été isolée dans *Acanthamoeba* sp. OEW1, dans un lac salé en Autriche [192]. Dans ce cas précis, l'amibe était aussi infectée par une espèce bactérienne endosymbiotique appartenant au genre *Procabacter*.

#### *-Protochlamydia amoebophila*

D'abord nommé « UWE25 », *Protochlamydia amoebophila* a été décrit comme un endosymbionte d'*Acanthamoeba* spp. isolé d'un échantillon de sol [191, 322].

Ce micro-organisme est capable de se répliquer dans les *Acanthamoeba* spp mais aussi dans *Dyctiostelium discoideum* [235, 323]. Il a la particularité de former de petites inclusions ne contenant que peu de bactéries [324].

Il s'agit de la première espèce de *Parachlamydiaceae* dont le génome a été séquencé [325]. Cet endosymbionte a la particularité de posséder un génome important pour une bactérie intracellulaire obligatoire (environ 2.5 Mpb). Ce génome code pour des facteurs de virulence bien connus mais aussi pour des protéines de virulence d'habitude absentes chez les *Chlamydiae* pathogènes. Ce micro-organisme a aujourd'hui été rebaptisé *Candidatus Protochlamydia amoebophila* [324]. Il semble également capable de survivre dans les kystes d'*Acanthamoeba* [322, 326].

#### *-Protochlamydia naegleriophila*

Cet endosymbionte de *Naegleria* décrit par Michel *et al.* en 2000 [327], est aussi nommé Knic. Il inhibe la formation de kyste chez les *Naegleria* mais pas leur transformation en forme flagellée.

En 2008, Casson *et al.*, [328] en ont cultivé une grande quantité sur *Acanthamoeba castellanii*, ce qui leur a permis de réaliser des études phénotypiques, génétiques et phylogénétiques. Ce micro-organisme a aujourd'hui été rebaptisé *Candidatus Protochlamydia naegleriophila*.

Comme d'autres membres des *Parachlamydiaceae*, *Candidatus Protochlamydia naegleriophila* a été associé à des infections respiratoires chez l'homme [309, 313]. Ce diagnostic a été réalisé par PCR et grâce à l'utilisation d'une sonde spécifique.

Une étude a testé 134 lavages broncho alvéolaires issus de 65 patients atteints et 69 patients non atteints de pneumonie. Un échantillon s'est avéré positif pour un patient immunodéprimé avec toux, dyspnée et infiltrat pulmonaire. Ce résultat a été confirmé par une analyse immunologique. Aucun autre pathogène n'a été détecté chez ce patient [328].

*-Neochlamydia hartmannellae*

Cet endosymbionte a été isolé d'une *Hartmannella vermiformis* présente dans un système hydraulique d'une unité de soins dentaires à Lahnstein en 1995 par Michel *et al.* Ce micro-organisme a aussi été nommé A1Hsp. L'infection des amibes par cet endosymbionte empêche leur transformation en kyste et déclenche la lyse des amibes. Cette *Chlamydiae* est aussi capable d'infecter *Dictyostelium discoideum* [329].

*N. hartmannellae* semble impliqué dans des cas de maladies oculaires chez le chat [330] et kystes épithéliaux chez le poisson [331].

### 3.3 Les *Criblamydiaceae*

*Criblamydia sequanensis* a été isolée de prélèvements d'eau de la Seine par coculture sur *A. castellanii*, par Thomas *et al.*, en 2006 [224]. Il s'agit de la première représentante de la famille des *Criblamydiaceae*. Elle est capable de croître sur de nombreuses amibes.

Dans un second temps, deux nouvelles souches ont été isolées d'une usine de traitement d'eau, après analyse phylogénétique, ces souches sont très proches de *C. sequanensis*. Une de ces souches présente un EB en forme d'étoile ressemblant à *Criblamydia* [332]. Une de ces souches a été nommée *Estrella lausannensis*.

### 3.4 Les *Waddliaceae*

La première description date de 1999 par Rurangirwa *et al.*, la souche *W. chondrophila* WSU 86-104 (ou ATCC VR-1470) a été isolée de poumon et de foie d'un fœtus bovin avorté dans le premier trimestre [333].

Dans un premier temps, cette souche est apparue comme un nouveau membre des Rickettsies de part une réaction croisée avec un antisérum dirigé contre *Cowdria ruminantium*.

Cette souche présente le cycle de développement caractéristique des représentants de l'ordre des *Chlamydiales* mais la séquence de l'ADNr 16S ne présente que 84.7 à 85.3% de similitude avec l'ADNr 16S des autres bactéries de l'ordre des *Chlamydiales* ce qui permet de la classer dans une nouvelle famille [334].

Pour appartenir à la famille des *Waddliaceae*, une souche bactérienne doit posséder des ADNr présentant au moins 90% de similitude avec les ADNr de la souche WSU 86-1044. La famille des *Waddliaceae* est constituée de bactéries à Gram négatif dont le LPS est

dépourvu du trisaccharide  $\alpha$ Kdo-(2->8)- $\alpha$ Kdo-(2->4)- $\alpha$ Kdo. Les inclusions ne contiennent pas de glycogène et elles renferment des éléments de 0.2 à 0.4 mm de diamètre.

Une seconde souche a également été isolée d'un veau mort-né en Allemagne [335].

Une seconde espèce, *Waddlia malayensis* fut isolée des excréments d'une chauve-souris malaysienne [292].

Ces bactéries Gram négatives se multiplient dans différents types cellulaires produisant de multiples vacuoles cytoplasmiques. Les inclusions produites contiennent des organismes coccoïdes mesurant 0.2 à 0.5  $\mu$ m.

Aujourd'hui, le génome de *Waddlia chondrophila* est séquencé [336].

*In vitro*, la multiplication des *Waddliaceae* n'est pas inhibée par la pénicilline [333].

La croissance de *W. chondrophila* a également été démontrée dans des amibes, comme *Hartmannella vermiformis* [297] dans lesquelles la bactérie se multiplie avec un cycle de réplication typique des *Chlamydiales*. Les amibes peuvent donc être un réservoir pour *W. chondrophila* dans l'environnement. De plus, *W. chondrophila* semble capable de survivre dans les kystes d'*Acanthamoebae* [316].

#### Le rôle pathogène des *Waddliaceae*

La souche WSU 86-1044 était impliquée dans l'avortement d'un bovin aux USA en 1986, elle était alors présente dans les poumons, le foie et divers tissus du fœtus. Par la suite, une seconde souche fut également isolée d'un veau mort-né en Allemagne (souche 2032/99) [335]. Néanmoins, le rôle de cette bactérie dans l'avortement bovin reste à éclaircir [282].

Une étude américaine a démontré une corrélation entre la présence d'anticorps dirigés contre *W. chondrophila* et l'avortement bovin ( $p < 0.00001$ ) [337]. En Suisse, une étude basée sur la recherche de cette bactérie par PCR a mis en évidence la présence de *Chlamydia*-like chez 43/235 bovins victimes d'avortements. Cependant, cette étude n'a pas mis en évidence la présence de *W. chondrophila* mais de *Parachlamydia acanthamoeba* dans 9 cas [283, 338].

Dans la mesure où *Waddlia* semble impliquée dans des phénomènes d'avortements, des études ont recherché sa présence chez l'homme par PCR sur des échantillons de sang [289, 293, 334, 339]. La présence d'anticorps dirigés contre *Waddlia* par immunofluorescence et immunoblot a été démontrée chez des femmes anglaises souffrant d'avortements sporadiques ou récurrents (22/69 et 66/200 respectivement) contrairement aux contrôles ( $p < 0.001$ ).

Une PCR en temps réel a également été mise au point afin de permettre la détection spécifique de *W. chondrophila* sur des prélèvements cliniques de patients souffrants de pneumonie ou de bronchite [340] afin d'adapter au mieux le traitement à administrer.

En parallèle, leur capacité de réplication a été démontrée dans les macrophages humains ce qui supporte l'hypothèse de leur pathogénicité chez l'homme [341].

### 3.5 Les *Simkaniaceae*

*Simkania negevensis*, doit son nom à Simona Kahane qui l'a découverte en 1993. La seule souche décrite, *S. negevensis* ZT (ATCC VR 1471T) est un contaminant de culture cellulaire humaine et simienne.

Contrairement aux autres *Chlamydiaceae*, *Simkania* possède un intron de groupe I au niveau de l'ARNr 23S en position 1931 (numérotation *E. coli*), intron non épissé au niveau de l'ARNr et très proche de l'intron du groupe I des chloroplastes et des mitochondries chez les algues et les amibes [342]. Cela suggère un transfert horizontal ou des relations d'évolution entre ces différents organismes.

Des études environnementales ont montré qu'il existerait de nombreux micro-organismes apparentés à *Simkania* [310, 343]. Sa croissance ainsi que sa survie dans les kystes d'amibes a également été démontrée [344] et l'ADN d'organismes proches de *Simkania* a été retrouvé dans des eaux usées [343].

Avec 1.7 Mpb, le génome de *Simkania* est plus long que celui des *Chlamydiaceae* (entre 1 et 1.2 Mpb), mais plus court que ceux de *Protochlamydia amoebophila* (2.5Mbp), *Waddlia chondrophila* (2.1Mbp) ou *Parachlamydia acanthamoebae* (environ 3Mbp).

#### Biologie des *Simkaniaceae*

*Simkania negevensis* est une bactérie intracellulaire détectée pour la première fois dans des inclusions cytoplasmiques de cellules Vero [278]. Elle présente une forme répliquative qui ressemble au corps réticulé et une forme plus compacte, semblable au corps élémentaire. Très peu de données sur la biologie de cette bactérie sont disponibles. Cependant, le séquençage du génome bactérien est en cours.

Rôle pathogène des *Simkaniaceae*

En Israël, la séroprévalence paraît importante puisque 55% à 80% des adultes testés avaient des anticorps dirigés contre *Simkania* [287]. Au Canada, aux Etats-Unis et au Danemark, la séroprévalence est aussi élevée, témoignant de la présence des *Simkaniaceae* sur plusieurs continents [287]. *Simkania negevensis* a été associée à des cas de pneumopathie communautaire chez les adultes [345]. Ainsi, sur 308 patients atteints de pneumonie communautaire, 8 (2,6%) ont présenté des indices sérologiques d'une infection aiguë [286]. *Simkania* pourrait aussi jouer un rôle comme agent de bronchiolite chez des nourrissons [346]. Ceci est particulièrement important au vu de la fréquence de l'exposition des nourrissons à de l'eau contaminée par ce pathogène, comme en témoignent les taux de séroprévalence élevés dès les premières années de vie [287]. Enfin, *Simkania* est souvent retrouvée dans les infections polymicrobiennes chez les patients atteints de bronchopathie obstructive chronique et pourrait être impliquée dans l'aggravation de ces infections [286, 287].

Huit nouveaux isolats de *Simkania* ont été trouvés sur une campagne de prélèvements de 200 lavages naso-pharyngés lors de cas d'infections respiratoires dans le désert du Néguev. Sept de ces isolats se sont avérés identiques par séquençage. La très faible réaction croisée des anticorps anti *Simkania* vis-à-vis des autres *Chlamydiales* [347, 348] a permis de réaliser des études sérologiques spécifiques qui ont démontré la présence de *Simkania* chez des patients atteints d'infections respiratoires en Angleterre. *Simkania* pourrait aussi être impliquée dans des cas de pneumonie communautaire chez les enfants [349, 350].

De nombreuses études sérologiques [351] suggèrent que la distribution géographique de *Simkania* est très étendue. Des micro-organismes apparentés à *Simkania* ont été retrouvés dans des sources d'eau froide suggérant que les amibes sont un réservoir naturel pour cette bactérie.

Il convient de noter que la majorité des études portent sur des recherches sérologiques et non sur la détection directe de la bactérie elle-même.

La prévalence de *Simkania* augmente avec l'âge [352]. Il a également été montré que *Simkania* peut se multiplier dans les monocytes macrophages humains et peut être associée au rejet de transplant pulmonaire [353].

### 3.6 Les *Rhabdochlamydiaceae*

La première souche décrite fut *Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*, observée dans l'hépatopancréas d'un isopode : *Porcellio scaber*. D'abord nommée *Chlamydia isopodii* par Shay, cette bactérie a été reliée aux *Chlamydiae* [354] puis au genre *Rickettsiella* [355]. Par la suite, une étude microscopique et moléculaire a confirmé son appartenance aux *Chlamydiales*, et a mené à la création d'un nouveau groupe : les *Rhabdochlamydiaceae* [267].

Par la suite, *Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*, isolée chez la blatte a aussi été présentée comme appartenant aux *Rickettsiella* et a finalement été rattachée aux *Rhabdochlamydiaceae* [266].

Les *Rhabdochlamydiaceae* ont plusieurs fois été mises en évidence lors d'études épidémiologiques. En effet, des bactéries proches de *Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis* ont été détectées par PCR dans les prélèvements respiratoires de 2 patients atteints de pneumonie communautaire [311]. Une autre étude ayant pour objectif de détecter les *Rhabdochlamydiaceae* par PCR en temps réel a mis en évidence 4 (14%) cas de nouveaux porteurs de cette bactérie et présentant des symptômes de détresse respiratoire. Cette étude indiquerait que les *Rhabdochlamydiaceae* pourraient jouer un rôle pathogène chez l'homme [356]. Leur présence a également été mise en évidence sur des fœtus bovins avortés en association avec des *Parachlamydiaceae* [282].

## 4/ Diagnostic des *Chlamydia-like*

Aucune méthode diagnostique n'est à ce jour commercialisée. En raison de la culture fastidieuse des *Chlamydia-like*, une approche moléculaire est probablement plus facile et moins coûteuse [357]. Une approche sérologique peut également être utile, mais la sérologie nécessite des antigènes, qui ne peuvent être produits que par des laboratoires spécialisés. La sérologie est particulièrement précieuse pour la conduite d'études épidémiologiques, puisqu'elle apporte des informations sur un contact ancien ou actuel avec l'antigène.

La culture, bien que plus difficile, a l'avantage de mettre à disposition une souche, qui pourra à son tour être utilisée pour la sérologie (production d'antigène), la PCR (témoin positif) et l'immunohistochimie (production d'anticorps).

Deux approches existent pour cultiver les *Chlamydia-like*. La première approche vise à isoler directement la bactérie en utilisant la coculture d'amibe, un système de culture cellulaire

utilisant les amibes comme cellules. Le milieu de culture généralement utilisé ne contient pas de nutriments, ce qui réduit la croissance d'autres bactéries souvent présentes dans les échantillons cliniques physiologiquement non stériles. La seconde approche vise à isoler une amibe libre, qui est ensuite examinée pour la présence d'endosymbiontes. La culture d'amibes peut être effectuée en inoculant l'échantillon clinique sur une gélose supplémentée avec des entérobactéries (*E. coli*) qui leur servent de nourriture.

Un test ELISA a été mis au point pour détecter spécifiquement des anticorps dirigés contre *Simkania negevensis* [347].

En raison de sa très grande sensibilité, la PCR est particulièrement utile au diagnostic. Bien que réservée aux laboratoires spécialisés, la culture cellulaire et la coculture d'amibes ont l'avantage de pouvoir également détecter d'autres bactéries intracellulaires.

## **5/ Traitement des infections à *Chlamydia*-like**

La sensibilité de *Parachlamydia* aux antibiotiques a été étudiée par coculture d'amibes et analyse de la lyse amibienne en présence de concentrations croissantes de divers antibiotiques [358] (Tableau VII). *Parachlamydia* présente le même spectre de sensibilité aux antibiotiques que les *Chlamydiae*, à l'exception d'une résistance aux quinolones. Le traitement d'une infection documentée devrait donc utiliser en première intention un macrolide. La résistance de *Parachlamydia* aux dérivés de la pénicilline et aux céphalosporines est significative, puisque ces antibiotiques sont fréquemment utilisés en première intention pour le traitement des bronchites et des pneumopathies communautaires.

*S. negevensis*, comme les *Chlamydiaceae*, est sensible aux macrolides et à la tétracycline et totalement résistante aux dérivés de la pénicilline [287]. Ainsi, un traitement de macrolide paraît être une bonne option lorsqu'une infection par *Simkania* est documentée.

Tableau VII: Activité des antibiotiques sur les différentes *Chlamydiaceae*

	Sensible	Résistant	modérément sensible	Réf.
<i>Chlamydiae</i>	fluoroquinolones macrolides	B-lactames		[359]
<i>Waddliacea</i>		pénicilline vancomycine gentamicine streptomycine		[335]
		sulphate vancomycine amphotéricine B		[333]
	doxycycline azithromycine	fluoroquinolones B lactames		[360]
<i>Simkaniacea</i>	macrolides tétracycline	pénicilline		[361]
		pénicilline bacitracine		[348]
	érythromycine azithromycine			[288]
	D-cycloserine azithromycine minocycline érythromycine	pénicilline bacitracine	doxycycline ofloxacin ciprofloxacine	[287]
		quinolones		[362]
<i>Parachlamydiaceae</i>		quinolones		[362]
	macrolides tétracycline rifampicine	pénicilline céphalosporine carbapénèmes fluoroquinolones		[358]



## 6/ Interactions avec les amibes

De nombreuses *Chlamydiaceae* sont capables d'infecter et de se multiplier dans les amibes, pour certaines comme les *Parachlamydiaceae* il s'agit même de leur hôte de prédilection. Beaucoup de ces bactéries ont même été isolées dans des amibes (Tableau VIII) aussi bien dans l'environnement que dans le milieu hospitalier. La température peut également influencer le devenir de l'interaction entre les amibes et les bactéries. En effet, certaines bactéries peuvent devenir lytique pour les amibes en fonction de la température environnementale [363].

**Tableau VIII: Liste des endosymbiontes isolés dans des amibes**

Nom du symbionte	Pays d'origine	Source	Référence bibliographique
<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	USA	terre	[324]
<i>Protochlamydia naegleriophila</i> KNic	Allemagne	eau d'un aquarium	[328]
« Candidatus <i>Protochlamydia</i> » E12	Autriche	terre	[364]
Endosymbionte d' <i>Acanthamoeba</i> sp. UWE1	USA	terre	[365]
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> Bn9	Allemagne	Prélèvement nasal	[319]
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> Berg17	Allemagne	Prélèvement nasal	[319]
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> Hall's coccus	USA	Eau d'un humidificateur	[262]
<i>Parachlamydia</i> sp. isolat E11	Autriche	terre	[364]
<i>Parachlamydia</i> sp. isolat E16	Autriche	terre	[364]
<i>Parachlamydia</i> sp. isolat UV-7	Allemagne	boues activées	[321]
<i>Parachlamydia</i> sp. isolat OEW1	Autriche	Sédiment de lac salé	[192]
<i>Neochlamydia hartmanella</i>	Allemagne	Eau d'un conduit d'eau	[329]
Endosymbionte d' <i>Acanthamoeba</i> sp. TUME1	Allemagne	Boues activées	[322]
Endosymbionte d' <i>Acanthamoeba</i> sp. UWE1	USA	terre	[322]
Endosymbionte d' <i>Acanthamoeba</i> sp. UWE22	USA	Cornée humaine	[322]
<i>Candidatus Metachlamydia laccustris</i>	Allemagne	Biotope aquatique	[366]

Les *Chlamydia*-like ont un spectre d'hôte très variable selon les espèces considérées (Tableau IX). Certaines de ces bactéries sont capables de survivre dans les kystes d'amibes comme *S. negevensis* [344], *Protochlamydia amoebophila* [326] ou encore *W. chondrophila* [316] ce qui leur procure alors une protection contre l'environnement. D'autres comme les *Parachlamydiae* [305] ou *Neochlamydia hartmannellae* [329] diminuent très fortement voire bloquent l'enkystement des amibes.

Tableau IX: Spectre d'hôte des *Chlamydia*-like

	croissance			absence de croissance		Réf.
	amibes	Survie dans les kystes	cellules	amibes	cellules	
<i>Parachlamydiaceae</i> <sup>1</sup>	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010					[332]
	<i>A. castellanii</i> sp.	NON bloque l'enkystement				[326]
			macrophages			[306]
<i>UV-7</i>	<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1		NCL			
			Vero			[321]
			HeLa			
<i>Hall coccus</i>	<i>A. polyphaga</i>		A549			[317, 358]
			HEL			
		<i>A. polyphaga</i> Linc-API	NON bloque l'enkystement			
	<i>A. polyphaga</i>					[358]
	<i>A. castellanii</i> C3			Vero		
				HEp-2		[367]
<i>Bn9</i>	<i>A. polyphaga</i> Linc-API	NON bloque l'enkystement				[305]
				<i>Tetrahymena thermophila</i>	Vero	
			<i>A. castellanii</i> C3	<i>Dictyostelium discoideum</i>	HEp-2	
				Jurkat		
				THP-1		

	croissance			absence de croissance		Réf.
	amibes	Survie dans les kystes	cellules	amibes	cellules	
<i>K-cont</i>	<i>Acanthamoeba comandoni</i> Gr. I			<i>N. lovaniensis</i>		
	<i>A. lenticulata</i> Gr. III 45, 89			<i>Naegleria</i> sp. RJTM		
	<i>Acanthamoeba</i> sp. C3					
	<i>Balamuthia mandrillaris</i> CDC					[369]
	<i>D. Discoideum</i> Berg25					
	<i>H; vermiformis</i> OS101					
	<i>Naegleria</i> sp. N-W2					
	<i>Willaertia magna</i>					
<i>Rhabdochlamydiacea</i>	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010					[332]
	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010					[332]
	<i>A. castellanii</i>					[317]
<i>Protochlamydia naegleriophila</i> (KniC)	<i>Naegleria</i> sp.	NON bloque l'enkystement		<i>Acanthamoeba. astronyxis</i>		
	<i>N. lovaniensis</i>			<i>Acanthamoeba comandoni</i>		
	<i>Willaertia magna</i>			<i>Vahlkampfia ustiana</i>		
	<i>H. vermiformis</i>			<i>Flamella aegyptia</i> sp. n.		
	<i>A. castellanii</i> C3			<i>Commandonia. operculata</i>		[327]
	<i>A. quina-lugdunensis</i>			<i>Phreatamoeba</i> -like amoeba		
	<i>A. lenticulata</i>					
	<i>Vahlkampfia ovis</i>					
<i>Balamuthia mandrillaris</i>						
	<i>D. discoideum</i>					

	croissance			absence de croissance		Ref.
	amibes	Survie dans les kystes	cellules	amibes	cellules	
TUME1	<i>D. discoideum</i>					[235]
	<i>A. castellanii</i> sp.	OUI				[326]
<i>Protochlamydia amoebophila</i> (UWE25)	<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC1					[323, 370]
	<i>D. discoideum</i>					[235, 323]
	<i>Acanthamoeba</i> sp.	OUI				[322]
	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010					[332]
	<i>H. vermiformis</i> A1 HSP	NON				
	<i>H. vermiformis</i> OS101			<i>A. castellanii</i> C3		
	<i>H. vermiformis</i> C3/8			<i>Acanthamoeba</i> sp. HLA		
	<i>D. discoideum</i> Berg25			<i>Acanthamoeba</i> sp. Renk		
<i>Neochlamydia hartmanella</i>				<i>A. quina-lugdunensis</i>		
				<i>A. lenticulata</i> 45,89		[329]
				<i>A. lovaniensis</i>		
				<i>N. gruberi</i>		
				<i>Willaertia magna</i>		
				<i>Acanthamoeba commandoni</i>		
				<i>Commadonia operculata</i>		

	croissance		absence de croissance		Ref.
	amibes	Survie dans les kystes	cellules	amibes	
<i>Waddlia chondrophilla</i>	<i>A. castellanii</i>	OUI	Macrophages		[316, 341]
			HEp-2		[371]
			BT		[333]
			BGM		
			McCoy		[335]
			fibroblaste diploïde humain		
				<i>Acanthamoeba</i> sp.	
				<i>Acanthamoeba</i> HLA	
				<i>N. gruberi</i>	
				<i>N. lovaniensis</i>	
	<i>Acanthamoeba</i> sp. Gr. II HLA*	NON bloque l'enkystement		<i>Acanthamoebae</i> sp. Gr. II C3*	
	<i>N. gruberi</i> CCAP 1518/1e*			<i>A. lenticulata</i> Gr. III 45,72, 89*	
	<i>Vahlkampfia ovis Rhodos</i> *	OUI		<i>Acanthamoeba comandoni</i> Gr I*	[297]
	<i>H. vermiformis</i> OS 101*			<i>N. gruberi</i> Nbeck*	
	<i>H. vermiformis</i> C3/8*	NON bloque l'enkystement		<i>N. lovaniensis</i> *	
	<i>Hyperamoeba-like amoebflagellate</i> *	NON bloque l'enkystement		<i>Willaertia magna</i> *	
	<i>D. discoideum</i> Berg25*			<i>Echinamoeba</i> sp.*	
	<i>D. discoideum</i> So-P2*	NON bloque l'enkystement		<i>Vanella miroides</i> *	
				<i>Commandonia operculata</i> *	
				<i>Balamuthia mandrillaris</i> *	

	croissance			absence de croissance		Ref.
	amibes	Survie dans les kystes	cellules	amibes	cellules	
<i>Waddlia malaysiensis</i>			Vero			
			MRC-5			
			A549			
			HEK			
			Hep-2			[292]
			lignée B-lymphoblastoide			
			LLC-MK2			
			3T3			
<i>Criblamydia sequanensis</i>	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010			<i>H. vermiformis</i> ATCC 50237	Vero	
	<i>A. polyphaga</i> Linc-API			<i>D. discoideum</i> DH1-10	HEL	[224]
					Hep-2	
<i>Estrella lausannensis</i>					A549	
	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010					[332]

	croissance		absence de croissance		Ref.
	amibes	Survie dans les kystes	cellules	amibes	
	<i>A. polyphaga</i> Linc-AP1	OUI			[344]
			Hep-2		[371]
	<i>N. clarkii</i>	NON	BGM	<i>N. gruberi</i>	
			Vero	<i>N. lovaniensis</i>	
	<i>A. castellanii</i> HLA			<i>Naegleria</i> sp.	
				<i>A. castellanii</i> C3	
				<i>H. vermiformis</i>	
	<i>H. vermiformis</i> OS101**			<i>D. discoideum</i> Berg25**	[296]
	<i>Balamuthia mandrillaris</i> **			<i>D. discoideum</i> So-P2**	
				<i>H. vermiformis</i> C3/8**	
				<i>A. lenticulata</i> 45**	
				<i>A. castellanii</i> C3**	
				<i>Willaertia magna</i> **	
				<i>N. lovaniensis</i> **	
			Macrophages U937		[287]
			BEAS-2B		
			NCL-H292		
			HEC-1A		[372]
			HUVEC-C		
			HT-29		

*Simkania negevensis*



<sup>1</sup> : souche de *Parachlamydia* non précisée ;

\* : après une première co-culture sur *H. vermiformis* OS101 ;

\*\* : après une première co-culture sur *A. castellanii* HLA

## **Chapitre II: Problématique et objectifs de la thèse**

Depuis leur découverte dans les années 1930, l'intérêt porté aux amibes et particulièrement aux *Acanthamoebae* n'a cessé de croître. En effet, ces amibes sont passées du statut de contaminant de culture cellulaire [1] à celui de pathogène, d'abord in vitro [2] puis chez l'homme [3, 4]. Ces amibes étant ubiquitaires [5], elles sont présentes dans l'air, la poussière, l'eau... Elles sont également retrouvées dans les réseaux de distribution d'eau potable, et peuvent ainsi être disséminées dans les habitations, les centres de soins... Elles présentent donc un risque pour la santé de part les différentes pathologies qu'elles sont susceptibles d'engendrer: kératite amibienne, encéphalite granulomateuse, amibiase cutanée...

Au fil du temps, leur intérêt en médecine humaine s'est accru car les cas d'infections liés à des amibes se sont multipliés, notamment avec l'essor du port de lentilles de contact [4] et la multiplication du nombre de personnes immunodéprimées. Par ailleurs, en plus de leur pathogénicité intrinsèque, les amibes présentent un risque pour la santé de part leur rôle d'hôte pour d'autres micro-organismes pouvant être eux-aussi pathogènes.

L'un des problèmes majeurs liés aux amibes est leur capacité à résister, sous leur forme libre (trophozoïtes) ainsi que sous leur forme enkystée, aux traitements de décontamination utilisés. En effet, les kystes sont connus pour être difficilement éliminés par les différents biocides aussi bien physiques que chimiques. Une autre difficulté est l'absence de méthode de référence pour l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les amibes. En effet, il est très difficile de comparer les différentes études réalisées dans la mesure où de nombreux critères diffèrent : souches utilisées, méthode de production et âge des kystes, biocides utilisés et temps de contact, méthode de mesure de la viabilité [122-124, 126, 373] (Tableau X)... Ces différents paramètres peuvent entraîner des résultats très variables, ce qui rend difficile les comparaisons entre les différentes études disponibles. De plus, dans la majorité des cas, les études portent sur l'efficacité des traitements de désinfection des lentilles de contact et sur les biocides utilisés pour traiter l'eau potable. Très peu de données sont disponibles concernant les désinfectants de surfaces, de matériel médical... et il n'existe, à ce jour, pas de méthode de référence pour le dénombrement des amibes dans l'eau.

Dans les années 1980, *Legionella pneumophila* a été observée dans les amibes. Suite à des épidémies de Maladie du Légionnaire, des investigations ont mis en évidence l'association entre *L. pneumophila* et les *Acanthamoebae* dans les réseaux d'eau et de nombreuses installations propices au développement des amibes. D'autres investigations ont

permis de montrer que d'autres bactéries sont également capables de proliférer dans les amibes. C'est le cas notamment des nouvelles espèces de *Chlamydiales*.

En effet, ces dernières années, de nouvelles bactéries, apparentées aux *Chlamydiae* ont été décrites. Nommés *Chlamydia-like*, ces micro-organismes suscitent l'intérêt de plusieurs équipes de recherche, notamment par leur mise en évidence dans des interactions avec une grande variété d'amibes. Ces nouveaux micro-organismes semblent être des pathogènes émergents aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Dans la mesure où il s'agit de bactéries souvent isolées des *Acanthamoebae* et pour lesquelles, à ce jour, peu d'informations sont disponibles, nous avons choisi d'étudier leurs interactions avec les amibes du genre *Acanthamoeba*. Nous nous sommes également intéressés à l'une des *Chlamydiales* les plus connues : *Chlamydia trachomatis*, afin d'avoir des éléments de comparaison pour l'étude de ces *Chlamydia-like*.

Ces dernières années, de nouvelles espèces apparentées aux *Chlamydiae* ont été isolées. Ces *Chlamydiae* se sont avérées présenter une grande diversité, plusieurs nouvelles familles ont été découvertes. En 1990, un organisme apparenté aux *Chlamydiae* a été isolé d'un fœtus bovin avorté, nommé *Waddlia*, il a mené à la création d'une nouvelle famille : les *Waddliaceae*. Puis en 1993, des bactéries possédant un cycle vital semblable au cycle de développement des *Chlamydiae* ont été découvertes. Ces bactéries nommées *Simkania negevensis* ont été classées dans la famille des *Simkaniaceae*. Enfin, en 1994, des endosymbiontes d'amibes libres avec des stades de développement et une homologie de séquence de l'ARN ribosomique 16S aux *Chlamydiales*, ont été découverts. Ces bactéries ont été nommées *Parachlamydia*. Toutes ces nouvelles bactéries ont été regroupées sous le nom de *Chlamydia-like*. Leur capacité à se multiplier dans les amibes laisse à penser que ces bactéries pourraient être résistantes à d'autres cellules phagocytaires comme les macrophages et pourraient donc être responsables d'infections. Au fil du temps, cette hypothèse s'est vérifiée. A ce jour, les *Chlamydia-like* sont reconnues comme potentiellement responsables de diverses infections aussi bien humaines que vétérinaires. En effet, les *Parachlamydiaceae* semblent impliquées dans des infections respiratoires : pneumopathie, bronchite... mais pourraient aussi être responsables d'avortements spontanés chez les bovins. Les *Waddliaceae* semblent également impliquées dans des avortements spontanés bovins, voire également humains. Quant aux *Simkaniaceae*, elles semblent responsables d'infections respiratoires telles que des pneumopathies communautaires ou encore des bronchiolites chez les

nourrissons. Il est également possible qu'au fil du temps ces bactéries soient reliées à de nouvelles infections, en effet, il s'agit de micro-organismes difficiles à isoler. Le plus souvent leur présence est détectée par PCR. De plus ces *Chlamydia*-like ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces: mammifères, marsupiaux, amphibiens, oiseaux, reptiles, poissons, insectes, crustacés, mollusques ou encore protozoaires, elles semblent donc capables d'infecter tout le règne animal. A ce jour, assez peu de données sont disponibles concernant la résistance aux biocides ainsi que la survie de ces bactéries.

De plus, récemment une souche de *C. trachomatis* a été isolée lors d'une campagne de prélèvements sur des patients atteints de kératite amibienne. Un patient était porteur d'une *Acanthamoeba* contenant pour endosymbionte une *Chlamydiaceae* très proche de *C. trachomatis* [301]. Cette découverte pourrait impliquer les *Acanthamoebae* dans le développement et la dissémination de *C. trachomatis* qui est un pathogène bien connu et responsable de nombreuses infections oculaires et génitales.

Cette étude expérimentale est donc organisée en deux parties afin de répondre aux différentes questions suscitées par ce sujet.

- Première partie : Test de la résistance des *Acanthamoebae* aux traitements de décontamination

Nous avons étudié la résistance des *Acanthamoebae* à différents traitements de désinfection de surfaces et de matériel médical. Pour ce faire, nous avons sélectionné des souches de référence mais également des souches isolées de l'environnement afin de déterminer l'influence du choix de la souche dans ces résultats. La résistance de ces amibes a été évaluée aussi bien sur leur forme libre (trophozoïte) que sur leur forme enkystée. Compte tenu de la diversité des méthodes d'enkystement observées dans la littérature et en l'absence de méthode de référence, nous avons testé la résistance à différents biocides pour différentes méthodes d'enkystement afin d'étudier l'influence de ce paramètre. Nous avons également essayé d'expliquer les différences de profil de résistance observées.

- Deuxième partie : Etude de la résistance aux traitements de désinfection des *Chlamydia*-like et de *C. trachomatis*, de leur survie et de leurs interactions avec les *Acanthamoebae*.

Nous nous sommes également intéressés aux *Chlamydia*-like. Dans un premier temps, nous avons déterminé leur spectre d'hôte sur différentes souches d'amibes ainsi que différentes lignées cellulaires. Par la suite, nous avons testé la résistance aux biocides de ces différents micro-organismes mais aussi leur survie aussi bien sur surface qu'en milieu liquide, dans différentes conditions. Nous avons également étudié la survie de ces bactéries dans les kystes d'amibes.

Notre travail a aussi porté sur l'étude de *C. trachomatis*, sa croissance dans les *Acanthamoebae*, mais aussi sa survie dans les mêmes conditions expérimentales que pour les *Chlamydia*-like, ou encore sa résistance aux biocides, fournissant ainsi une référence pour l'étude des *Chlamydia*-like.

## **Chapitre III : La résistance aux biocides des *Acanthamoebae***

## 1<sup>ère</sup> Publication

Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings.  
Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V.  
J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2689-97. Epub 2010 Jun 2.

### Résumé de la première publication:

Les amibes libres du genre *Acanthamoeba* sont très largement répandues dans l'environnement, et particulièrement dans l'eau. Elles sont responsables de plusieurs infections chez l'homme et peuvent également servir d'hôte pour des micro-organismes pathogènes. En cas de conditions environnementales défavorables, les amibes sont capables de s'enkyster, présentant alors des niveaux de résistance beaucoup plus importants aux méthodes de désinfection. Cet enkystement peut alors devenir un problème de santé publique.

Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité de différents biocides sur les trophozoïtes et les kystes de différentes souches d'*Acanthamoeba*.

Nous avons montré que l'efficacité d'un désinfectant varie en fonction de la souche testée, en effet, les souches environnementales ont montré une résistance supérieure aux souches de collection. Les trophozoïtes sont inactivés par tous les traitements excepté ceux ayant la glutaraldéhyde pour principe actif, même après 30 minutes d'exposition. Les kystes sont quant à eux, résistants à de nombreux traitements. Une température de 55°C est insuffisante pour inactiver les kystes, un traitement à 65°C est nécessaire pour être efficace. Les formulations à base d'acide péracétique, de peroxyde d'hydrogène ou encore d'orthophtalaldéhyde se sont avérées plus efficaces que celles à base de glutaraldéhyde. L'éthanol ainsi que l'hypochlorite de sodium donnent également de bons résultats. Néanmoins, certains de ces traitements nécessitent un temps de contact important afin de permettre l'inactivation des kystes. Les kystes amibiens peuvent être très résistants notamment à des désinfectants couramment utilisés et réputés très efficaces, ce qui peut poser des problèmes en clinique.

Ces résultats montrent l'importance de considérer aussi bien les formes végétatives que les formes de résistance lors de la désinfection des protozoaires. C'est important non seulement pour éviter des contaminations par les protozoaires eux-mêmes mais aussi compte tenu du risque associé aux micro-organismes intracellulaires qu'ils peuvent héberger.



## Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings<sup>▽</sup>

Céline Coulon,<sup>1,2</sup> Anne Collignon,<sup>2</sup> Gerald McDonnell,<sup>3</sup> and Vincent Thomas<sup>1\*</sup>

STERIS SA R&D, Fontenay-aux-Roses, France<sup>1</sup>; Université de Paris-Sud XI, Faculté de Pharmacie, Département de Microbiologie, Châtenay-Malabry, France<sup>2</sup>; and STERIS Ltd., Basingstoke, United Kingdom

Received 16 February 2010/Returned for modification 14 May 2010/Accepted 21 May 2010

Free-living amoebae that belong to the genus *Acanthamoeba* are widespread in the environment, including water. They are responsible for human infections and can host pathogenic microorganisms. Under unfavorable conditions, they form cysts with high levels of resistance to disinfection methods, thus potentially representing a threat to public health. In the present study we evaluated the efficacies of various biocides against trophozoites and cysts of several *Acanthamoeba* strains. We demonstrated that disinfectant efficacy varied depending on the strains tested, with environmental strains demonstrating greater resistance than collection strains. Trophozoites were inactivated by all treatments except those using glutaraldehyde as an active compound: for these treatments, we observed resistance even after 30 min exposure. Cysts resisted many treatments, including certain conditions with glutaraldehyde and other biocides. Moist heat at 55°C was not efficient against cysts, whereas exposure at 65°C was. Several chemical formulations containing peracetic acid, hydrogen peroxide, or *ortho*-phthalaldehyde presented greater efficacy than glutaraldehyde, as did ethanol and sodium hypochlorite; however, some of these treatments required relatively long incubation times to achieve cyst inactivation. Amoebal cysts can be highly resistant to some high-level disinfectants, which has implications for clinical practice. These results highlight the need to consider the effective disinfection of protozoa in their vegetative and resistant forms due to their intrinsic resistance. This is important not only to prevent the transmission of protozoa themselves but also due to the risks associated with a range of microbial pathogens that are found to be associated intracellularly with these microorganisms.

Free-living amoebae (FLA) are among the most prevalent protozoa found in the environment, being isolated from soil, air, and water, as well as from dust, sewage, and sediments (43). They can colonize water systems and have been isolated from drinking water plants (24, 57), hospital water networks (44, 56), domestic water networks (30), and cooling towers (3), to name but a few. Among FLA, *Acanthamoeba* species are, to date, the most frequently encountered in human infections. The life cycle of *Acanthamoeba* can be considered in two stages. During the first stage, the vegetative trophozoite form is feeding and replicating. The second stage develops not only under unfavorable environmental conditions, such as nutrient starvation, heat, cold, and desiccation, but also in the presence of elevated concentration of various chemical compounds, with the trophozoites differentiating into cysts (13, 40). During the encystment phase, amoebae become round and form two distinct layers: the endocyst, containing cellulose, and the ectocyst, containing various polysaccharides and proteins (27, 34). Cysts are metabolically inactive and can remain viable for more than 20 years under dry conditions (51) and 24 years at 4°C in water (38).

The most frequent infection associated with *Acanthamoeba* spp. is amoebic keratitis (AK), first described in 1974 (39). This is a particularly difficult to treat ocular infection that leads to trauma and corneal necrosis. The reports of AK have dramatically increased in parallel with the use of contact lenses, with incidence rates of 0.15 per million population in the United

States and 1.4 per million population in the United Kingdom being reported (17). In a 2009 study, *Acanthamoeba* spp. were also encountered in the urine of critically ill patients in intensive care units, suggesting that FLA might play a role in hospital-acquired infections by facilitating transmission of bacteria to the patients (45). In fact, in addition to their intrinsic pathogenicity, *Acanthamoeba* can potentially harbor various bacterial, viral, and eukaryotic species pathogenic for human and animals (22). Thus, among 539 bacterial species listed as being pathogenic for humans and/or animals, 102 (including *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Legionella*, various mycobacteria, *Pseudomonas*, and *Serratia* spp.) were described in the literature as being able to resist and potentially proliferate after amoebal ingestion (59). Survival of bacteria within amoebal cysts has been demonstrated for several of these species, mainly mycobacteria (1), and cysts are thus considered potential reservoirs of pathogens in water networks.

Despite increasing health concerns over FLA, there is still a paucity of information concerning their resistance to various biocides and disinfectants. Trophozoites are considered relatively sensitive to most chemicals, but cysts have been shown to be more resistant. It has been reported in several studies that they can resist exposure to biguanides, quaternary ammonium compounds, chlorine, chlorine dioxide, and hydrogen peroxide (59). They have high levels of resistance to radiation, such as UV, X-ray, and gamma irradiation, but limited resistance to high temperatures (59). There is no official standard available to test the activities of disinfectant against amoebae. Amoebal strains, the media used to grow and encyst trophozoites, and the exposure and neutralization conditions, as well as methods to evaluate residual viability after treatments, vary from one

\* Corresponding author. STERIS SA R&D, 18, Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. Phone: 33-146548557. Fax: 33-146549843. E-mail: vincent\_thomas@steris.com.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on 2 June 2010.

TABLE 1. Unformulated and formulated active compounds tested in this study and contact times used for cyst exposures

Biocide	Final concn(s) of active compound	pH of solution <sup>a</sup>	Contact time(s) (min)
Unformulated biocides			
Sodium hypochlorite	2,500 and 25,000 ppm	11.3 and 12.1	10, 20, and 30
Ethanol	70%	6.2	10
Glutaraldehyde	2%	8.0 (adjusted pH)	10
Hydrogen peroxide	7.5%	3.4	10, 20, and 30
<i>ortho</i> -Phthalaldehyde			
Peracetic acid	0.55%	6.5 (adjusted pH)	10
	0.2%	2.7	10
Formulated biocides			
Glutaraldehyde-based product	2% glutaraldehyde	5.6	10, 20, and 30
<i>ortho</i> -phthalaldehyde-based product	0.55% OPA	7.5	10, 20, and 30
PAA-based product STERIS-20	0.2% PAA	6.2	10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -based product Resert HLD	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.3	10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /PAA-based product Sporklenz RTU	1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0.08% PAA	1.9	10, 20, and 30
Heat			
55°C		7.2	10
65°C		7.2	10

<sup>a</sup> Measured at 21°C.

study to another and might thus be responsible for the observed discrepancies (2, 12). Furthermore, there are few data available, if there are any data at all, on the activities of the various chemicals used for surface and medical device disinfection in health care settings, such as alcohols, aldehyde-based products, peracetic acid (PAA)-based products, and hydrogen peroxide-based products.

In the present work, we compared the efficacies of various disinfection treatments used in health care settings, including widely used high-level disinfectants, against reference and field isolate strains of *Acanthamoeba*.

#### MATERIALS AND METHODS

**Amoebal strains.** Nine different strains were tested: *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 and CCAP 1501/10, *Acanthamoeba polyphaga* CCAP 1501/18, and six environmental strains previously isolated from a hospital water network (56) and from Seine River water (57). All amoebal strains were grown in peptone yeast glucose (PYG) medium in tissue culture flasks at 28°C as described previously (60).

**Further characterization of environmental amoebal strains.** Trophozoites were recovered from the PYG medium flasks and washed in phosphate-buffered saline. DNA was extracted using a Pure Link genomic minikit (Invitrogen), including digestion with lysozyme (20 mg/ml) for 30 min at 37°C and with proteinase K (20 mg/ml) for 2 h at 55°C. The diagnostic fragment DF3 was amplified using previously described primers JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') and JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3') (9). Sequencing was performed using primers JDP1 and JDP2, as well as internal primers 892CF (5'-GTCAGAGGTGAAATCTTGG-3') and 892CR (5'-CCAAGAATTCACCTCTGAC-3') (47).

Environmental *Acanthamoeba* strains were also screened for the presence of intracellular bacteria by performing PCR with DNA extracted from amoebae using universal primers FD1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and RP2 (5'-ACGGTACCTTGTACGACTT-3'), targeting the bacterial 16S rRNA gene (61).

**Encystment.** Cysts were prepared from trophozoites using Neff's encystment medium (0.1 M KCl, 0.02 M Tris, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaHCO<sub>3</sub>). Briefly, adhering trophozoites were suspended in PYG medium in cell culture flasks, harvested by centrifugation at 2,700 × g for 10 min, and washed in encystment medium. Approximately 5 × 10<sup>7</sup> trophozoites were then added to 25 ml of encystment medium in a 150-cm<sup>2</sup> culture flask and incubated at 33°C for 7 days. Cysts were then recovered from the flask, suspended for 5 min in sterile distilled water with 0.5% SDS to lyse nonmature cysts and dissociate

aggregates, and then washed two times in 1/4-strength Ringer's solution and stored at 4°C for testing within 15 days.

**Decontamination tests. (i) Trophozoites.** Confluent cell monolayers were harvested from the culture flasks and resuspended in 1/4-strength Ringer broth, with the cell concentrations adjusted to 10<sup>7</sup> to 10<sup>8</sup> cells/ml. Trophozoites were then diluted 1/10 in the products to be tested or in Page amoeba saline (PAS) for the controls. The disinfectants tested included various diluted biocides as well as formulated biocides, as their activities vary significantly. We tested various oxidizing biocides based on acids (hydrogen peroxide or peracetic acid) or chlorine (sodium hypochlorite), as well as fixative biocides based on various aldehydes and ethanol (Table 1). Once they were diluted in the disinfectants, trophozoites were incubated for 5 min (all products except glutaraldehyde and a glutaraldehyde-based product) to 25 min (glutaraldehyde and a glutaraldehyde-based product) at room temperature. They were then recovered by centrifugation at 2,700 × g for 5 min, resuspended in Dey-Engley (D/E) neutralizing broth (with 0.2% catalase for hydrogen-peroxide-based products) for 5 min, and vortexed at maximum speed for 30 s. After another centrifugation step at 2,700 × g for 5 min, trophozoites were resuspended in 1/4-strength Ringer broth and serially diluted in PYG medium in 48-well plates (6 wells per dilution). The plates were incubated for 21 days at 28°C, with the wells being regularly observed for trophozoite growth; log<sub>10</sub> reductions were calculated using the Spearman-Kärber method. Each test was performed at least four times.

**(ii) Cysts.** Cysts were adjusted at 10<sup>7</sup> to 10<sup>8</sup> cysts/ml in 1/4-strength Ringer broth. Suspensions were diluted 1/10 in the product to be tested (PAS for controls) and incubated for 5, 15, or 25 min at the appropriate temperature (Table 1). They were then recovered by centrifugation at 12,000 × g for 5 min, resuspended in D/E neutralizing broth plus 0.5% SDS for 5 min, and vortexed at maximum speed for 30 s. After another centrifugation step at 12,000 × g, cysts were resuspended in 1/4-strength Ringer broth and serially diluted on a nickel-nitritoltri-acetic acid-*Escherichia coli* ATCC 25922 lawn in 48-well plates (6 wells per dilution). After 7 days of incubation at 28°C, the wells were observed for trophozoite growth and the log<sub>10</sub> reductions were calculated using the Spearman-Kärber method.

**Aggregation tests.** Cysts were observed at the end of the 7 days of incubation in Neff's medium to evaluate their capacity to form aggregates. The same cysts were directly examined after treatment with 0.5% SDS to confirm the dissociation of aggregates. Any effects of treatments on aggregation of SDS-treated cysts were monitored after incubation of cysts in 24-well plates in the presence of products for various times: (i) 10 min for 2.5% sodium hypochlorite, 70% ethanol, 2% glutaraldehyde, 0.55% *ortho*-phthalaldehyde (OPA), 0.2% peracetic acid (PAA), an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based product (Resert HLD; STERIS Corporation, St. Louis, MO), and a PAA-based product (STERIS-20; STERIS Corporation, Mentor, OH); (ii) 30 min for 0.25% sodium hypochlorite, a glutaraldehyde-based product, an OPA-based product, 7.5% hydrogen peroxide, and a further hydrogen peroxide/peracetic acid-based product (Sporklenz RTU; STERIS Corporation, St. Louis, MO).

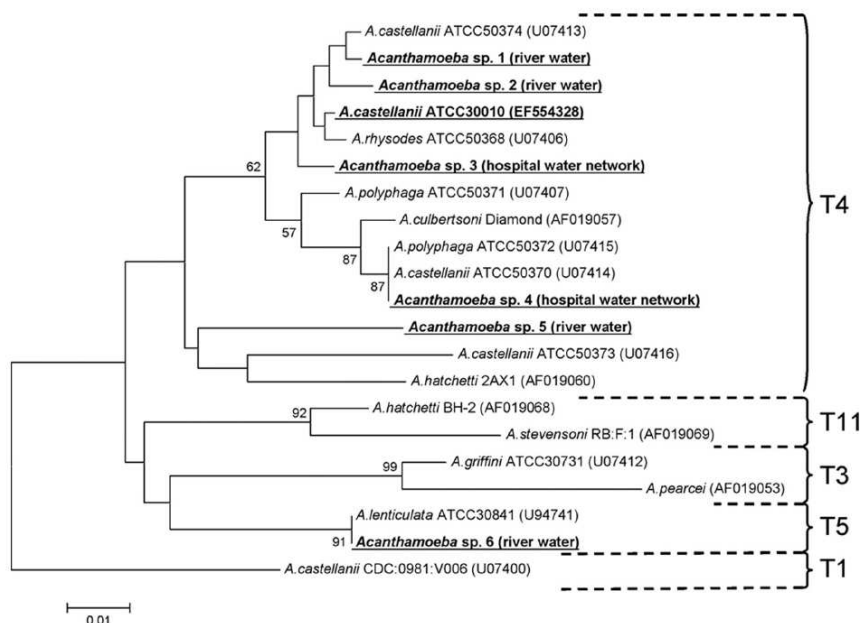


FIG. 1. Phylogenetic tree showing the relationship of FLA isolates used in disinfection tests. DF3 fragment sequences were aligned using Muscle software (19), and the tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values resulting from 2,000 replications are presented at each node when the value was >50%.

**TEM.** Cysts obtained after incubation of amoebal strains 1, 3, and 4 and *Acanthamoeba polyphaga* CCAP 1501/18 in Neff's medium were prepared for observation by transmission electron microscopy (TEM). The samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 night, postfixed for 1 h in 0.1 M cacodylate buffer-1% OsO<sub>4</sub> for 1 night, stained with uranyl acetate (0.25%) for 1 night, dehydrated, and embedded in epoxy resin. Thin sections (50 to 60 nm) were stained with uranyl acetate (5 min) and lead citrate (5 min), being then examined with a Philips EM 208 electron microscope. A minimum of 100 measurements were taken to evaluate the thickness of the ectocysts for each of the four isolates.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using one-way analysis to compare the thickness of amoebal cysts or a Fisher's exact test to compare the numbers of wells positive for each isolate and each treatment. Statistical significance was set at an alpha level of 0.05.

**Nucleotide sequence accession numbers.** Partial 18S rRNA gene sequences corresponding to the DF3 fragment of environmental strains were deposited in GenBank under accession numbers GU459317 to GU459322.

## RESULTS

**Further characterization of environmental amoebal strains.** Partial sequencing of the 18S rRNA gene allowed classification of most isolates in the genotype T4 group (Fig. 1). Only one

isolate was classified under the T5 genotype, being identified as *Acanthamoeba lenticulata* after sequencing of the 18S rRNA intron specific to this species (data not shown). Interestingly, we were not able to amplify any DNA with 16S ribosomal DNA (rDNA) universal primers, suggesting that all environmental isolates were free of bacteria.

**Disinfection tests. (i) Trophozoites.** All products tested against trophozoites except 2% neat glutaraldehyde and a glutaraldehyde-based disinfectant formulation achieved complete kill for all strains after 10-min exposures. For the two glutaraldehyde treatments, no morphological modifications were observed after the treatment and the cells could still adhere to the bottom of the wells when the plates were seeded in PYG medium to count the survivors. The calculated log<sub>10</sub> reductions were very similar after 30-min exposures to glutaraldehyde alone or in formulation and varied from approximately 1 log<sub>10</sub> unit for strain 3 to 4.5 log<sub>10</sub> units for *A. castellanii* CCAP 1501/10 (Table 2).

TABLE 2. Biocidal effects of glutaraldehyde alone or in formulation against trophozoites of nine *Acanthamoeba* strains

Biocide <sup>a</sup>	Log <sub>10</sub> reduction								
	<i>Acanthamoeba</i> environmental isolates						<i>A. castellanii</i> CCAP 1501/10	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010	<i>A. polyphaga</i> CCAP 1501/18
	1 (river water)	2 (river water)	3 (hospital)	4 (hospital)	5 (river water)	6 (river water)			
Glutaraldehyde, 2%	4.1 ± 0.2	1.9 ± 0.8	0.9 ± 0.7	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.3	3.3 ± 0.2	4.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.4
Glutaraldehyde-based product	4.1 ± 0.2	1.8 ± 0.6	1.0 ± 0.7	2.2 ± 0.2	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.0	4.5 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.3

<sup>a</sup> The contact time was 30 min for each biocide.



(ii) **Cysts.** Table 3 summarizes the efficacies of all biocides tested against cysts of the nine *Acanthamoeba* strains. As some formulated biocides tested in this study have recommended-use temperatures of  $>50^{\circ}\text{C}$ , tests investigated the effect of elevated temperatures on cyst viability. Exposure at  $55^{\circ}\text{C}$  for 10 min was completely inefficient ( $\leq 1\text{-log}_{10}$ -unit reduction for all strains), whereas exposure at  $65^{\circ}\text{C}$  for 10 min was completely efficient ( $>4\text{-log}_{10}$ -unit reduction for all strains).

With the chemical biocides tested, variability in strain resistance profiles was observed. With 10-min exposures, all strains resisted at least 2 of 12 chemical biocides ( $<4\text{-log}_{10}$ -unit reduction of viable cysts), and the cysts of the most resistant strain (strain 4;  $P < 0.05$ ) resisted exposure to 8 of 12 treatments. Sodium hypochlorite at 2.5% achieved complete kill of all tested strains. A PAA-based product (at the associated exposure temperature of  $55^{\circ}\text{C}$ , as recommended by the manufacturer) and one hydrogen peroxide-based product (Resert HLD at room temperature) demonstrated a  $>4\text{-log}_{10}$ -unit reduction. Efficacy was observed with ethanol 70% ( $>4\text{-log}_{10}$ -unit reduction for all strains except strains 3 and 4, for which only 2.8- and  $3.5\text{-log}_{10}$ -unit reductions were achieved) and *ortho*-phthalaldehyde alone ( $>4\text{-log}_{10}$ -unit reductions for all strains except strain 3 [ $3.7\text{-log}_{10}$ -unit reduction] and strain 4 [ $1.1\text{-log}_{10}$ -unit]). A further hydrogen peroxide/peracetic acid-based product (Sporklenz RTU) was effective against six of the nine tested strains after a 10-min exposure, with the other three strains presenting moderate resistance (strain 2,  $3.6\text{-log}_{10}$ -unit reduction; strain 3,  $1.6\text{-log}_{10}$ -unit reduction; strain 4,  $1.7\text{-log}_{10}$ -unit reduction) and being inactivated after 20 min exposure (except for strain 4, for which the reduction was  $>4\text{-log}_{10}$  units with few survivors but complete inactivation after 30 min). Three strains presented moderate to high levels of resistance to 10 min exposure to PAA alone at room temperature: 0.2- to  $2.1\text{-log}_{10}$ -unit reductions for strains 2 and 4 and *A. castellanii* ATCC 30010. Sodium hypochlorite (0.25%) and an OPA-based product were moderately efficient at 10-min exposures, with greater efficacy at 20 min for seven of nine strains being noted; 30-min exposures were required to achieve the complete kill of strains 3 and 4 with the OPA-based product, whereas strain 3 resisted 30 min exposure to 0.25% sodium hypochlorite. Glutaraldehyde (2%) alone or in formulation had little efficacy, with five of the nine tested strains resisting 30-min exposures to the glutaraldehyde-based product (0.9- to  $2.8\text{-log}_{10}$ -unit reductions).

**Aggregation tests.** *Acanthamoeba castellanii* strains ATCC 30010 and CCAP 1501/10, *Acanthamoeba polyphaga* strain CCAP 1501/18, and environmental isolates *Acanthamoeba* sp. strains 1 and 4 formed large aggregates during encystment in Neff's medium (Fig. 2). These aggregates were dissociated after treatment with 0.5% SDS for 5 min (Fig. 2). Several treatments induced aggregation, but it was limited only to several strains (Fig. 2); some of these treatments were still efficient at killing cysts (such as the hydrogen peroxide-based products, sodium hypochlorite, and ethanol), whereas others (PAA and hydrogen peroxide alone and a glutaraldehyde-based product) were not (Table 3).

**Transmission electron microscopy.** The measured thicknesses of the ectocysts were  $0.4 \pm 0.1\ \mu\text{m}$  for strains 1 and 4,  $0.6 \pm 0.3\ \mu\text{m}$  for strain 3, and  $0.3 \pm 0.1\ \mu\text{m}$  for *A. polyphaga* CCAP 1501/18 (Fig. 3). Statistical analysis demonstrated that

the ectocysts of strain 3 (Fig. 3B) were significantly thicker than the ectocysts of the three other strains and that the ectocysts of strains 1 and 4 (Fig. 3A and C) were significantly thicker than the ectocysts of *A. polyphaga* CCAP 1501/18 (Fig. 3D).

## DISCUSSION

Free-living amoebae that belong to the *Acanthamoeba* genus represent a potential threat to human health due to not only their intrinsic pathogenicity (37) but also their role as protective and disseminating hosts for other pathogenic microorganisms (59). Due to their capacity to resist chemical and physical treatments used for drinking water production and distribution (36, 55, 57), they can colonize virtually any artificial water system. They are also widely distributed in moist areas, air, and dust (14, 42, 44). Despite increasing health concerns caused by these organisms, there is still a paucity of information concerning their inactivation by various physical and chemical biocides (59). In the present study we were mainly interested in testing the trophocidal and cysticidal activities of several chemical biocides used in health care settings to decontaminate medical instruments and surfaces. The amoebal strains tested included recent environmental isolates and culture collection strains. Characterization of six environmental strains using the 18S rDNA diagnostic fragment DF3 demonstrated that five of them belong to the genotype T4 group, which is also the group to which most isolates associated with keratitis and nonkeratitis infections belong (10, 33, 46). The other strain was identified as *A. lenticulata*, a species that belongs to the genotype T5 group. This species has rarely been associated with keratitis (50), with disseminated infection in an immunocompromised individual (5) and with acute granulomatous encephalitis in an immunocompetent individual (32) being noted. We also included collection strains in this representative set since it has been demonstrated that amoebae present markedly different properties after long-term axenic culture and have a decreased ability to encyst synchronously and a reduced temperature tolerance (31, 41).

Resistance of trophozoites to glutaraldehyde has already been documented with *A. polyphaga* strain Linc-Ap1 (21), which is identical to strain CCAP 1501/18 that was used in our study. The authors used trypan blue viability staining to demonstrate that a 2% glutaraldehyde-based product was not effective at killing trophozoites even after 3 h of exposure and that it actually induced encystment (21). We arrived at a similar conclusion using a different method to measure residual viability; however, the relatively shorter exposures did not allow demonstration of encystment. Aggregation tests with cysts did not reveal trophozoite aggregation induced by glutaraldehyde alone or in formulation (data not shown). Environmental isolates that belong to the T4 group presented significantly ( $P < 0.05$ ) higher levels of resistance than collection strains that belong to the same group, except strain 1. Surprisingly, we observed better efficacy of glutaraldehyde against cysts than against trophozoites for strains 1, 4, and 5; *A. castellanii* ATCC 30010; and *A. polyphaga* CCAP 1501/18 ( $P < 0.05$ ). A possible explanation is that cross-linking of cyst external structures impairs deencystment even if the amoebae remain viable; alternatively, the cyst structure may be more sensitive to the activity

TABLE 3. Cysticidal effects of bioicidal treatments, including unformulated active compounds, active compounds in formulation, and moist heat, against cysts of nine *Acanthamoeba* strains

Biocide	Contact time (min)	<i>Acanthamoeba</i> environmental isolates						Log <sub>10</sub> reduction		
		1 (river water)	2 (river water)	3 (hospital)	4 (hospital)	5 (river water)	6 (river water)	<i>A. castellanii</i> CCAP 1501/10	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010	<i>A. polyphaga</i> CCAP 1501/18
55°C	10 min	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1
65°C	10 min	>4.7	>4.8	>4.7	>4.7	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
Sodium hypochlorite, 2.5%	10 min	>4.7	>4.8	>4.7	>4.7	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
Sodium hypochlorite, 0.25%	10 min	2.9 ± 0.1	3.5 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	>4.1	>5.1	2.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2
Sodium hypochlorite, 0.25%	20 min	>4.7	>4.8	1.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	>4.8	ND <sup>a</sup>	ND	>4.7	>4.5
Sodium hypochlorite, 0.25%	30 min	ND	ND	2.6 ± 0.2	>4.7	ND	ND	ND	ND	ND
Ethanol 70%	10 min	>4.7	>4.8	2.8 ± 0.1	4.3 ± 0.3	3.5 ± 0.2	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
Glutaraldehyde 2%	10 min	1.6 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.1	1.1 ± 0.6	4.6 ± 0.1	>4.1	2.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.3
Glutaraldehyde-based product	10 min	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.8	0.5 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.8 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1
Glutaraldehyde-based product	20 min	3.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.1	>4.5
Glutaraldehyde-based product	30 min	>4.7	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	>4.7	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.8 ± 0.1	>4.7	ND
OPA, 0.55%	10 min	>4.7	>4.8	3.7 ± 0.2	1.1 ± 0.3	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
OPA-based product	10 min	2.8 ± 0.2	3.8 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1	4.6 ± 0.0	>4.1	3.0 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1
OPA-based product	20 min	>4.7	>4.8	2.9 ± 0.1	3.7 ± 0.1	ND	ND	>5.1	>4.7	>4.5
OPA-based product	30 min	ND	ND	>4.7	>4.7	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrogen peroxide, 7.5%	10 min	1.1 ± 0.5	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.3	2.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.6	0.4 ± 0.3	2.5 ± 0.4
Hydrogen peroxide, 7.5%	20 min	3.3 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2	>4.8	>4.1	2.7 ± 0.2	2.2 ± 0.1	>4.5
Hydrogen peroxide, 7.5%	30 min	3.8 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2	ND	ND	3.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2	ND
Hydrogen peroxide-based Resert HLD	10 min	>4.7	>4.8	>4.7	4.3 ± 0.4	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /PAA-based SportKlenz RTU	10 min	>4.7	3.6 ± 0.5	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.8	4.1 ± 0.2	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /PAA-based SportKlenz RTU	20 min	ND	>4.8	>4.7	4.1 ± 0.8	ND	ND	ND	ND	ND
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /PAA-based SportKlenz RTU	30 min	ND	ND	ND	>4.5	ND	ND	ND	ND	ND
PAA, 0.2%	10 min	>4.7	0.9 ± 0.3	>4.7	0.2 ± 0.2	>4.8	>4.1	>5.1	2.1 ± 0.5	>4.5
PAA-based STERIS-20	10 min	>4.7	>4.8	>4.7	4.0 ± 0.2	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5

<sup>a</sup> ND, not done.

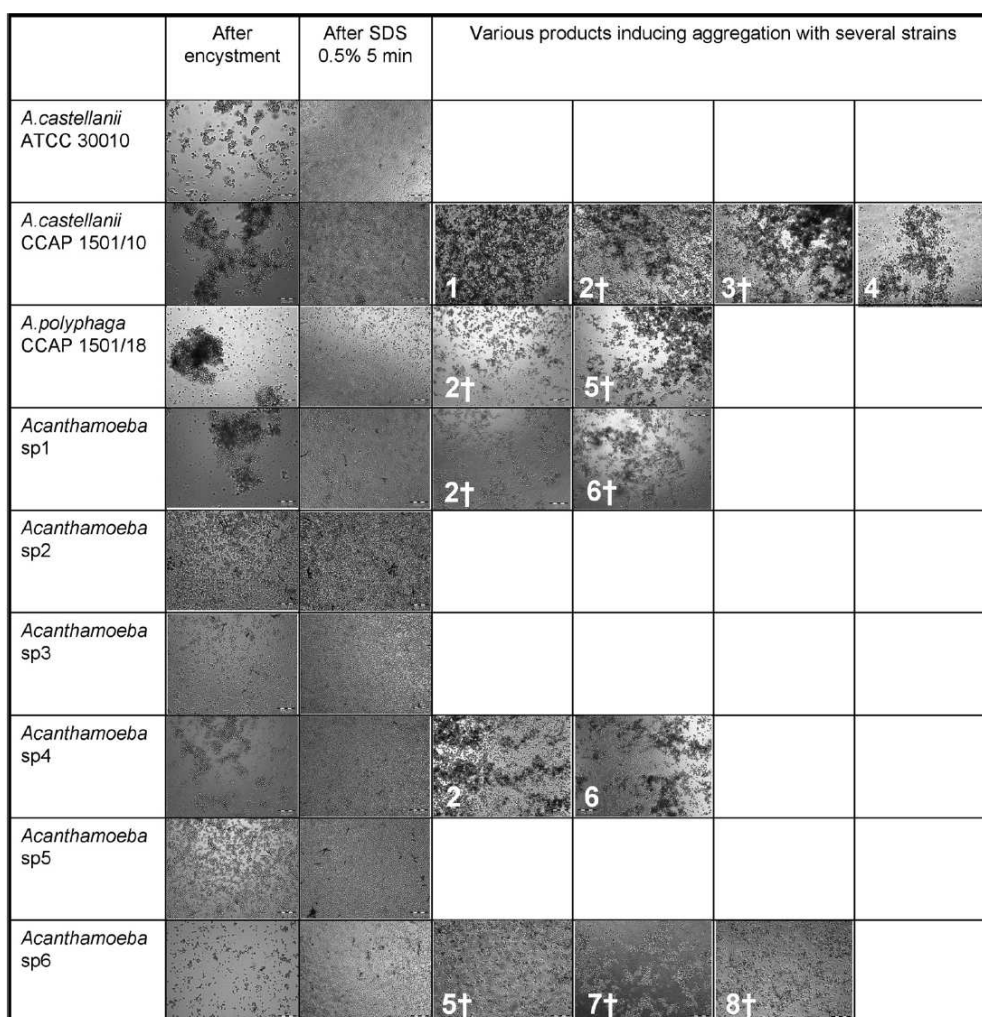


FIG. 2. Self-aggregation of cysts and treatment-induced aggregation of cysts. Cysts were observed after 7 days of incubation in Neff's medium, after treatment with 0.5% SDS for 5 min, and after treatment with various biocides for various contact times (only treatments that induced visible aggregation are reported). 1, 7.5% hydrogen peroxide for 30 min; 2, hydrogen peroxide-based product Resert XL-HLD for 10 min; 3, hydrogen peroxide/peracetic acid-based product Sporklenz RTU for 10 min; 4, 2% glutaraldehyde-based product for 30 min; 5, 70% ethanol for 10 min; 6, 0.2% peracetic acid for 10 min; 7, 0.25% sodium hypochlorite for 10 min; 8, 2.5% sodium hypochlorite for 10 min; †, no growth observed after treatment. Magnification,  $\times 100$ .

of this biocide. Viability staining of cysts treated with glutaraldehyde might be useful to understand these effects. Resistance of *Acanthamoeba* trophozoites to glutaraldehyde raises important questions about the potential association of glutaraldehyde-resistant *Acanthamoeba* with nontuberculous mycobacteria (NTM) that can also resist glutaraldehyde and grow within amoebae (18, 23, 58). It has been demonstrated that the resistance of NTM to glutaraldehyde is at least partially due to mutations in cell wall porins and that these mutations also increase the resistance of NTM to antibiotics commonly used to treat these infections (53). Furthermore, mutations in the same genes also increase the intra-amoebal survival capacity of NTM (49). In a critical scenario, glutaraldehyde could thus

select for NTM strains that are resistant to antibiotics and that can multiply within *Acanthamoeba* trophozoites that also resist exposure to glutaraldehyde.

Previously described quantitative kill assays were used as references for the cyst inactivation assay used in this study (7, 29; see [www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/UCM130752.ppt](http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/UCM130752.ppt)). Neff's encystment medium was chosen since it allows recovery of high numbers of cysts and it may better represent the conditions encountered by amoebae in water networks than other conditions used to produce cysts (25). SDS (0.5%) was used after encystment to kill immature cysts and dissociate aggregates (35), although these aggregates may need to be further considered, as they

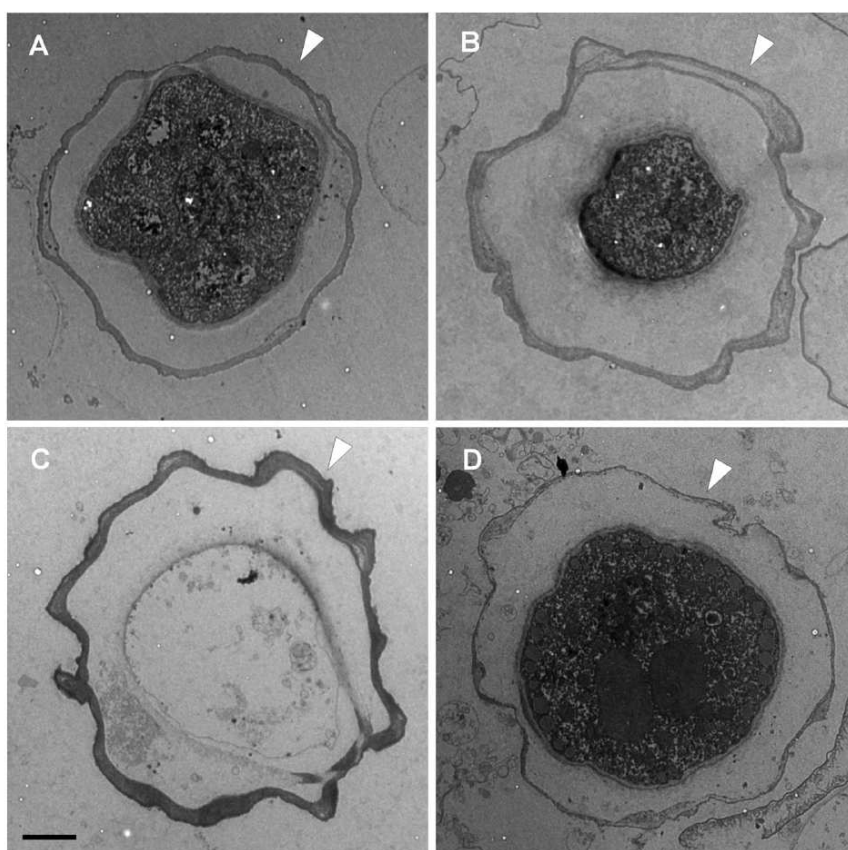


FIG. 3. Cysts obtained from strains 1 (A), 3 (B), and 4 (C) and *A. polyphaga* strain CCAP 1501/18 (D). Arrows indicate ectocyst walls. Bar, 2  $\mu$ m.

likely exist naturally in the environment. D/E broth was confirmed to adequately neutralize the various biocides and has been demonstrated to be nontoxic to *A. castellanii* (11). Seeding of treated cysts onto *E. coli* lawns was preferred to direct seeding into PYG medium since it leads to higher recovery rates.

We demonstrated significant strain-specific variability in resistance of the cysts to treatments, with strain 3 being the most resistant ( $P < 0.05$ ), followed by strains 2 and 4 ( $P < 0.001$ ). Of note, both strains 3 and strain 4 were isolated from a hospital water network (56), thus demonstrating that strains isolated in health care settings can potentially resist the disinfection treatments used in these facilities. Other strains presented intermediate resistance profiles. The observed differences in resistance may partly be due to the ectocyst structure, since it was significantly ( $P < 0.001$ ) thicker in the more resistant strain than in the others. This cyst wall structure has been demonstrated to contain large amounts of cellulose (15), and an increase in cyst wall cellulose content during encystment has been demonstrated to coincide with increasing resistance to biocides (60). Other mechanisms may also play a role, since the cysts of strain 4 presented a thickness similar to those of strain 1 but were significantly ( $P < 0.001$ ) more resistant to treatments.

We confirmed that the minimal cysticidal temperature is 65°C for most *Acanthamoeba* sp. isolates, with the cysticidal efficacy being from almost no effect to complete kill when the temperature is increased from 55°C to 65°C. These differences confirm previous reports from studies with cysts of *A. polyphaga* (28). It should be noted that the cysts of some thermotolerant isolates could resist exposure at 80°C for 10 min (52). Hydrogen peroxide (7.5%) showed limited activity even after 30 min exposure for resistant strains. Conversely, a hydrogen peroxide-based product, despite having lower concentrations of peroxide (2%), showed greater efficacy ( $P < 0.001$ ). Differences in the cysticidal activities of lens care solutions containing 3% hydrogen peroxide have already been demonstrated (26), thus highlighting the critical importance of nonactive ingredients, notably surfactants, for the microbicidal activities of formulations. The same remark applies to peracetic acid alone compared to peracetic acid in formulation: two strains resisted very well exposure to 0.2% PAA alone for 10 min, whereas only one strain showed slight resistance after exposure to STERIS-20 for 10 min at 55°C (identical PAA concentration; recommended contact time, 12 min). In this case, increased activity ( $P < 0.001$ ) might also be due to the synergistic effects of surfactants and elevated temperature,



since it has been reported that a PAA-based product containing a higher biocide concentration was not fully active against *A. polyphaga* cysts after 10 min exposure at room temperature (21). We were surprised by the relatively good efficacy of ethanol, since this chemical shows limited activity against various microorganisms, including bacteria, viruses, and protozoa (4, 8, 20); further viability studies may also be interesting in this case due to the fixing mechanism of action associated with this biocide. Sodium hypochlorite was fully efficient at 2.5% (2,500 ppm) but required longer exposures when it was diluted 1/10, and one strain (strain 3) resisted this concentration even after 30 min exposure. Chlorine is considered ineffective against *Acanthamoeba* cysts, notably at the low residual concentrations (2 to 5 ppm) used to control microbial flora in drinking water networks. Surprisingly, *ortho*-phthalaldehyde alone showed better efficacy than an OPA-based product after 10 min exposure for strains 1, 2, and 3 and the three collection strains. This might be due to additional compounds (phosphate buffering salts, corrosion inhibitors, chelating agents) in the formulation, changing the biocidal activity or availability of the active molecule against cysts (16). The OPA-based product showed good efficacy after 20 min exposure but required 30 min exposure to become fully efficient against resistant strains 3 and 4. The limited efficacy of glutaraldehyde against other dormant forms has already been reported, requiring more than 10 h of contact time for the complete inactivation of *Cryptosporidium* oocysts (63). Furthermore, aldehydes are known to have fixative properties, which could lead to the accumulation of organic soils and render inactivation even more difficult (62). As for OPA, glutaraldehyde alone showed better efficacy against cysts than the glutaraldehyde-based product after 10 min exposure for strains 5 and 6.

As already mentioned, amoebal cysts are ubiquitous in drinking water networks but can also contaminate various surfaces and travel through the air in droplets as well as in dry forms. Their potential role as vehicles for various pathogenic microbial species and their intrinsic resistance to high-level disinfectants highlight the need to better evaluate and understand the actions of these treatments against these Trojan horses of the microbial world (6). Standardized procedures for determining the efficacies of contact lens solutions are under investigation by various working groups (26); such procedures should also be investigated for testing the disinfection treatments used for other purposes.

## REFERENCES

- Adekambi, T., S. Ben Salah, M. Khlif, D. Raoult, and M. Drancourt. 2006. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5974–5981.
- Anger, C., and J. M. Lally. 2008. *Acanthamoeba*: a review of its potential to cause keratitis, current lens care solution disinfection standards and methodologies, and strategies to reduce patient risk. *Eye Contact Lens* 34:247–253.
- Barbaree, J. M., B. S. Fields, J. C. Feeley, G. W. Gorman, and W. T. Martin. 1986. Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:422–424.
- Barbee, S. L., D. J. Weber, M. D. Sobsey, and W. A. Rutala. 1999. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointest. Endosc.* 49:605–611.
- Barete, S., A. Combes, J. F. de Jonckheere, A. Detry, S. Varnous, V. Martinez, S. G. Ptacek, E. Caumes, F. Capron, C. Frances, C. Gibert, and O. Chosidow. 2007. Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. *Emerg. Infect. Dis.* 13:736–738.
- Barker, J., and M. R. Brown. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140(Pt 6):1253–1259.
- Beattie, T. K., D. V. Seal, A. Tomlinson, A. K. McFadyen, and A. M. Grimason. 2003. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. *J. Clin. Microbiol.* 41:2992–3000.
- Best, M., S. A. Sattar, V. S. Springthorpe, and M. E. Kennedy. 1990. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28:2234–2239.
- Booton, G. C., D. J. Kelly, Y. W. Chu, D. V. Seal, E. Houang, D. S. Lam, T. J. Byers, and P. A. Fuerst. 2002. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 40:1621–1625.
- Booton, G. C., G. S. Visvesvara, T. J. Byers, D. J. Kelly, and P. A. Fuerst. 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J. Clin. Microbiol.* 43:1689–1693.
- Buck, S. L., and R. A. Rosenthal. 1996. A quantitative method to evaluate neutralizer toxicity against *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3521–3526.
- Buck, S. L., R. A. Rosenthal, and B. A. Schleich. 2000. Methods used to evaluate the effectiveness of contact lens care solutions and other compounds against *Acanthamoeba*: a review of the literature. *CLAO J.* 26:72–84.
- Byers, T. J., B. G. Kim, L. E. King, and E. R. Hugo. 1991. Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 13(Suppl. 5):S373–S384.
- Carlesso, A. M., G. L. Artuso, K. Caumo, and M. B. Rott. 2010. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr. Microbiol.* 60:185–190.
- Chavez-Munguia, B., M. Omana-Molina, M. Gonzalez-Lazaro, A. Gonzalez-Robles, P. Bonilla, and A. Martinez-Palomo. 2005. Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:153–158.
- Critchley, M., and R. Bentham. 2009. The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. *J. Appl. Microbiol.* 106:784–789.
- Dart, J. K., V. P. Saw, and S. Kilvington. 2009. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am. J. Ophthalmol.* 148:487–499.
- Duarte, R. S., M. C. Lourenco, S. Fonseca Lde, S. C. Leao, L. Amorim Ede, I. L. Rocha, F. S. Coelho, C. Viana-Niero, K. M. Gomes, M. G. da Silva, N. S. Lorena, M. B. Pitombo, R. M. Ferreira, M. H. Garcia, G. P. de Oliveira, O. Lupi, B. R. Vilaca, L. R. Serradas, A. Chebabo, E. A. Marques, L. M. Teixeira, M. Dalcolmo, S. G. Senna, and J. L. Sampaio. 2009. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J. Clin. Microbiol.* 47:2149–2155.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.
- Eterpi, M., G. McDonnell, and V. Thomas. 2009. Disinfection efficacy against parvoviruses in comparison to reference viruses. *J. Hosp. Infect.* 73:64–70.
- Greub, G., and D. Raoult. 2003. Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:784–786.
- Greub, G., and D. Raoult. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:413–433.
- Griffiths, P. A., J. R. Babb, C. R. Bradley, and A. P. Fraise. 1997. Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. *J. Appl. Microbiol.* 82:519–526.
- Hoffmann, R., and R. Michel. 2001. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203:215–219.
- Hughes, R., W. Heaselgrave, and S. Kilvington. 2003. *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3080–3084.
- Johnston, S. P., R. Sriram, Y. Qvarnstrom, S. Roy, J. Verani, J. Yoder, S. Lorick, J. Roberts, M. J. Beach, and G. Visvesvara. 2009. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *J. Clin. Microbiol.* 47:2040–2045.
- Khunkitti, W., D. Lloyd, J. R. Furr, and A. D. Russell. 1998. *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* 36:43–48.
- Kilvington, S. 1991. Moist-heat disinfection of *Acanthamoeba* cysts. *Rev. Infect. Dis.* 13(Suppl. 5):S418.
- Kilvington, S., and C. Anger. 2001. A comparison of cyst age and assay method of the efficacy of contact lens disinfectants against *Acanthamoeba*. *Br. J. Ophthalmol.* 85:336–340.
- Kilvington, S., T. Gray, J. Dart, N. Morlet, J. R. Beeching, D. G. Frazer, and M. Matheson. 2004. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:165–169.
- Kohlsler, M., D. Leitsch, U. Furnkranz, M. Duchene, H. Aspöck, and J.



- Walochnik. 2008. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol. Res.* 102:1069–1072.
32. Lackner, P., R. Beer, G. Broessner, R. Helbok, B. Pfausler, C. Brenneis, H. Auer, J. Walochnik, and E. Schmutzhard. 2010. Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. *Neurocrit. Care* 12: 91–94.
  33. Ledee, D. R., A. Iovieno, D. Miller, N. Mandal, M. Diaz, J. Fell, M. E. Fini, and E. C. Alfonso. 2009. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *J. Clin. Microbiol.* 47:1458–1462.
  34. Lloyd, D., N. A. Turner, W. Khunkitti, A. C. Hann, J. R. Furr, and A. D. Russell. 2001. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:11–16.
  35. Lorenzo-Morales, J., J. Kliesciková, E. Martínez-Carretero, L. M. De Pablos, B. Profotova, E. Nohynkova, A. Osuna, and B. Valladares. 2008. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot. Cell* 7:509–517.
  36. Loret, J. F., M. Jousset, S. Robert, C. Anselme, G. Saucedo, F. Ribas, A. Martinez, and V. Catalan. 2008. Elimination of free-living amoebae by drinking water treatment processes. *Eur. J. Water Quality* 39:37–50.
  37. Marciano-Cabral, F., and G. Cabral. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:273–307.
  38. Mazur, T., E. Hadas, and I. Iwanicka. 1995. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop. Med. Parasitol.* 46:106–108.
  39. Nagington, J., P. G. Watson, T. J. Playfair, J. McGill, B. R. Jones, and A. D. M. Steele. 1974. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 304:1537–1540.
  40. Neff, R. J., S. A. Ray, W. F. Benton, and M. Wilborn. 1964. Induction of synchronous encystation (differentiation) in *Acanthamoeba* spp., p. 55–83. In D. M. Prescott (ed.), *Methods in cell physiology*, vol. 1. Academic Press, New York, NY.
  41. Pumidonming, W., M. Koehsler, and J. Walochnik. 2010. *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitol. Res.* 106:553–559.
  42. Rivera, F., P. Bonilla, E. Ramirez, A. Calderon, E. Gallegos, S. Rodriguez, R. Ortiz, D. Hernandez, and V. Rivera. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water Air Soil Pollution* 74:65–87.
  43. Rodriguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* 20:225–241.
  44. Rohr, U., S. Weber, R. Michel, F. Selenka, and M. Wilhelm. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1822–1824.
  45. Santos, L. C., M. S. Oliveira, R. D. Lobo, H. R. Higashimo, S. F. Costa, I. M. van der Heijden, M. C. Giudice, A. R. Silva, and A. S. Levin. 2009. *Acanthamoeba* spp. in urine of critically ill patients. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1144–1146.
  46. Schroeder, J. M., G. C. Booton, J. Hay, I. A. Niszl, D. V. Seal, M. B. Markus, P. A. Fuerst, and T. J. Byers. 2001. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 39:1903–1911.
  47. Schroeder-Diedrich, J. M., P. A. Fuerst, and T. J. Byers. 1998. Group-I introns with unusual sequences occur at three sites in nuclear 18S rRNA genes of *Acanthamoeba lenticulata*. *Curr. Genet.* 34:71–78.
  48. Reference deleted.
  49. Sharbati-Tehrani, S., J. Stephan, G. Holland, B. Appel, M. Niederweis, and A. Lewin. 2005. Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 151:2403–2410.
  50. Spanakos, G., K. Tzanetou, D. Miltakakis, E. Patsoula, E. Malamou-Lada, and N. C. Vakalis. 2006. Genotyping of pathogenic *Acanthamoeba* isolated from clinical samples in Greece—report of a clinical isolate presenting T5 genotype. *Parasitol. Int.* 55:147–149.
  51. Sriram, R., M. Shoff, G. Booton, P. Fuerst, and G. S. Visvesvara. 2008. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *J. Clin. Microbiol.* 46:4045–4048.
  52. Storey, M. V., J. Winiiecka-Krusnell, N. J. Ashbolt, and T. A. Stenstrom. 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoeba* and legionellae. *Scand. J. Infect. Dis.* 36:656–662.
  53. Svetlikova, Z., H. Skovierova, M. Niederweis, J. L. Gaillard, G. McDonnell, and M. Jackson. 2009. The role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4015–4018.
  54. Reference deleted.
  55. Thomas, V., T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret, and Y. Lévi. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J. Appl. Microbiol.* 97:950–963.
  56. Thomas, V., K. Herrera-Rimann, D. S. Blanc, and G. Greub. 2006. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2428–2438.
  57. Thomas, V., J. F. Loret, M. Jousset, and G. Greub. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol.* 10:2728–2745.
  58. Thomas, V., and G. McDonnell. 2007. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:349–357.
  59. Thomas, V., G. McDonnell, S. P. Denyer, and J. Y. Maillard. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:231–259.
  60. Turner, N. A., A. D. Russell, J. R. Furr, and D. Lloyd. 2000. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:27–34.
  61. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.
  62. Wilson, J., and A. B. Margolin. 2003. Efficacy of glutaraldehyde disinfectant against *Cryptosporidium parvum* in the presence of various organic soils. *J. AOAC Int.* 86:96–100.
  63. Wilson, J. A., and A. B. Margolin. 1999. The efficacy of three common hospital liquid germicides to inactivate *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Hosp. Infect.* 42:231–237.

## Discussion et conclusion

Les amibes libres du genre *Acanthamoeba* représentent un risque en santé humaine aussi bien par leur pathogénicité intrinsèque, que par leur capacité d'héberger d'autres micro-organismes pathogènes. Les amibes sont capables de résister aux traitements chimiques et physiques utilisés pour la production et la distribution d'eau potable. Elles sont également capables de coloniser les différents réseaux d'eau mais aussi les lieux humides, l'air ou encore la poussière. Malgré le nombre croissant d'infections dues à ces pathogènes, peu de données sont disponibles concernant leur inactivation, c'est pourquoi, cette étude porte sur la désinfection des trophozoïtes et des kystes par différents biocides utilisés pour la décontamination de surfaces et de matériel médical.

Nous avons étudié 6 souches isolées de l'environnement appartenant toutes sauf une au groupe T4, responsable de la majorité des infections, ainsi que 3 souches de collection.

Cette étude a montré que les trophozoïtes de la plupart des souches testées sont résistants à la glutaraldéhyde, ces résultats confirment ceux d'une précédente étude qui ne portait que sur la souche de collection CCAP 1501/18 [163].

Selon la souche et les biocides testés, la résistance varie grandement. Nous avons fait le choix d'utiliser la méthode d'enkystement en tampon de Neff, dans la mesure où cette méthode semble être la plus proche des conditions d'enkystement réelles obtenues dans les réseaux d'eau [122], il existe néanmoins d'autres méthodes d'enkystement décrites : sur gélose non nutritive ou encore avec d'autres tampons. Avant leur utilisation, les kystes produits ont subi un traitement SDS afin d'éliminer les kystes non matures [374] mais aussi de dissocier les agrégats formés lors de l'enkystement, comme nous avons pu l'observer avec certains traitements (voir figure 2). Il convient de noter que dans l'environnement, les kystes sont très probablement sous formes d'agrégats, il serait alors nécessaire d'évaluer aussi l'efficacité de ces mêmes traitements dans ces conditions.

Nous avons également observé que les souches environnementales produisent des kystes plus résistants que les souches de collection. En effet, il a été montré précédemment que les souches cultivées de façon prolongée en milieu axénique perdent leur capacité à s'enkyster et deviennent également plus sensibles à la chaleur [125, 375]. De plus, les deux souches les plus résistantes de cette études ont été isolées en milieu hospitalier ce qui indique que les souches rencontrées dans les réseaux d'eau des services de soins ou autres peuvent ne

pas être décontaminées par les différents traitements utilisés. Les souches environnementales testées appartenant au groupe T4, c'est-à-dire celui regroupant les amibes responsables de la majorité des infections recensées, sont de façon significative, plus résistantes aux biocides que les souches de collection, excepté pour la souche 1. Ces souches environnementales provenant de campagnes de prélèvements réalisées dans les hôpitaux, il semble que les amibes isolées dans des établissements de soins soient potentiellement capables de résister aux traitements qui y sont pratiqués. Ceci est d'autant plus inquiétant que les patients pouvant être en contact avec ces souches peuvent être immunodéprimés.

Nous avons observé une meilleure efficacité de la glutaraldéhyde sur les kystes que sur les trophozoïtes pour les souches 1, 4, 5 ainsi que pour *A. castellanii* ATCC 30010 et *A. polyphaga* CCAP 1501/18. Cette observation inattendue pourrait être expliquée par une sensibilité plus grande à la glutaraldéhyde de la structure extérieure des kystes, voire un désenkystement bloqué par des liaisons entre les structures externes du kyste. Il serait nécessaire de réaliser des marquages de viabilité sur les kystes traités afin d'étudier ce phénomène.

La résistance à la glutaraldéhyde pose un autre problème, des mycobactéries sont souvent associées aux amibes, or, ces bactéries peuvent également être résistantes à la glutaraldéhyde. Un traitement à base du glutaraldéhyde pourrait donc sélectionner les amibes ainsi que les mycobactéries résistantes.

Dans cette étude, nous avons fait le choix d'ensemencer les kystes traités sur gélose NNA avec *E. coli* plutôt que dans du PYG, en effet, des tests préliminaires ont montré que cette méthode permettait une meilleure croissance des kystes encore viables.

La paroi des kystes est constituée de cellulose, l'augmentation de la quantité de cellulose au cours de l'enkystement a été démontrée ainsi que sa corrélation avec la résistance aux biocides [134]. Les différences observées en termes de résistance peuvent en partie être expliquées par l'observation de la structure des kystes, la souche la plus résistante présentant un ectokyste plus épais que les autres souches observées. Néanmoins, d'autres facteurs semblent intervenir puisque les souches 1 et 4 présentent des profils de résistance différents mais un ectokyste d'épaisseur tout à fait comparable.

En ce qui concerne la température, il faut au minimum 65°C pour tuer les kystes de la majorité des souches testées. De plus, certaines souches thermotolérantes peuvent résister à une exposition à 80°C durant 10 minutes [151].

Nous avons également observé l'efficacité limitée du peroxyde d'hydrogène 7.5%, même après un traitement de 30 minutes, en revanche des formulations avec un taux de

peroxyde d'hydrogène inférieur (2%) sont plus efficaces. La formulation est très importante dans l'efficacité des produits commerciaux notamment la présence de surfactants, et d'autres composés non microbicides. Cette observation est également vraie pour d'autres principes actifs comme l'acide peracétique. En revanche, le phénomène inverse a été observé pour l'OPA, le principe actif seul s'est révélé plus efficace qu'en formulation. Ceci peut être expliqué par la présence des composés additionnels tels que des inhibiteurs de corrosion, des agents chélateurs ou encore des tampons phosphate pouvant avoir une incidence sur l'efficacité du principe actif [376]. Il faut tout de même noter que la glutaraldéhyde n'a qu'une action limitée sur les kystes et les trophozoïtes d'*Acanthamoebae*, ce qui a également été documenté pour d'autres micro-organismes tels que les oocystes de *Cryptosporidium* [377]. L'inconvénient des aldéhydes est leur capacité à fixer, ce qui peut engendrer une accumulation de matières organiques et rendre leur action biocide plus difficile.

Nous avons observé une bonne efficacité de l'éthanol sur les kystes alors que ce biocide est en général peu actif sur divers micro-organismes [378-380]. Compte tenu de la capacité de l'éthanol à fixer, il serait intéressant de réaliser des tests de viabilité sur les kystes traités.

Un autre principe actif qui s'est avéré efficace est l'hypochlorite de sodium à 2.5%, en revanche une concentration plus faible (0.25%) nécessite une augmentation du temps de contact et n'est pas efficace sur toutes les souches. Le chlore est considéré comme inefficace sur kystes d'*Acanthamoebae*, notamment aux concentrations utilisées dans les réseaux d'eau potable (2 à 5 ppm).

Les kystes d'amibes sont largement répandus dans l'environnement, ils sont présents dans les réseaux d'eau potable et peuvent donc contaminer diverses surfaces et être transportés aussi bien par l'air que par l'eau. Ils présentent un risque pour la santé humaine à cause de leur pathogénicité intrinsèque mais aussi par leur rôle de vecteur pour d'autres micro-organismes. Compte tenu de leur résistance aux biocides disponibles sur le marché, le risque pathogène est d'autant plus important. A ce jour, il n'existe pas de protocole de référence pour l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les kystes d'amibes bien que des groupes de travail se préoccupent de l'évaluation des traitements de désinfection pour les lentilles de contact. Un protocole devra également être mis au point pour les désinfectants de surfaces ou de matériel médical.

2<sup>e</sup> Publication

Article soumis à Journal of Eukaryotic Microbiology

*Acanthamoebal* cysts resistance to disinfection: effects of growth conditions

Céline COULON, Nathalie DECHAMPS, Anne COLLIGNON, Gerald Mc DONNELL and  
Vincent THOMAS

Résumé de la deuxième publication:

Les *Acanthamoebae* sont des amibes libres ubiquitaires dans l'environnement. Ces amibes, pathogènes pour l'homme, sont responsables de plusieurs infections graves. Elles ont également la capacité en cas de conditions environnementales défavorables de s'enkyster afin de mieux résister aux différents stress. Cet enkystement leur confère également une résistance vis-à-vis des traitements de désinfection. Il n'existe à ce jour pas de protocole de référence pour l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les kystes d'amibes contrairement aux bactéries et virus.

Dans ce travail, nous avons voulu comparer la résistance des *Acanthamoebae* cultivées en milieu axénique (PYG) ou sur cellules HEP-2 puis enkystées en tampon Neff. Nous avons confirmé que les kystes issus de trophozoïtes cultivés sur cellules HEP-2 sont significativement plus résistants à tous les biocides testés excepté pour l'acide peracétique et les formulations à base de ce principe actif.

Nous avons également étudié les différences entre ces deux types de kystes en cytométrie de flux, après marquage au calcofluor. La croissance sur HEP-2 semble permettre d'obtenir des kystes plus matures que la croissance en milieu axénique.

Ces résultats doivent être pris en compte pour le développement d'un protocole de référence pour l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les kystes d'amibes.

**Title:**

Acanthamoebal cysts resistance to disinfection: effects of growth conditions

**Running Title:**

Resistance of *Acanthamoeba* spp. to disinfection

**Keywords:**

Amoebae; protozoa; cysts; disinfection; biocides

**Authors:**

Céline COULON <sup>1,2</sup>, Nathalie DECHAMPS <sup>3</sup>, Anne COLLIGNON <sup>2</sup>, Gerald Mc DONNELL<sup>4</sup>  
and Vincent THOMAS <sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>STERIS SA R&D, Fontenay-aux-Roses, FRANCE; <sup>2</sup>Université de Paris-Sud XI - Faculté de Pharmacie - Département de Microbiologie, Châtenay-Malabry, FRANCE; <sup>3</sup>Cytometry and cell sorting facility, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique, Fontenay, FRANCE; <sup>4</sup>STERIS Ltd, Basingstoke, UNITED KINGDOM.

**Corresponding author:**

Vincent THOMAS

STERIS SA R&D

18, route du Panorama - 92265 Fontenay-aux-Roses - FRANCE

+33-146548557 (direct)

+33-146549843 (fax)

vincent\_thomas@steris.com

**ABSTRACT (147 words)**

Despite increasing concerns of direct pathogenicity and/or their role as hosts for other microorganisms there is currently no standard tests for the inactivation of amoebae that belong to the genus *Acanthamoeba*. Methods used to grow amoebae and produce cysts for these tests may be important since they can dramatically modify cyst susceptibility. We compared resistance of cysts produced from trophozoites grown in PYG axenic medium or by feeding on HEp-2 cells and then encysted in Neff's medium. We observed that trophozoites grown using HEp-2 cells as a food source produce cysts that are significantly more resistant to most biocides tested (including heat). Increased resistance is likely due to higher proportion of mature cysts as demonstrated by flow cytometry and microscopic analysis of cysts stained with calcofluor white. These results should be taken into account for the development of protocols to evaluate biocides and antimicrobials against amoebal cysts.

## **INTRODUCTION**

Free-Living Amoebae (FLA) that belong to the genus *Acanthamoeba* are ubiquitous in the environment. They are mostly found in water (freshwater, seawater, domestic water) but also in soil, air and dust [381]. In a recent clinical study, *Acanthamoeba* spp have also been reported from the urine of critically ill patients in intensive care units: 17 of 63 samples collected from urinary catheters were positive for *Acanthamoeba* spp. [382]. The organism's life cycle is composed of two distinct stages: a metabolically active stage with feeding and replicating trophozoites, and a dormant stage with the formation of cyst that resist to environmental stress in case of unfavourable conditions [383].

Several *Acanthamoeba* species are pathogenic for humans, being mostly associated with amoebal keratitis, a rare but sight-threatening corneal infection that can affect immunocompetent individuals. Reported incidence of the disease has increased dramatically over last three decades presumably due to increased use of contact lenses; it has been reported to be in the range of 0.15 to 1.4 per million [384]. Granulomatous amebic encephalitis (GAE), disseminated diseases and skin lesions have also been reported with *Acanthamoeba* spp. but are currently only rarely observed [385].

In addition to their intrinsic pathogenicity, *Acanthamoeba* can potentially harbour intracellularly various bacterial, viral and eukaryotic species pathogenic for human and animals [386]. Among 539 bacterial species listed as being pathogenic for humans and/or animals, 102 to date have been described in the literature as being able to resist and potentially proliferate within amoebae [387]. This includes well known hospital-acquired pathogens such as *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Legionella* spp., various mycobacterial species, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp (for a complete review see [387]). Survival of bacteria within amoebal cysts has also been demonstrated for several of these species, including mycobacteria. Cysts are thus considered as potential reservoirs of pathogenic micro-organisms in water networks and it has been suggested



that testing encysted mycobacteria may be necessary to properly evaluate decontamination procedures for water and endoscopes [202].

We have recently published data regarding the intrinsic resistance of amoebal cysts to disinfection treatments used in healthcare settings [388]. This study demonstrated that several chemical formulations containing peracetic acid, hydrogen peroxide or orthophthalaldehyde presented greater efficacy than glutaraldehyde, as did ethanol and sodium hypochlorite; however, some of these treatments required relatively long incubation times to achieve cyst inactivation. In this work we chose to use Neff medium to produce cysts since it has been recommended due to its ability to induce synchronous encystment and high yield of cysts [383]. However it has also been reported that Neff method suffers limitations, and in some cases cysts produced using other methods such as encystment on non-nutrient agar (NNA) plates have proved more resistant to disinfection [122]. Based on recent studies demonstrating that *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously and show reduced temperature tolerance upon prolonged axenic culture [389, 390], and that growth on cell layers reactivates attenuated properties [391], we considered if cysts produced from trophozoites grown on cell layers are more resistant to disinfection treatments and consequently more appropriate to test biocides used to reprocess critical medical devices.

## **METHODS**

Five representative *Acanthamoeba* strains were used, including 2 environmental isolates (T4 genotype) and 3 collection strains (*Acanthamoeba castellanii* CCAP 1501/10, *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 and *Acanthamoeba polyphaga* CCAP 1501/18). They were routinely cultivated at 28°C in sterile Peptone-Yeast extract-Glucose (PYG) medium containing for 5 litres of distilled water: 100 g proteose peptone (Difco), 10 g yeast extract (Difco), 4.9 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5 g sodium citrate · 2H<sub>2</sub>O, 0.1 g Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1.7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.97 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 45 g glucose, and 0.295 g CaCl<sub>2</sub>.

Trophozoites to be used for cysts production were grown using two different methods: growth in sterile PYG medium or feeding on HEp-2 cells. For HEp-2 derived trophozoites, HEp-2 cells ATCC CCL-23 were cultivated at 37°C in 150 cm<sup>2</sup> flasks with DMEM + 5% FBS. When cells reached confluence, DMEM was removed and replaced by NaCl 0.9% containing ~10<sup>6</sup> trophozoites; flasks were incubated at 28°C to allow amoebal growth and sub-cultured 3 times using this method [391]. Trophozoites cultivated using both methods were then encysted in Neff's medium for one week at 33°C as previously described [383, 388].

For disinfection tests, cysts were harvested in ¼ strength Ringer's solution, treated with SDS 0.5% for 10 min to lyse non-mature cysts [84] and dissociate aggregates [388], then washed 2 times in ¼ strength Ringer's solution and stored at 4°C for testing within 15 days. To test biocide efficacy, cysts suspensions were adjusted at 10<sup>7</sup> to 10<sup>8</sup> cysts/ml in ¼ strength Ringer's solution and approx. 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> cysts were diluted 1/10 and incubated for 10 to 30 min in biocide suspensions (2 non-formulated and 3 formulated, Table 1). Treated cysts were then re-suspended for 5 min in Dey-Engley neutralizing broth [392], then collected by centrifugation at 14,000 rpm for 5 min, suspended in Ringer broth and serial-diluted on *Escherichia coli* ATCC 25922 lawns

on Non Nutrient Agar (NNA) plates. After 7 days incubation at 28°C, NNA plates were observed for trophozoites regrowth, and log reductions were calculated using the Spearman-Kärber method. To prepare NNA plates, 1.5 g agar (Difco) was diluted in 100 ml of Page's modified Neff's amoeba saline (PAS) containing for 1 litre of distilled water: 120 mg NaCl, 4 mg MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 4 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 142 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 136 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

For flow cytometry and microscopy, PYG medium or HEp-2 derived trophozoites were encysted in Neff medium containing 0.005% calcofluor white (Fluka 18909) for 7 days at 33°C to detect cellulose-containing structures [56]. After 7 days incubation cysts were harvested, treated with 0.5% SDS, fixed in 200 µl methanol for 10 min, and washed 2 times in PBS. Stained cysts were then analyzed and sorted with an Influx cell sorter (Becton Dickinson), equipped with Coherent Innova 308-UV and 307 argon ion lasers, tuned to emit 100mW of UV (all lines) and 200 mW of 488nm. Forward scatter and log-side scatter were detected off the 488nm laser, UV-excited Calcofluor white fluorescence intensity was detected through a 560/50 bandpass filter (SemRock, Rochester, NY, USA;)[393]. A minimum of 50,000 events were stored in listmode for off-line analysis, and 3,000 to 15,000 events presenting clearly distinguishable calcofluor white fluorescence (as compared to background fluorescence observed in unstained samples) were analysed, and clearly separated populations based on SSC (log) and calcofluor white fluorescence were sorted in 300 µl sterile water, concentrated to 50 µl by high-speed centrifugation, deposited on wells of a Teflon-coated microscopy slide, dried at 37°C, mounted with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen) and observed with a Olympus IX 71 inverted microscope equipped with a X-cite<sup>®</sup> 120Q fluorescence illuminator.

All tests were performed at least four times. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test to compare numbers of wells in which amoebal regrowth was clearly observed after

serial-diluting treated cysts onto *E. coli*-layered NNA plates. Statistical significance was set at an alpha level of 0.05.

## **RESULTS**

As previously described [388], cysts produced from PYG-grown trophozoites encysted in Neff medium were efficiently inactivated ( $> 4\text{-log}_{10}$  reduction) by most biocides and for all strains tested (Fig.1). The glutaraldehyde-based product and a 7.5% hydrogen peroxide solution were not fully efficient on several strains even after 30 min exposure, matching previous reports [388]. Cysts produced from trophozoites grown onto HEp-2 cells and encysted in Neff medium were generally more resistant to biocides, with the exception of the peracetic acid-based product that was still very active ( $> 4\text{-log}_{10}$  reduction) on the 5 tested strains after only 10 min exposure (Fig.1). For all strains, cysts produced from trophozoites grown onto HEp-2 cells were significantly more resistant to heat (10 min exposure) and to the glutaraldehyde-based product (30 min exposure) compared to cysts produced from trophozoites grown in PYG. For most (4 of 5) amoebal strains, cysts produced from trophozoites grown onto HEp-2 cells were also more resistant to 30 min exposure to bleach 0.25% or hydrogen peroxide 7.5%; higher resistance to the OPA-based product (30 min exposure) was observed for 3 strains.

Flow cytometric analysis performed with cysts of the 5 different strains obtained from trophozoites cultivated with the two different methods demonstrated the presence of one or two separated populations depending on strains and method used to grow trophozoites (Fig.2 and Table 2). When analysing mean SSC and mean fluorescence intensities of well-defined populations for every strain we found that populations presenting highest SSC and highest fluorescence values in the HEp-2-fed population always had higher SSC and brighter fluorescence than PYG-grown populations (Table 2). The only exception was for the second

(top) population observed in cysts of *A. castellanii* ATCC 30010 obtained from PYG-grown trophozoites that presented higher mean fluorescence intensity than cysts obtained from HEp-2-fed trophozoites; however in this case SSC was still higher in cysts obtained from HEp-2-fed trophozoites (Table 2). Microscopic observation of sorted populations demonstrated that populations with higher SSC and bright calcofluor white fluorescence presented typical cysts shapes with irregular, thick and highly fluorescent cell walls whereas populations with lower SSC and dim calcofluor white fluorescence were composed of rounded cysts presenting thinner and visually less fluorescent cell walls (Fig.2)

## **DISCUSSION**

Amoebae that belong to the genus *Acanthamoeba* are increasingly recognized as a potential threat for human and animal health due to intrinsic pathogenicity and their capacity to serve as the ‘Trojan horses’ of the microbial world allowing the survival of bacterial pathogens in the environment [394]. In addition to well described interactions with *Legionella pneumophila*, *Acanthamoebae* are suspected to play important role in the ecology of pathogenic bacteria, including emerging concerns such as non-tuberculous mycobacteria and *Campylobacter* spp [395, 396]. There is thus a critical need to validate treatments efficacy against *Acanthamoebae*, particularly against cysts, and methods to be used to test biocides efficacy against cysts of *Acanthamoeba* spp are under discussion [123]. As for other micro-organisms, test methodology has a potentially high impact on conclusions that can be drawn from such tests. It has been reported that different acanthamoebal strains present different susceptibilities to biocides and that methods used to produce cysts from trophozoites also have a dramatic importance on final results [122-124, 397]. Importantly, cysts derived from laboratory strains that have been maintained in prolonged axenic culture are more susceptible to disinfection than those derived from the original isolate [122]. Furthermore it has been reported that trophozoites grown in sterile PYG and

incubated in Neff's encystment medium produce rounded trophozoites and immature cysts but not double-walled mature cysts even after more than 4 weeks incubation [397]. Despite this, encystment in Neff medium is still currently used to produce cysts since it is easy to set-up and allow producing large amounts of cysts.

As recent studies demonstrated that unnecessary metabolic features such as encystment and protease activities that are lost or at least down-regulated after prolonged axenic culture can be recovered after growth on human cells [389-391], we tested if trophozoites cultivated on cells produce cysts that are more resistant to biocides even if cysts are produced in Neff medium. We demonstrated it is indeed the case, with observed resistance levels that are generally well above those observed with cysts produced from trophozoites cultivated in PYG. This can have significant implications since some of the treatments tested (aldehydes based treatments) are currently widely used for high level disinfection; *Acanthamoebae* spp are currently found in hospital water networks [37] and incomplete efficacy could thus result in increased risk of patient contamination with amoebal cysts harbouring pathogenic bacterial species such as mycobacteria. Of note, resistance of trophozoites and cysts to glutaraldehyde has already been reported by others [163, 388]. Published data concerning heat-inactivation of *Acanthamoeba* spp are very discrepant: Turner *et al.* observed that trophozoites of *A. castellanii* were inactivated following 30 min exposure at 46°C, while a temperature of 56°C was necessary to inactivate the same number of cysts produced from PYG-grown trophozoites encysted in Neff medium [134]. Aksozek *et al.* reported that a temperature of 65°C for more than 5 min was fully efficient to inactivate trophozoites of *A. castellanii* cultivated in PYG and encysted on NNA-plates [159], while Ludwig *et al.* reported that of *A. castellanii* and *A. polyphaga* directly encysted in PYG were inactivated only after exposure to moist heat for 10 min at 80°C [160]. The same exposure conditions did not completely inactivate cysts of thermo-tolerant *Acanthamoeba* spp. infected

with *L. pneumophila* [151]. Increased heat-resistance is a major concern since heat-shock treatments at 65°C are commonly used to control proliferation of *L. pneumophila* in water distribution networks [398].

Calcofluor white staining experiments suggest that increased resistance to biocides for one strain is largely due to higher proportions of more mature cysts obtained from trophozoites fed with HEp-2 cells, resulting in higher cellulose content in the cysts cell walls and higher resistance to disinfection [399, 400]. Cysts presenting high fluorescence values generally have higher SSC values, likely due to increased refraction by the cell walls. Thus, even if not prevailing in the whole cysts population, these mature cysts are likely responsible for observed increased resistance to biocides. Whether additional specific factors over- or under-expressed in presence of mammalian cells also play significant roles remains to be determined. Comparison between strains is difficult since differences between fluorescence values are not directly linked to observed differences between resistances to biocides: as an example, cysts obtained from HEp-2 fed trophozoites are less resistant ( $P < 0.05$ ) to hydrogen peroxide for *Acanthamoeba* sp1 than for *Acanthamoeba* sp4, despite having higher mean fluorescence value (Table 2). Previous studies reported no significant differences in forward scatter (FSC) for cysts obtained from PYG-grown trophozoites using different methods and presenting different susceptibilities to biocides [122]. Accordingly, we did not observe such differences in our experiments and could only clearly distinguish populations due to differences in calcofluor white staining.

Our results suggest that the method described by Koeshler *et al* [391] to produce mature cysts from HEp-2 cells grown trophozoites is of major interest for the evaluation of disinfection efficacy. The method is relatively simple to set-up and does not require special media or equipment. An additional simplification step could consist in cultivating *Acanthamoeba* spp on other protozoa that can be easily cultivated and maintained in the laboratory and that can serve as

a nutrient source instead of cells, such as *Hartmannella vermiformis* for example (unpublished observations); this could avoid the use of human or animal cell lines that are more difficult to handle. However it should first be investigated if cysts produced from amoebae in such conditions present similar resistance to disinfection compared to cysts produced from trophozoites grown on HEP-2 cells. The effect of long term growth of amoebae on HEP-2 cells requires further investigation. Another important point to consider is the potential effect of the presence of intracellular bacteria on encystment and cysts resistance to disinfection: recent report suggests that *Acanthamoeba castellanii* Strain Ma (ATCC 50370), a strain currently used for testing biocides efficacy [154, 401], harbours a previously unrecognized mycobacterial endosymbiont related to the *Mycobacterium avium* complex [402]. These results should be taken into account for the development of normalized protocols for the evaluation of biocides against protozoa, including amoebal cysts.



**Table 1:** List of biocides and contact times tested in this study; all biocides were tested at recommended temperatures (room temperature, with the exception of STERIS-20).

Biocides	Final concentrations of active compounds	pH of solutions (measured at 21°C)	Contact times (min)
<i>Unformulated biocides</i>			
Sodium hypochlorite	2,500 ppm	11.3	30
Hydrogen peroxide	7.5%	3.4	30
<i>Formulated biocides</i>			
Glutaraldehyde-based product	2% glutaraldehyde	5.6	30
<i>Ortho</i> -phtalaldehyde-based product	0.55% OPA	7.5	30
PAA-based product STERIS-20 (55°C)	0.2% PAA	6.2	10
<i>Heat</i>			
65°C	N/A	7.2	10

**Table 2:** Mean SSC and calcofluor white fluorescence intensities of the different cysts populations analysed in this study. Values are indicated for one or two populations depending if one or two differentiated populations were observed during analysis. When two populations were detected, calcofluor white-bright populations were demonstrated by microscopy to correspond to more mature cysts compared to calcofluor white-dim populations.

Sample	Dim (or full) population			Bright population (if present)		
	% cysts	SSC	Fluorescence	% cysts	SSC	Fluorescence
<i>A.castellanii</i> CCAP 1501/10 - PYG	> 95.0	92	405	-	-	-
<i>A.castellanii</i> CCAP 1501/10 - Hep-2	79.0	101	186	19.9	402	530
<i>A.castellanii</i> ATCC 30010 - PYG	47.5	143	212	50.7	534	962
<i>A.castellanii</i> ATCC 30010 - Hep-2	> 95.0	715	728	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> CCAP 1501/18 - PYG	> 95.0	450	496	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> CCAP 1501/18 - Hep-2	> 95.0	562	788	-	-	-
<i>Acanthamoeba</i> sp1- PYG	62.4	198	348	35.9	665	1179
<i>Acanthamoeba</i> sp1- Hep-2	64.9	296	488	32.2	973	1511
<i>Acanthamoeba</i> sp4- PYG	53.8	122	171	45.1	300	558
<i>Acanthamoeba</i> sp4- Hep-2	> 95.0	517	773	-	-	-

**Figure legends:**

**Figure 1:** Cysticidal effect of treatments including biocides and moist heat against cysts of *A. castellanii* CCAP 1501/10 (A), *A. castellanii* ATCC 30010 (B), *A. polyphaga* CCAP 1501/18 (C), and two genotype T4 strains previously isolated from river water (D) and hospital water (E). Log<sub>-10</sub> reductions are reported.

■: trophozoites were grown in PYG medium and encysted in Neff medium;

■: trophozoites were grown on HEp-2 cells and encysted in Neff medium.

Statistically significant differences observed for the efficacy of treatments against cysts obtained according to both methods are indicated with stars: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ .

“>” : Maximum Log<sub>-10</sub> reduction was observed

**Figure 2:**

Flow cytometric analysis of cysts stained with Calcofluor white during encystment in Neff medium. Different populations were observed, sorted and observed with a fluorescence microscope: “non-mature” as well as “mature” cysts were obtained from trophozoites grown in PYG (top diagram and corresponding pictures, sort regions A and B, respectively) whereas more than 95% “mature” cysts were obtained from trophozoites grown on HEp-2 cells (bottom diagram, sort region C and corresponding picture). Region D indicates the same area as region A, but did not contain an identifiable subpopulation. Calcofluor white-low, SSC-low populations essentially contained cellular debris, and no intact cells were retrieved.

Figure 1

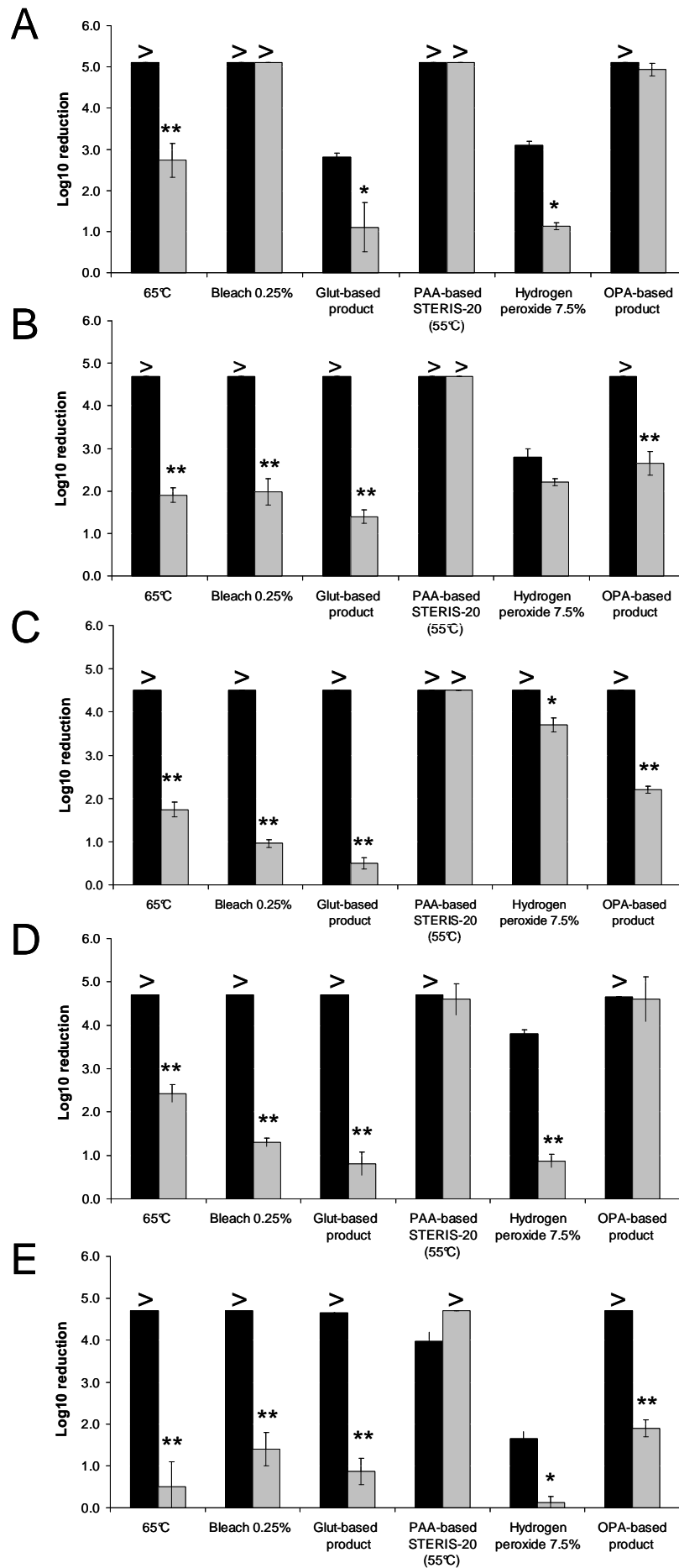
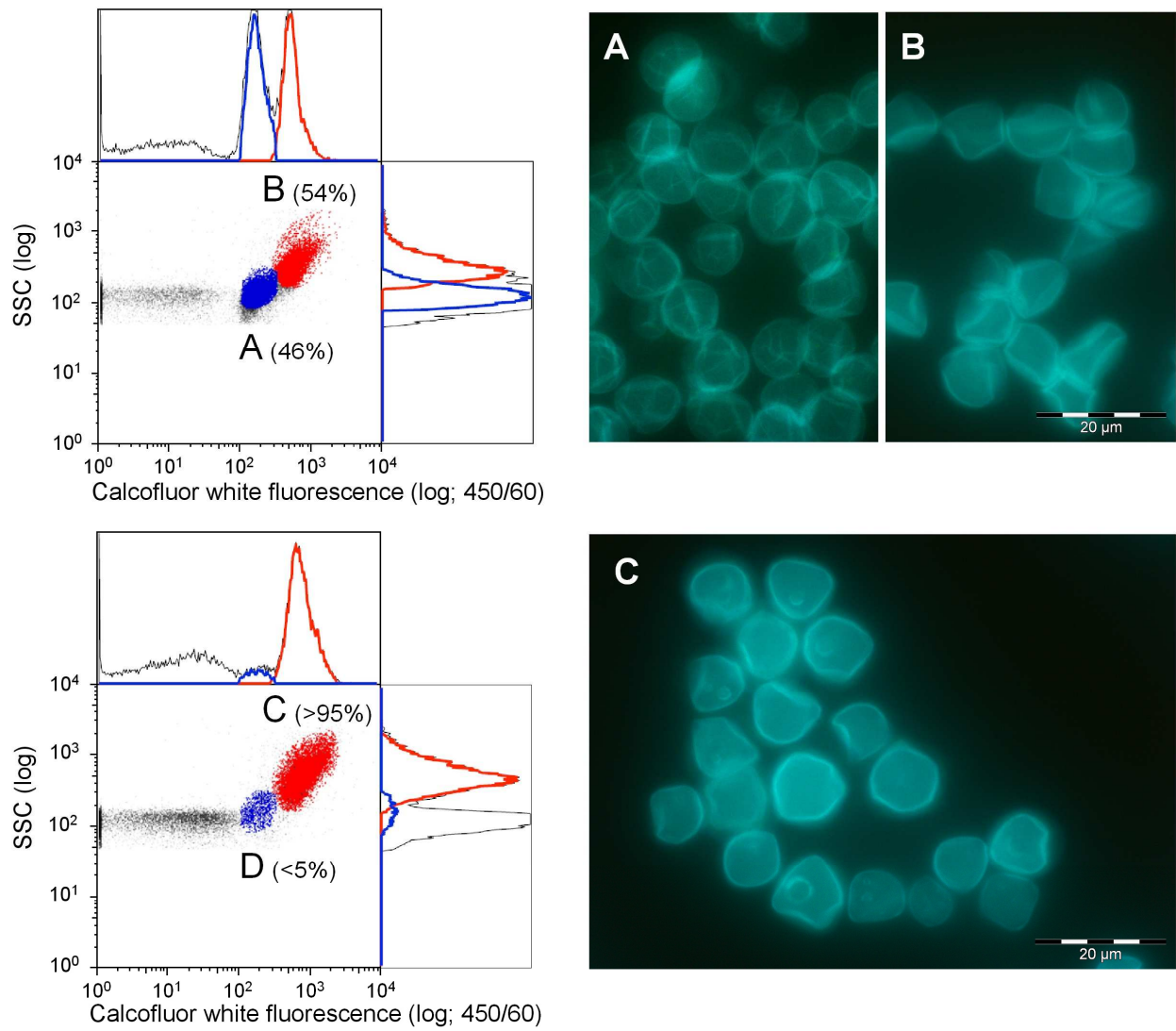


Figure 2



### Discussion et conclusion

Compte tenu du risque pathogène lié aux amibes, de leur capacité à héberger et protéger d'autres micro-organismes, eux-mêmes pathogènes, il est important d'évaluer leur sensibilité aux traitements de désinfection.

Dans cette étude, nous avons testé la résistance aux biocides de kystes d'amibes produits selon deux méthodes distinctes. En effet, il a été montré qu'après une période de culture sur milieu axénique, les amibes perdent leur capacité à s'enkyster et à résister à la chaleur. Cette observation peut donc avoir de grandes répercussions sur les résultats d'efficacité des biocides selon la méthode de culture utilisée pour les trophozoïtes. Nous avons donc fait le choix de tester des kystes issus de trophozoïtes cultivés sur milieu synthétique, méthode la plus fréquemment utilisée, mais aussi de trophozoïtes cultivés sur cellules HEp-2, ce qui semble restaurer leur capacité à s'enkyster.

Nous avons observé que les kystes issus de trophozoïtes cultivés sur PYG sont inactivés par la plupart des traitements de désinfection testés [403]. Seuls un biocide à base de glutaraldéhyde et le peroxyde d'hydrogène ne sont pas totalement efficaces, même après une exposition de 30 minutes. En revanche, les kystes issus de trophozoïtes cultivés sur cellules HEp-2 sont beaucoup plus résistants. En effet, seul le produit à base d'acide peracétique (STERIS-20) est efficace contre toutes les souches d'amibes. Ces kystes sont également plus résistants à la chaleur. Selon le biocide et la souche d'*Acanthamoebae* testés, les profils de résistance varient grandement.

Ces résultats confirment donc l'importance du choix des souches dans les études, de la méthode d'enkystement [122-124, 397] mais également de la méthode de culture des trophozoïtes avant l'enkystement. Les trophozoïtes cultivés en PYG et enkystés en tampon Neff ont déjà été décrits comme immatures. Il s'agissait de trophozoïtes arrondis plutôt que de kystes matures avec une double paroi, et ce, même après 4 semaines d'enkystement [397]. Nos observations indiquent que ces kystes sont également plus sensibles aux traitements de décontamination. De plus, il a été montré que les kystes provenant de souches d'amibes cultivées de façon prolongée en milieu axénique sont plus sensibles aux traitements de décontamination que ceux issus des premiers passages dans ce même milieu de culture [122]. En effet, des études ont montré que des fonctions métaboliques telles que l'enkystement et l'activité de certaines protéases étaient restaurées après 3 passages sur cellules humaines. La résistance semble être liée à la maturité des kystes, il serait nécessaire d'étudier plus en détail

les fonctions « perdues » lors d'une croissance en milieu synthétique et de corrélérer ces effets avec la maturité ainsi que la résistance aux traitements de désinfections des kystes.

Compte tenu de nos résultats, la méthode de culture des trophozoïtes sur cellules [404] semble satisfaisante pour l'obtention de kystes matures dans le but d'évaluer l'efficacité des traitements de désinfection. Néanmoins, il serait nécessaire d'étudier l'effet à long terme de la culture des amibes sur cellules et si le phénomène de régulation négative de certaines activités métaboliques peut se développer dans ces conditions.

Dans la mesure où les résultats des tests de décontamination se sont avérés très différents selon la méthode de culture employée, nous avons voulu étudier plus précisément les différences existantes entre ces deux types de kystes. La résistance des kystes étant en grande partie liée à la présence de cellulose au niveau de la paroi des kystes, nous avons réalisé un marquage de cette cellulose. L'analyse a été effectuée en cytométrie de flux avec pour paramètres, l'analyse du calcofluor et de la granulosité de kystes. A ce jour, des différences aussi bien de granulosité que de marquage sont observées entre les deux types de kystes. Les trophozoïtes produits sur cellules semblent donner une population de kystes homogène et mature contrairement aux trophozoïtes cultivés sur milieu synthétique.

Ces résultats sont donc à prendre en compte pour le développement d'un protocole de référence destiné à l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les kystes d'amibes.

### Travaux complémentaires

D'autres méthodes d'enkystement ayant été décrites, nous avons voulu en tester une troisième. Il s'agit d'enkyster des trophozoïtes cultivés sur milieu synthétique sur une gélose non nutritive (NNA).

Production des kystes NNA :

Les trophozoïtes sont récupérés après croissance en PYG puis lavés deux fois en PBS, repris dans environ 1 ml de PBS et déposés sur une gélose NNA. La gélose est ensuite incubée 7 jours à 33°C puis les kystes sont récupérés en écouvillonnant la surface de la gélose avec 3 ml de solution de Ringer diluée au ¼. Les kystes sont ensuite lavés et traités durant 5 min avec du SDS 0.5% en eau distillée stérile afin de lyser les kystes immatures et de dissocier les agrégats. Ils sont ensuite lavés 2 fois en solution de Ringer diluée au ¼ et stockés à 4°C avant utilisation dans les 15 jours suivants.

Les kystes produits de cette façon ont été utilisés comme précédemment pour évaluer leur résistance aux biocides.

Les résultats obtenus sont les suivants :



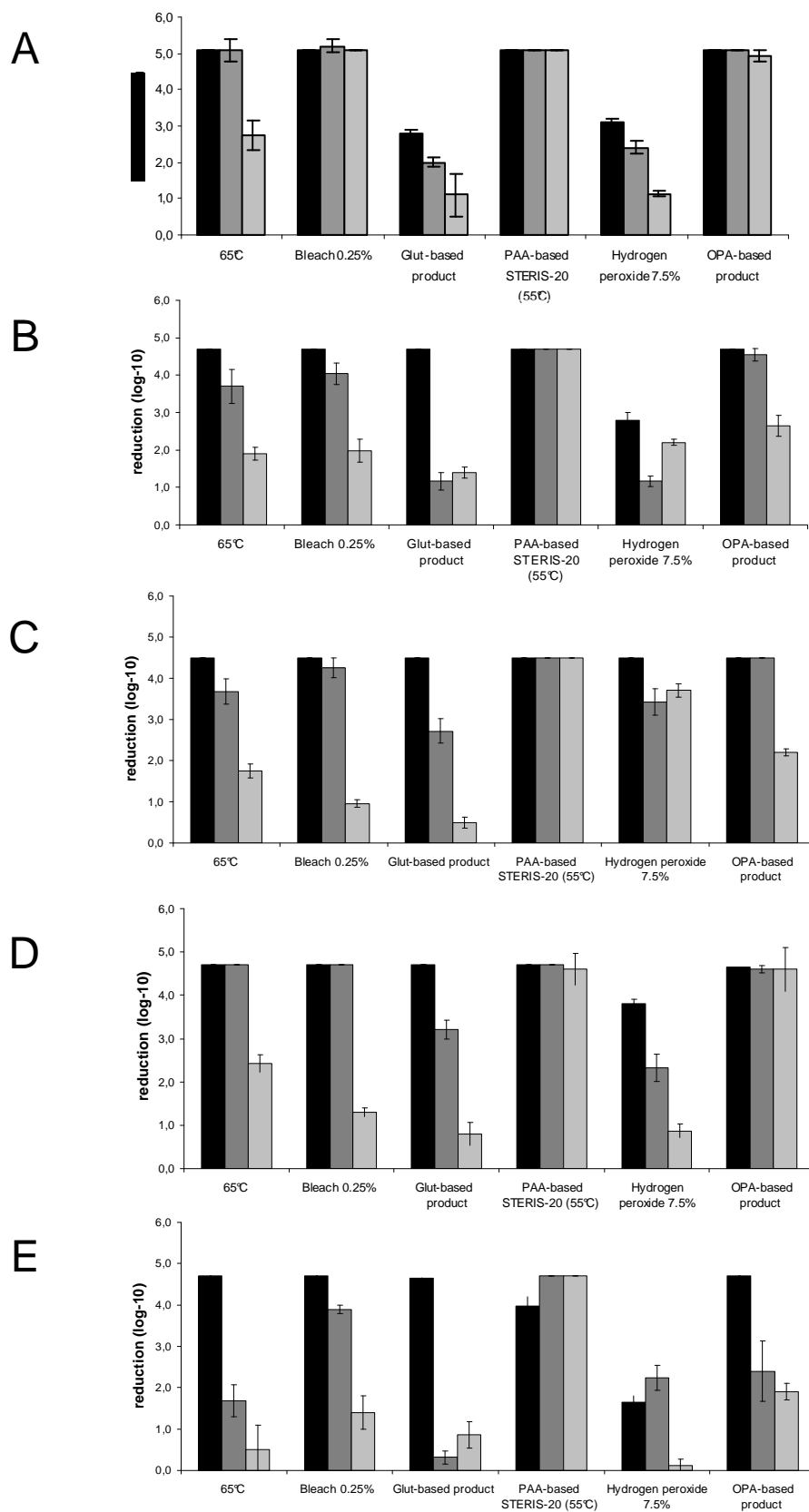


Figure 20: Comparaison de l'efficacité des biocides selon la méthode de production des kystes. Résultats en Log-10 de réduction

*A. castellanii* CCAP 1501/10 (A), *A. castellanii* ATCC 30010 (B), *A. polyphaga* CCAP 1501/18 (C), and 2 souches de genotype T4 isolées d'une rivière (D) et de l'eau d'un hopital (E).

■: trophozoïtes cultivés en PYG et enkysté en tampon Neff;

■: trophozoïtes cultivés en PYG et enkysté sur gélose NNA;

■: trophozoïtes cultivés sur cellules Hep-2 et enkysté en tampon Neff;

Compte tenu des résultats observés les kystes obtenus sur gélose NNA semblent avoir un profil de résistance plutôt intermédiaire par rapport aux kystes obtenus en tampon Neff et issus de trophozoïtes cultivés en PYG ou sur cellules. Il est plus difficile de comparer ces kystes avec les autres dans la mesure où le protocole d'enkystement diffère. Néanmoins, ces kystes sont globalement plus résistants aux traitements que les kystes Neff mais moins que les kystes HEP-2.

Il serait intéressant d'enkyster sur gélose NNA des trophozoïtes cultivés sur cellules HEP-2 afin de pouvoir comparer les résultats obtenus. En effet, dans la mesure où la croissance des trophozoïtes sur cellules et l'enkystement sur gélose semblent produire des kystes plus résistants aux biocides, ces kystes pourraient être plus résistants que les précédents.

Il a été démontré que les trophozoïtes enkystés en tampon Neff produisent des kystes immatures et des trophozoïtes arrondis mais pas de kystes matures avec une double paroi même après 4 semaines d'enkystement contrairement à l'enkystement sur gélose NNA [397].

## **Chapitre IV : L'étude des *Chlamydia*-like**

3<sup>e</sup> Publication:

Article en preparation

Host spectra, survival capacity and susceptibility to biocides of various *Chlamydia*-like compared to *Chlamydia trachomatis*

Céline COULON, Mickael ETERPI, Gilbert GREUB, Anne COLLIGNON, Gerald Mc DONNELL and Vincent THOMAS

Résumé de la troisième publication:

Les *Chlamydia*-like, appartenant aux *Chlamydiales*, sont des bactéries intracellulaires obligatoires, à ce jour divisées en 5 familles distinctes: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*, *Rhabdochlamydiaceae* et *Criblamydiaceae*. Ces bactéries ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces aussi bien chez des mammifères, des insectes, des protozoaires... Les *Chlamydia*-like se sont avérées pathogènes pour l'homme ainsi que pour l'animal, étant à l'origine de diverses infections respiratoires mais aussi d'avortements spontanés. Compte tenu de leur pouvoir pathogène et de leur présence très étendue notamment liée à leur association avec les amibes libres, il existe à ce jour peu de données concernant leur survie et leur résistance aux biocides.

Nous avons montré que les *Chlamydia*-like pouvaient survivre jusqu'à plus de 10 semaines dans l'environnement, selon les conditions et qu'elles étaient capables de se multiplier dans un grand nombre de lignées cellulaires et d'*Acanthamoebae* mais que leur spectre d'hôte diffère d'une famille à l'autre. En revanche, leur résistance aux biocides est limitée. Certaines de ces bactéries sont également capables de survivre dans les kystes d'amibes ce qui pourrait leur conférer une meilleure résistance à ces traitements de désinfection. *Chlamydia trachomatis* semble capable d'infecter certaines souches d'*Acanthamoebae*, voire de s'y multiplier, ce qui pourrait poser des problèmes compte tenu de la présence ubiquitaire de ces amibes et du pouvoir pathogène de ce micro-organisme.

Certaines expériences sont, à ce jour, en cours, elles correspondent aux parties « en rouge » dans l'article suivant. Nous espérons avoir ces résultats d'ici peu afin de pouvoir les présenter lors de la soutenance.

**Title:**

Host spectrum, survival capacity and susceptibility to biocides of various *Chlamydia*-like species compared to *Chlamydia trachomatis*

**Running Title:**

Survival of *Chlamydia*-like

**Keywords:**

*Chlamydia*-like, amoebae, survival, *Chlamydia trachomatis*, biocide, disinfection

**Authors:**

Céline COULON <sup>1,2</sup>, Mickael ETERPI <sup>1</sup>, Gilbert GREUB <sup>3</sup>, Anne COLLIGNON <sup>2</sup>, Gerald Mc DONNELL <sup>4</sup> and Vincent THOMAS <sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>STERIS SA R&D, Fontenay-aux-Roses, FRANCE, <sup>2</sup>Université de Paris-Sud XI - Faculté de Pharmacie - Département de Microbiologie, Châtenay-Malabry, FRANCE, <sup>3</sup>Institute of Microbiology, University Hospital Center and University of Lausanne, SWITZERLAND, <sup>4</sup>STERIS Ltd, Basingstoke, UNITED KINGDOM

**Corresponding author:**

Vincent THOMAS

STERIS SA R&D

18, route du Panorama - 92265 Fontenay-aux-Roses - FRANCE

+33-146548557 (direct)

+33-146549843 (fax)

vincent\_thomas@steris.com

## INTRODUCTION

The *Chlamydiales* order includes two major human pathogens: *Chlamydia pneumoniae*, a causal agent of common respiratory infection and *Chlamydia trachomatis*, responsible for sexually transmitted disease and preventable blindness. During the past decade, the order *Chlamydiales* has been better defined under at least five new families: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Criblamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae* and *Waddliaceae* [405]. These new “*Chlamydia*-like” species are obligate intracellular bacteria that can naturally infect a large range of organisms including insects, fishes and mammals but also unicellular eukaryotic species such as free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Hartmannella* spp., *Naegleria* spp. ...) and social amoebae (*Dictyostelium discoideum*) [334, 405, 406]. Several *Chlamydia*-like species are considered to be emerging pathogens for human and animals. *Parachlamydia acanthamoebae* and *Waddlia chondrophila* are able to enter and multiply within human macrophages which represent the first line of defence of the innate immune system [306, 407]. *P. acanthamoebae* can also infect other lung cells such as fibroblasts or pneumocytes [317] and might be implicated in bronchitis, community-acquired pneumonia and others respiratory diseases [260, 308, 316]. Several reports also suggest that *P. acanthamoebae* could be involved in adverse pregnancy outcomes including human miscarriage and bovine abortion [283, 408-410]. *W. chondrophila* has been isolated from aborted bovine foetus and could also be involved in miscarriages and stillbirths in human and animals [280, 333, 409]. *Simkania negevensis* has been isolated as a contaminant of cell culture [278] and might be implicated in different respiratory tract infections [286, 287, 295]. In recent serological studies, *Criblamydia sequanensis* and *Protochlamydia naegleriophila* have been associated with asthma and pneumonia, respectively [328, 411]. Epidemiological data suggest that “*Chlamydia*-like” organisms may be zoonotically transmitted, but infection through contaminated water, food or other contact might also be the mode of transmission to human.

Importantly, amoebae are ubiquitous in the environment and can be recovered from natural and domestic water systems but also soil, air, dust, sewage and sediments [381]. Due to association with free-living amoebae (FLA), *Chlamydia*-like are potentially as widely spread as FLA in the environment and have been detected and/or isolated alone or in association with FLA from natural water samples as well as domestic water samples [262, 327, 329, 412, 413]. Despite increasing health concern, only little is known about survival capacity of *Chlamydiaceae* and *Chlamydia*-like as free bacteria in the environment. Several studies reported survival of *C. pneumoniae* dried onto various surfaces for several hours only [414]. However new research suggest that *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* can remain metabolically active and/or infectious for much longer time than previously thought [415, 416]. Furthermore it has also been recently demonstrated that *P. acanthamoebae* strain Bn9 can potentially survive for several days when free bacteria are dried onto surfaces, and several weeks when suspended in liquid medium [417]. Measurement of metabolic activity also revealed long-term extracellular activity of *P. naegleriophila* [416]. Altogether these results suggest that in addition to association with amoebae that obviously play an important role in their ecology, *Chlamydiales* could be considered as environmental persisters even in the absence of amoebae. In this study we tested host spectra, survival capacities and resistance to common disinfection treatments of five *Chlamydia*-like strains and one *C. trachomatis* strain.

## **MATERIAL & METHODS**

### **Eukaryotic cells**

Eleven Free-Living Amoebae (FLA) strains including 5 reference strains (*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, *A. castellanii* CCAP 1501/10, *A. castellanii* ATCC 30234 *Acanthamoeba polyphaga* CCAP 1501/18 and *Acanthamoeba lenticulata* ATCC 30841) and 6 strains previously isolated from the environment [37, 412] were cultivated in PYG at 28°C

[37]. Fourteen mammalian cell lines were also used to test host susceptibilities: A549 ATCC CCL-185 (human lung carcinoma epithelium), HEp-2 ATCC CCL-23 (human epidermoid carcinoma), BT ATCC CRL-1390 (bovine turbinate epithelium), Bu ECACC 89051704 (buffalo lung fibroblast), EBL DSMZ ACC192 (bovine embryo lung), MDBK ATCC CCL-22 (bovine kidney epithelium), MDCK ATCC CCL-34 (canine kidney epithelium), A-72 ATCC CRL-1542 (canine carcinoma fibroblast), Mv1 Lu ATCC CCL-64 (mink lung epithelium), BGM ECACC 90092601 (monkey kidney), ST ATCC CR-1746 (porcine testicular fibroblast), and MA-104 CRL-2378 (monkey kidney).

### **Bacterial strains**

We used the following *Chlamydia*-like strains in this study: *Parachlamydia acanthamoebae* ATCC VR-1476 (strain Bn9), *P. acanthamoebae* strain Hall coccus (Hc), *Waddlia chondrophila* ATCC VR-1470, *Protochlamydia naegleriophila* and *Criblamydia sequanensis* [224]. *Chlamydia trachomatis* DSM19102, a strain responsible for LymphoGranuloma Venereum (LGV), was used as a representative of *Chlamydiaceae*. HEp-2 cells ATCC CCL-23 were used to cultivate *C. trachomatis*. Briefly, bacteria were seeded onto confluent cells monolayers cultivated in 25-cm<sup>2</sup> flasks in DMEM + 5% FCS, the flasks were then centrifuged at 1,500 rpm for 30 min and incubated at 37°C until bacterial overgrowth and complete cell lysis were observed (5 to 7 days).

### **Rapid screening of growing capacity of *Chlamydia*-like species in various amoebal and animal cell lines**

Approximately 10<sup>5</sup> freshly harvested bacteria were used to inoculate 24-wells plates seeded with 10<sup>5</sup> amoebae in 500 µl PYG 0.1X or 3.10<sup>4</sup> cells in 500 µl DMEM. Plates were centrifuged for 30 min at 1,500 rpm and incubated at 33°C (amoebae) or 37°C (cells). Plates



were then observed every day during one week to detect any cytopathic effect and/or bacterial growth. After testing susceptibility of various cell lines to infection we selected hosts cells *A. polyphaga* CAAP 1501/18 for both *P. acanthamoebae*, *A. castellanii* CCAP 1501/10 for *C. sequanensis* and *P. naegleriophila*, and BT cells ATCC CRL-1390 for *W. chondrophila*. Bacteria used in further experiments were grown in these host cells for 5 to 7 days at 33°C (amoebae) or 3 to 5 days at 37°C (mammalian cells).

### **Fluorescent *in situ* hybridization**

These experiments were performed to confirm intracellular growth of *P. naegleriophila* in canine cell line A-72. Experimentally infected cell monolayers were directly fixed within the plates at various time points spanning the complete chlamydial developmental cycle by adding 4% paraformaldehyde and leaving in contact for 2 hours at room temperature. Fixed cells were recovered from the wells by gentle scrapping and stored at -20°C in ethanol-PBS v/v. Cells were then deposited on wells of Teflon poly-lysine coated glass slides, dried and dehydrated with increasing concentrations of ethanol (50, 80, and 96%). Wells were then covered with 20 µl of hybridization buffer (25% formamide, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 20 mM Tris/HCl, pH 7.6) containing 100 ng of the *Chlamydiales* specific probe S-O-Chls-0523-a-A-18 (5'- CCT CCG TAT TAC CGC AGC -3') labelled with Cy3 in 5', and incubated for 2 h at 46°C in the dark [418]. Slides were then immersed in pre-heated washing buffer (180 mM NaCl, 0.01% SDS, 5mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 7.6) for 10 min at 48°C, rinsed with cold distilled water, dried at room temperature and mounted with an anti-fading reagent (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen). Hybridized slides were observed with a Olympus IX 71 inverted microscope equipped with a X-cite® 120Q fluorescence illuminator.

**Growth and survival of *C. trachomatis* in various *Acanthamoeba* spp**

*A. castellanii* ATCC 30010, *A. castellanii* CCAP 1501/10 and *A. castellanii* ATCC 30234 were used to test intra-amoebal growth of *C. trachomatis*.

Six-wells plates were inoculated with  $10^7$  amoebae in 2 ml PYG 0.1X or with  $10^6$  HEp-2 cells in 2 ml DMEM per well.  $10^7$  freshly harvested *C. trachomatis* were then inoculated in wells, plates were centrifuged for 30 min at 1,500 rpm and incubated overnight at 33°C or 37°C for amoebae, 37°C for cells. Medium was then removed and replaced by fresh medium and plates were re-incubated for 3, 7, 10, 13 days at 33°C or 37°C for amoebae, 37°C for cells. All samples were prepared in triplicate. As a control, survival of *C. trachomatis* in PYG 0.1X alone was also evaluated. To estimate infectious titres of co-culture supernatants, infected amoebae were detached by vigorous scrapping and the recovered suspension was centrifuged for 10 min at 14,000 rpm. Supernatant was discarded and replaced by 600 µl of saponin 0.1% final concentration in PBS. Amoebae were lysed by passing them three times through a 27-gauge needle [216] and bacteria were then pelleted by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min. Pellets were re-suspended in 1 ml DMEM and serial-diluted onto HEp-2 cells seeded in wells of 96-wells plates that were then centrifugated at 1,500 rpm for 30 min and incubated at 37°C + 5% CO<sub>2</sub> to allow bacterial growth. Wells were counted as positive only when visible bacterial growth was observed. Bacterial titre was then evaluated using the Spearman-Kärber method.

In parallel, infected amoebae prepared the same way were harvested by gentle scrapping, centrifuged at 800 rpm for 5 min to pellet amoebae, then fixed in methanol for 5 min and processed with the Pathfinder *Chlamydia* detection kit (Biorad) to detect *C. trachomatis* within amoebal cells.

### **Free *Chlamydiales* survival tests**

Infected cells supernatants were collected, 5µm-filtered to remove most cells fragments, centrifuged 30 min at 5,000 rpm, washed in sterile distilled water and adjusted to McFarland 1, corresponding to  $10^7$  to  $10^8$  bacteria/ml as determined by infecting susceptible cells with 10-fold serial dilutions.

(i) For surface tests, bacteria were serial-diluted in sterile distilled water + 0.3% BSA (clean conditions) or 3% BSA + 3% sheep erythrocytes (dirty conditions); 8 x 20 µl of each dilution were then deposited in 96 wells plates and dried for 1 h under laminar flow hood. Plates were then stored in the dark at room temperature. After 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days, 180 µl suspensions of susceptible cells were added in the wells, plates were centrifuged at 1,500 rpm for 30 min and incubated at 33°C (amoebae) or 37°C (mammalian cells) for one week to allow intracellular growth of bacteria. Bacterial titre was then evaluated using the Spearman-Kärber method and the reduction in bacterial viability after each tested incubation time was calculated.

(ii) For liquid tests bacteria were suspended in autoclaved tap water or PYG, incubated at room temperature and 8 x 20 µl of each dilution were seeded in wells containing 180 µl of host cells suspensions at the same time intervals than for surface study.

Each test was repeated four times.

### **Free *Chlamydiales* disinfection tests**

McFarland 1 suspensions of bacteria in sterile distilled water were diluted 1/10 in product to be tested and incubated for 10 min at appropriate temperature (room temperature or 55°C). Bacteria were then re-suspended in D/E neutralizing broth for 5 min. After centrifugation at 14,000 rpm for 5 min, bacteria were re-suspended in PYG or DMEM and serial-diluted onto appropriated host cells in 96 wells plates (1 column per dilution) and plates were centrifuged

at 1,500 rpm for 30 min. After 5 to 7 days incubation at 33°C (amoebae) or 3 to 5 days at 37°C (mammalian cells), plates were observed for bacterial growth and log reductions were calculated using the Spearman Karber method. Each test was repeated four times

### **Survival in amoebal cysts**

These tests were performed for *Criblamydia sequanensis* only since survival capacity of this species within cysts has never been investigated before. *A. castellanii* CCAP 1501/10, *A. polyphaga* CCAP 1501/18, *Acanthamoeba* sp1 and *Acanthamoeba* sp4 were grown in 25-cm<sup>2</sup> PYG flasks until confluency. Flasks were infected with *C. sequanensis* at MOI of 1 and 10 bacteria for 1 amoeba. Flasks were centrifuged at 1,500 rpm for 30 min and incubated overnight at room temperature. Medium was then removed and replaced by Ringer broth. Amoebae were recovered by scrapping, washed in Ringer broth, laid on Non Nutrient Agar (NNA) plates for one week at 4°C, room temperature or 33°C to allow encystment. After one week, cysts were recovered by scrapping and incubated in 3% HCl for 3 days at room temperature to kill non-mature cysts and extracellular bacteria. For de-encystment, cysts were washed 2 times in Ringer broth, laid on NNA plates covered with heat-inactivated *E. coli* and incubated for one week at 28°C. After de-encystment, trophozoites were recovered and grown in PYG. After 5 to 7 days incubation, samples were fixed in PFA 4% for 2 h and hybridized with the *Chlamydiales* probe as described above.

### **Transmission electron microscopy**

These experiments were performed for *C. sequanensis* to observe special features that were detected with this species only. A 7-days old amoebal co-culture sample was centrifuged at 5,000 rpm for 15 min, washed in PBS, then fixed in 2.5% glutaraldehyde for one night, post-fixed for 1 h in 0.1 M cacodylate buffer plus 1% osmium tetroxide for one night, stained with

uranyl acetate 0.25% for one night, dehydrated and embedded in epoxy resin. Thin sections (50-60 nm) were stained with uranyl acetate (5 min) and lead citrate (5 min), being then examined with a Philips EM 208 electron microscope.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Fisher's exact to compare numbers of wells infected by each bacterial strain serial-diluted onto susceptible cells after survival or disinfection tests. Statistical significance was set at an alpha level of 0.05.

## RESULTS

### *Chlamydia*-like host susceptibility tests

Both *P. acanthamoebae* strains infected very efficiently all *Acanthamoeba* strains, leading to complete cell lysis and bacterial overgrowth within 5 to 7 days (Table 1). The only exception was with *A. lenticulata* ATCC 30841 and *Acanthamoeba* sp. 6, an environmental isolate previously identified as *A. lenticulata* due to the presence of a typical intron in its 18S rRNA gene. In this case *P. acanthamoebae* strain Hc was able to infect the amoebae almost as efficiently as other amoebal strains, whereas *P. acanthamoebae* strain Bn9 did not produce any visible infection. *Protochlamydia naegleriophila* grew efficiently within 5 to 7 days in all amoebal strains. *C. sequanensis* was able to infect all tested amoebal strains, with generally large numbers of free bacteria as well as vesicles of variable sizes (approx. 2 to 10  $\mu\text{m}$  diameter) being observed at the end of the infection cycle (4 to 5 days) with this *Chlamydia*-like species (Fig. 1). Here again, both *A. lenticulata* strains were less susceptible to infection by *C. sequanensis*, with lower amounts of extracellular bacteria and almost no vesicles observed ten days after infection. *W. chondrophila* ATCC VR-1740 could visibly grow in only 7 of the 11 amoebal strains tested, with important growth being observed only with *A. castellanii* ATCC 30010 and *Acanthamoeba* sp.3 after 7 to 10 days incubation.

Concerning growth of *Chlamydia*-like strains within mammalian cell lines, only *W. chondrophila* was able to efficiently infect all tested cell lines, leading to rapid cell lysis and producing high amounts of bacteria in 3 to 5 days (data not shown). *P. naegleriophila* was able to infect A-72 cells very efficiently, which was confirmed by FISH using the *Chlamydiales* probe (Fig.2). We did not detect any visible growth with this same species in other cell lines. *C. sequanensis* produced important cytopathic effect on BT cells (rounded cells and eventually cell lysis) but we could not detect any bacterial proliferation in this and other cell lines.

### ***C. trachomatis* host susceptibility tests**

*C. trachomatis* DSM19102 efficiently infected mammalian cell lines tested in our study, with a rapid and important proliferation observed within 3 to 5 days (data not shown). The only exception was with cells Bu and BGM for which only weak bacterial proliferation was observed.

Concerning survival and growth in *Acanthamoeba* spp:

Ces expérimentations sont en cours de finalisation. Les tests de marquage des *C. trachomatis* dans les amibes avec le kit d'immunofluorescence semblent indiquer une internalisation et une survie des *C. trachomatis* puisque des amas intracellulaires de bactéries sont observables 7 à 10 jours après le début de l'infection (Fig.3). Des tests de dénombrement des *C. trachomatis* infectieuses et de PCR quantitative devraient être finalisés dans les semaines à venir et confirmeront ou au contraire infirmeront l'hypothèse d'une survie de *C. trachomatis* dans les amibes. Nous espérons pouvoir présenter ces résultats lors de la soutenance, et soumettre l'article finalisé avant cette soutenance.

### **Survival tests**

*C. trachomatis* survived less than one week in most tested conditions (Fig.4). The only exception was when suspended in PYG, with few survivors being still observed after 1 week incubation in this condition; no survivors were observed after two weeks. Conversely, all *Chlamydia*-like strains survived much longer in all tested conditions ( $P < 0.05$ ). For these strains better survival was observed when in suspension than when dried on surfaces ( $P < 0.05$ ). All *Chlamydia*-like strains except *P. naegleriophila* survived more than 10 weeks when suspended in rich medium PYG. When suspended in sterile tap water, both *P. acanthamoebae* as well as *W. chondrophila* survived for more than 10 weeks, which was

longer ( $P < 0.05$ ) than for *C. sequanensis* and *P. naegleriophila* that survived less than 6 weeks. When dried onto surfaces, better survival ( $P < 0.05$ ) was observed in the presence of blood (dirty conditions) than in the presence of 0.3% BSA only (clean conditions). In dirty conditions, both *P. acanthamoebae* strains survived statistically longer (6 to 7 weeks) than other strains (3 to 4 weeks,  $P < 0.05$ ) whereas the difference was not significant in clean conditions (3 to 4 weeks for all strains).

### **Disinfection test**

*C. trachomatis* was fully inactivated by all tested treatments including exposure at 55°C for 10 min (Table 2). *P. acanthamoebae* Bn9, *P. naegleriophila* and *W. chondrophila* were also fully inactivated after exposure to chemical biocides but presented higher resistance ( $P < 0.05$ ) to heat, with only 0.3 to 2.2-Log<sub>10</sub> reductions achieved after exposure at 55°C for 10 min (Table 2). Resistance to heat was also observed for *P. acanthamoebae* Hc and *C. sequanensis*; *P. acanthamoebae* Hc also presented significant ( $P < 0.05$ ) resistance to 7.5% hydrogen peroxide whereas *C. sequanensis* survived exposure to an OPA-based product (not statistically significant with  $P = 0.055$ ).

### **Survival of *C. sequanensis* in amoebal cysts**

No overgrowth of *C. sequanensis* was observed after de-encystment of tested *Acanthamoeba* spp and incubation for 7 days at 33°C in PYG. This result was confirmed by FISH with the *Chlamydiales* probe: we could not detect bacteria in trophozoites.



### **Transmission Electron Microscopy**

TEM on *C. sequanensis* co-culture supernatants revealed high numbers of rounded, very regular structures resembling early stage of amoebic cyst wall formation and that were filled with bacteria. A structure presenting fibrillar aspect delimited these vesicles.

## DISCUSSION

New *Chlamydiales* species termed “*Chlamydia-like*” were discovered these last few years. From a public health perspective most *Chlamydia-like* species are considered as emerging pathogenic species for human as well as animals (mostly cattle), being associated with respiratory infections [311, 316, 419] as well as abortion and premature birth [356, 408, 410]. Despite increasing evidence of pathogenicity there is still a paucity of information concerning important traits of *Chlamydia-like* species. Only little is known about growth capacity of *Chlamydia-like* in various mammalian cell lines. *W. chondrophila* (strain 2032/99) as well as *Waddlia malaysiensis* have been demonstrated to grow in various animal and human cell lines including macrophages [292, 335, 407], as did *Simkania negevensis* ATCC VR-1471 [287, 372]. In our study we confirmed that *W. chondrophila* ATCC VR-1740 (strain WSU 86-1044) grow in high numbers in all tested cell lines, whereas productive growth (i.e. many bacteria being visually detected in infected cells as well as in the medium) was limited to only two amoebal strains. Limited growth in other amoebae might be due to the fact that we used HEp-2 cells to grow *Waddlia* stocks; it has been reported by others that primary host chosen to grow this species highly impacts its ability to grow in secondary hosts, with amoebae-grown *W. chondrophila* (strain 2032/99) being more likely to grow in other amoebal species than BGM-grown *W. chondrophila* [297]. The same has been reported for *S. negevensis* ATCC VR-1471 [296]; we did not use this species in our experiments since despite many attempts made using previously described methods [278] we were unable to grow it in sufficiently high numbers for survival and disinfection tests (data not shown). Growth of *Parachlamydia acanthamoebae* strains in various cell lines remains controversial since authors reported efficient growth of isolate UV-7 in Vero, NCI and HeLa cells [321] whereas others did not succeed cultivating strains Bn9 and Hc in Vero, McCoy, P388D1 macrophage-like cells, or human embryonic lung fibroblast cells [358]; similarly it has been reported that strain Hc

enters and multiplies within human macrophages [306] whereas others reported that strain Bn9 does not grow in THP-1 cells [420]. We were not able to distinguish any visible growth or cytopathic effect for both *P. acanthamoebae* strains in cell lines used in our study. However it was striking to note that strain Bn9 was not able to grow efficiently in both *A. lenticulata* strains whereas strain Hc grows very well in all tested amoebae. In light of previously published results this argues in favour of higher virulence of strain Hc (first isolated from an amoeba cultivated during an outbreak of humidifier fever [421]) compared to strain Bn9 (first isolated from an amoeba cultivated from the nose of a healthy individual [422]). Further studies are required to understand observed differences in virulence of *P. acanthamoebae* strains and in susceptibility of *Acanthamoeba* species. Additional testing of growth of other (more than 5) *P. acanthamoebae* isolates described so far in macrophages and various amoebae including *A. lenticulata* ATCC 30841 could also bring valuable information to better understand virulence factors at play in this important species often associated with respiratory infections [316] and bovine abortion [410]. *P. naegleriophila* (initially isolated from a *Naegleria* species [369]) also belongs to the *Parachlamydiaceae* but unlike *P. acanthamoebae* it has a wide amoebal host range and a weak selectivity [369], which were confirmed in our study with efficient growth being observed in all tested *Acanthamoeba* isolates including both *A. lenticulata* strains. To our knowledge growth of *P. naegleriophila* in A-72 cells of canine origin is the first report for growth of a *Protochlamydia* species in a mammalian cell line. Growth of *Protochlamydia amoebophila* in A-72 cells will have to be tested in future studies, as well as investigating if it is of any significance concerning pathogenicity of *Protochlamydia* species towards selected categories of animals and potential zoonotic transmission. *Criblamydia sequanensis* is the first described species of the *Criblamydiaceae* family [224], recently enriched with *Estrella lausannensis* [332]; both species were isolated from drinking water plants. *C. sequanensis* grows efficiently in most

*Acanthamoeba* isolates tested except *A. lenticulata* strains for which only limited growth was observed. The multitudes of structures of various sizes formed at the end of the infection (except with *A. lenticulata* strains) resemble structures previously described for *Legionella pneumophila* after infection of *Acanthamoeba* spp [197, 423]. These structures are of respirable size (approx. 2 to 10  $\mu\text{m}$  diameter), which could reveal important if association of *Criblamydia* species with asthma suggested in serological studies [411] is confirmed.

Survival of *Chlamydia pneumoniae* has been reported in *A. castellanii* [216] and a *Chlamydiales* isolate closely related to *C. trachomatis* has been observed co-infecting a clinical isolate of *Acanthamoeba* together with a *Legionella* sp. [424]. Conversely, *Chlamydia abortus* did not appear to propagate and was likely digested by *A. castellanii* [425]. It is thus difficult to conclude from these experiments about possible interactions between pathogenic *Chlamydia* species and FLA. *Chlamydia trachomatis* DSM19102 is a lymphogranuloma venereum (LGV) group II biovar. LGV strains are more invasive than those of serovars A-K, can cause systemic infections, infect monocytes and disseminate to the local lymph nodes. This strain grew very efficiently in all tested cell lines, thus confirming its high virulence. When infecting *Acanthamoeba* spp we did not observe any evident cytopathic effect as observed with cells of human and animal origin.

La partie concernant l'éventuelle survie/croissance de la souche *C. trachomatis* DSM19102 dans les amibes sera insérée à cet emplacement.

In this study we demonstrated that *C. sequanensis* is apparently not able to survive within cysts of *Acanthamoeba* spp. Thus, with the exception of *W. chondrophila* within cysts of *Vahlkampfia ovis* (generally reported to be less resistant to biocides than cysts of *Acanthamoeba* and *Hartmannella* [376]), all *Chlamydia*-like species tested in our study are supposed to be found in the environment as free bacteria or in amoebal trophozoites. It was

consequently important to investigate survival capacity and resistance to disinfection of free bacteria.

Survival tests demonstrate that conversely to *C. trachomatis* all tested *Chlamydia*-like display significant survival capacity when dried onto surfaces or suspended in liquid media. Importantly, both *P. acanthamoebae* strains survived 6 to 7 weeks when dried in the presence of blood and more than 10 weeks in water or rich medium. Longer survival times of strain Bn9 compared to data reported for the same strain by Fukumoto *et al* [417] are likely due to differences in methods used: drying of 100 µl bacteria in the absence of any organic soil in their study versus drying of 8 x 20 µl in the presence of 0.3% or 3% BSA with or without additional presence of blood in our study. As demonstrated by longer survival times in the presence (6 to 7 weeks) than in the absence (3 to 4 weeks) of blood, the presence of organic soil dramatically enhances survival of both *P. acanthamoebae* strains dried onto surfaces. We did not test survival capacity of extracellular *S. negevensis* in our study but Kahane *et al.* previously reported that this species survives for at least 7 days in sterile distilled water at room temperature [426].

We also tested susceptibility of free *Chlamydia*-like to biocides commonly used in healthcare settings and found that most treatments are fully efficient against these bacteria. The most notable exception was heat-resistance that could be a concern since heat-shock treatments with a 65°C minimum requirement are commonly used to control proliferation of *L. pneumophila* in water distribution networks [398]. Limited resistance of *P. acanthamoebae* Hc to liquid hydrogen peroxide also deserves further investigation since this biocide is often used at lower concentrations in chemical formulations used for contact lenses sanitization [126]. Limited resistance of *C. sequanensis* to the OPA-based product was surprising since OPA presents good activity against many bacterial species; we suspect it might be due to limited penetration of the biocide in vesicles filled with bacteria however this will need

further demonstration. Overall, these results tend to demonstrate that disinfection treatments used to treat surfaces and medical devices are efficient against free *Chlamydia*-like. In a recent study the same treatments were also demonstrated to be efficient against trophozoites of several *Acanthamoeba* spp, with the notable exception of glutaraldehyde presenting limited activity [388]. In these applications, *Chlamydia*-like species preventing cyst formation by infected hosts (i.e. *P. acanthamoebae*, *C. sequanensis*, *P. naegleriophila* and *N. hartmannellae*) are thus likely to be fully inactivated by biocides active against trophozoites. To the opposite, *Chlamydia*-like species that can survive within amoebal cysts (*W. chondrophila*, *P. amoebophila*, *S. negevensis*) are likely to be protected from the action of biocides presenting limited efficacy against amoebal cysts (for a review see [387]). Importantly, lower concentrations of treatments used for other applications might be efficient against trophozoites but not against free *Chlamydia*-like bacteria: this could be the case for chlorine that efficiently inactivated trophozoites of *Acanthamoeba* spp exposed to 1-3 ppm free chlorine for 60 min [427] whereas in another study *S. negevensis*, as free bacteria or in trophozoites of *A. polyphaga*, was left unaffected after exposure to 0.5 ppm chlorine for 20 min [426].

As a conclusion, it seems that *Chlamydia*-like present very good extracellular survival capacity compared to *C. trachomatis*. Extended survival capacity certainly account for ubiquitous presence in the environment that has been described for these micro-organisms. However these potentially pathogenic species are relatively easily inactivated when outside of their amoebal hosts and when using relatively high biocide concentrations currently used to treat surfaces and medical devices. Survival within cysts remains a concern since they can resist even these high concentrations [388]. Lower residual concentrations of disinfectant used for other applications (drinking water industry...) have been described to be only partially

active against amoebal cysts and trophozoites; resistance of *Chlamydia*-like to these less drastic conditions needs to be further investigated.

Table 1: Growth of five *Chlamydia*-like strains in various *Acanthamoeba* isolates<sup>a</sup> Large numbers of vesicles of various sizes were observed at the end of the infection

Host protozoa	<i>P. acanthamoebae</i> Bn9	<i>P. acanthamoebae</i> Hall Coccus	<i>Protochlamydia</i> <i>naegleriophila</i>	<i>Criblamydia</i> <i>sequanensis</i>	<i>W. chondrophila</i> ATCC VR-1740
<i>A. polyphaga</i> CCAP 1501/18	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+
<i>A. castellanii</i> CCAP 1501/10	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+
<i>A. castellanii</i> ATCC 30010	++	++	++	++ <sup>a</sup>	++
<i>A. castellanii</i> ATCC 30234	+++	+++	+++	++ <sup>a</sup>	-
<i>A. lenticulata</i> ATCC 30841	-	+++	+++	+	-
<i>Acanthamoeba</i> sp.1 (EB26)	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+
<i>Acanthamoeba</i> sp.2 (EB 5/3)	++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	-
<i>Acanthamoeba</i> sp.3 (EB 19)	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	++
<i>Acanthamoeba</i> sp.4 (ApCHUV)	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+
<i>Acanthamoeba</i> sp.5 (ME 8/2)	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+
<i>Acanthamoeba</i> sp.6 (ME71 <i>A. lenticulata</i> )	-	++	++	+	-



Table 2: Bactericidal efficacy of biocidal treatments, including unformulated active compounds, active compounds in formulation and moist heat, against five *Chlamydia*-like strains and *Chlamydia trachomatis* DSM19102. Log<sub>-10</sub> reductions are reported.

Products tested	<i>P. acanthamoebae</i> Bn9	<i>P. acanthamoebae</i> Hall Coccus	<i>Protochlamydia</i> <i>naegleriophila</i>	<i>Waddlia</i> <i>chondrophila</i>	<i>Criblamydia</i> <i>sequanensis</i>	<i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i>
Bleach 0.25%	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Bleach 2.5%	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Ethanol 70%	>4.3	4.6 ± 0.1	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Glutaraldehyde 2%	>4.3	4.5 ± 0.1	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Glutaraldehyde-based product	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	5.1 ± 0.4	>4.4
Hydrogen peroxide 7.5%	>4.3	3.5 ± 0.4	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Hydrogen peroxide-based Sporklenz	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Orthophthalaldehyde (OPA) 0.55%	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
OPA-based product	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	4.4 ± 0.2	>4.4
Peracetic Acid 0.2%	>4.3	4.4 ± 0.2	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
PAA-based STERIS-20	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Control 55°C	0.3 ± 0.0	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.2	2.2 ± 0.1	3.7 ± 0.2	>4.4

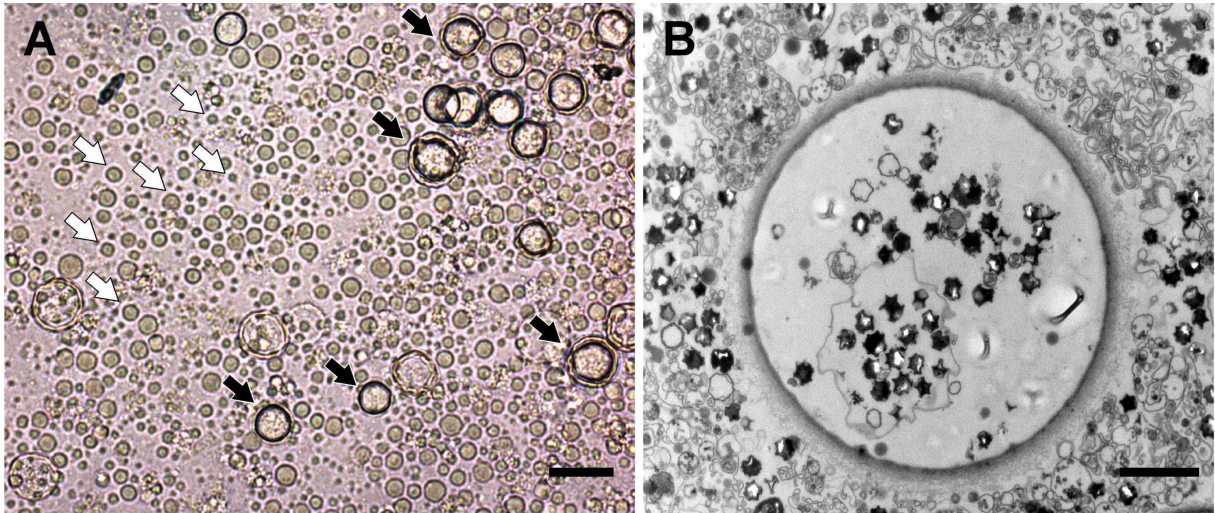


Figure 1: Vesicles of variable sizes observed at the end of the infection cycle of most *Acanthamoeba* spp (except *A. lenticulata*) by *C. sequanensis*. Encysted amoebae (black arrows) are shown together with vesicles (white arrows) on picture A (bar = 20  $\mu$ m). TEM observation of one single vesicle filled with bacteria is shown on picture B (bar = 2  $\mu$ m).

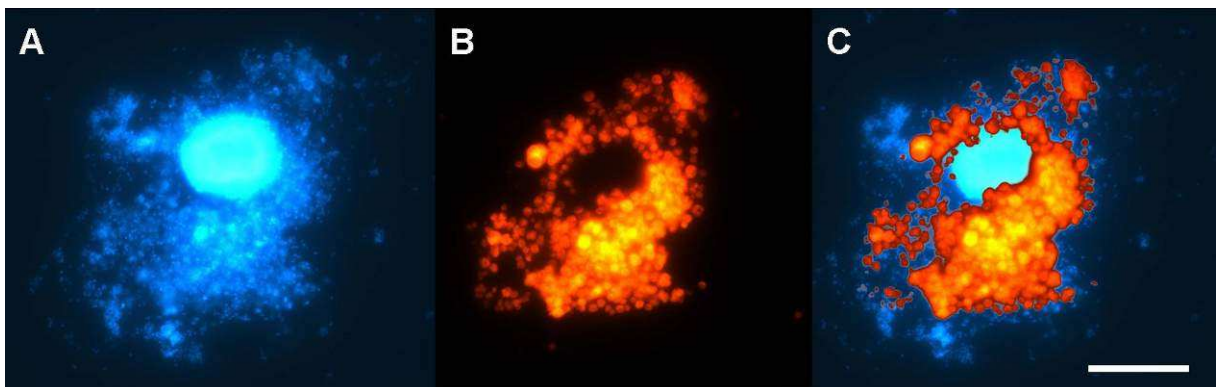


Figure 2: A-72 cells hybridized with the *Chlamydiales* specific probe 5 days after infection by *P. naegleriophila*. A: DAPI-staining, B: Cy3-staining (probe), C: overlay. Bar = 20  $\mu$ m

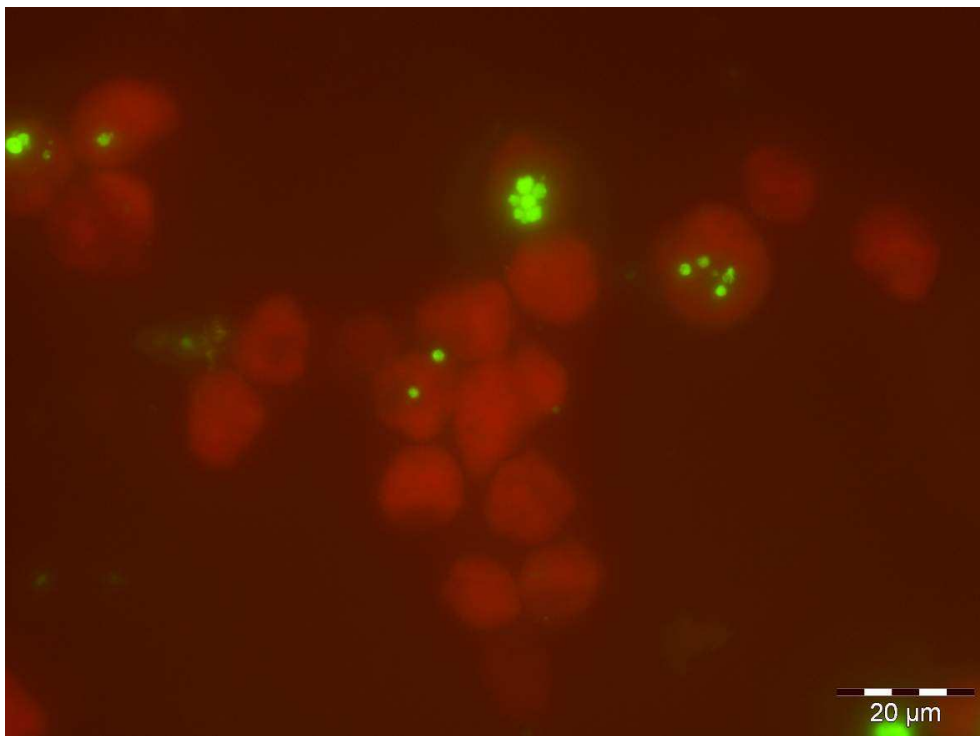
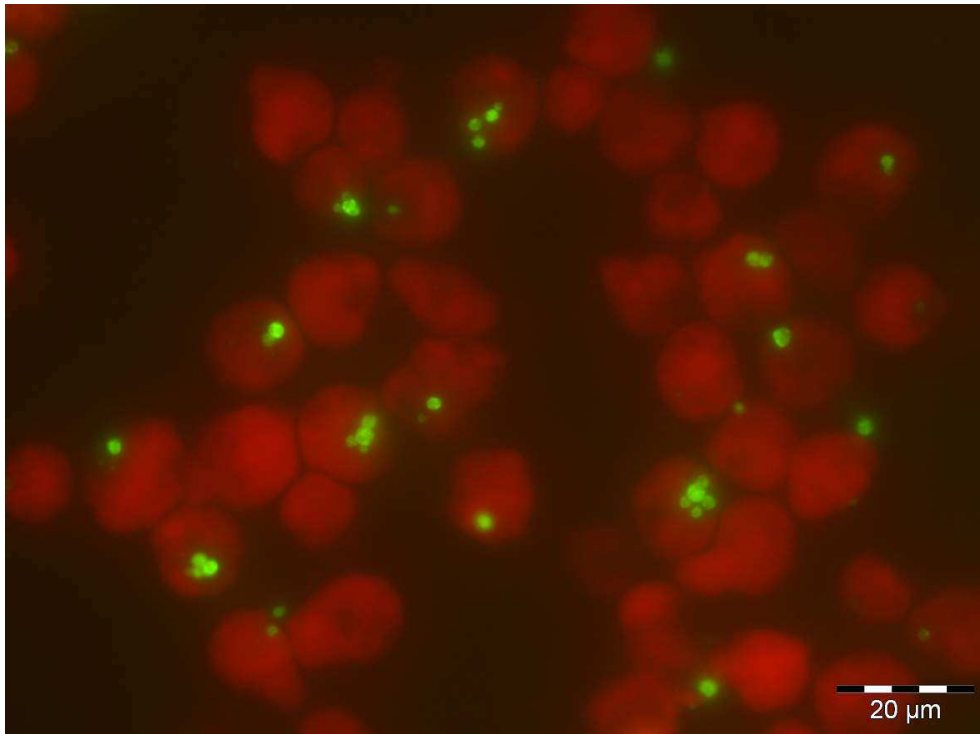


Figure 3: *Acanthamoeba* sp2 infected by *C. trachomatis* DSM19102 as observed seven days after infection. *C. trachomatis* was detected by immunofluorescence using the Pathfinder *Chlamydia* detection kit (Biorad).

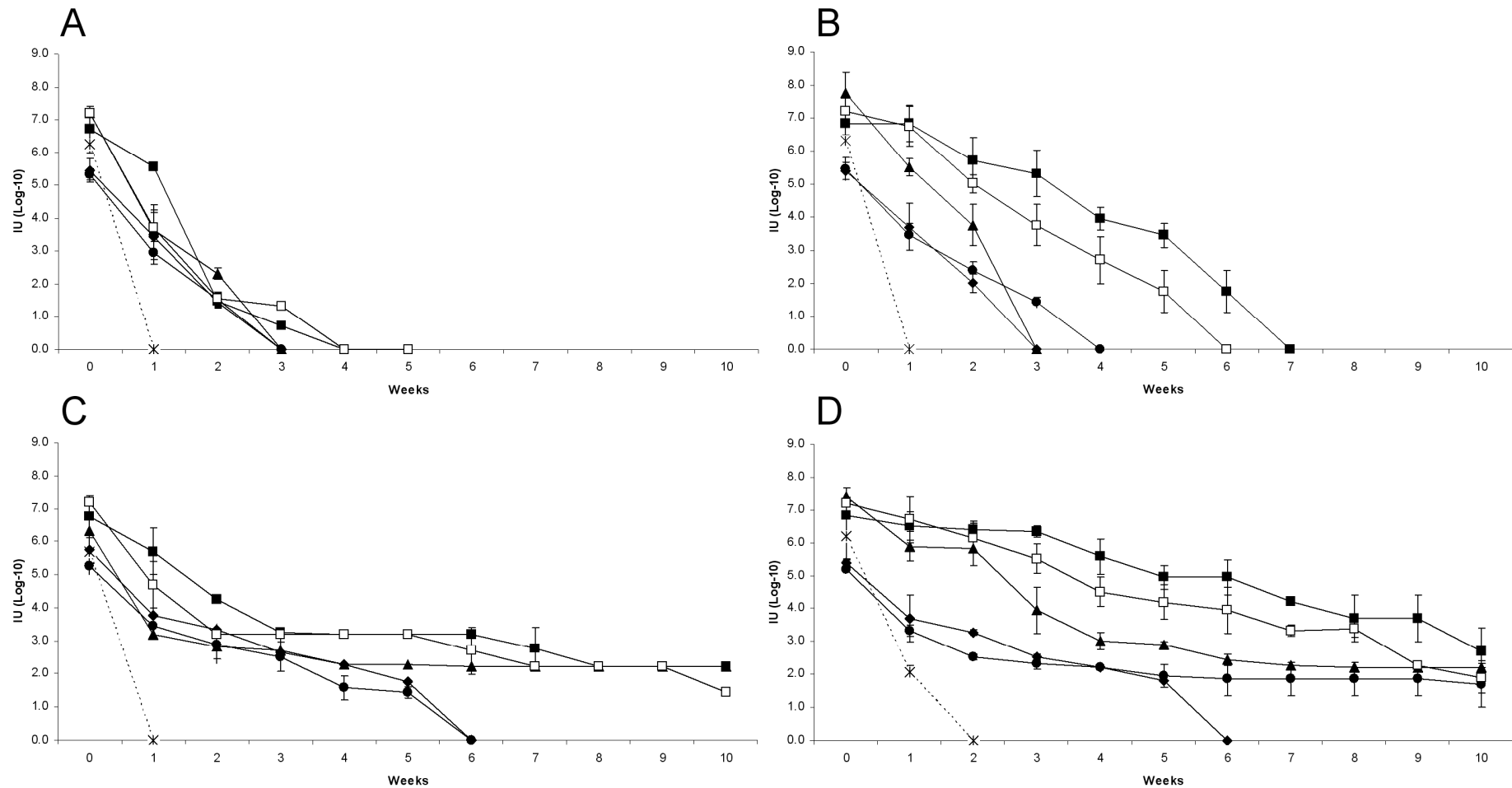


Figure 4: survival of *Parachlamydia acanthamoebae* strain Bn9 (□), *Parachlamydia acanthamoebae* strain Hall coccus (■), *Protochlamydia naegleriophila* (◆), *Waddlia chondrophila* (▲), *Criblamydia sequanensis* (●) and *Chlamydia trachomatis* (\*) when dried in the presence of 0.3% BSA (A), dried in the presence of 3% BSA + blood (B), suspended in sterile tap water (C), suspended in rich medium PYG (D).

## Discussion et conclusion

Les *Chlamydia*-like sont de nouvelles *Chlamydiales* découvertes ces dernières années et considérées comme des pathogènes émergents pour l'homme et l'animal dans la mesure où elles sont associées à des infections respiratoires et des avortements spontanés.

Malgré la preuve de leur pathogénicité, peu de données sont disponibles sur les *Chlamydia*-like notamment concernant leur capacité à croître sur des lignées cellulaires de mammifères alors que *W. chondrophila* et *S. negevensis* sont pourtant capable de se multiplier dans les macrophages humains. La capacité de croître sur des macrophages humains a été un argument supplémentaire concernant le pouvoir pathogène de ces bactéries sur l'homme.

En ce qui concerne *P. acanthamoeba*, sa croissance sur cellules est controversée, en effet, des résultats contradictoires ont été publiés par différentes équipes. Dans cette étude, nous n'avons pas observé de croissance ou d'effet cytopathique sur les lignées cellulaires testées. En revanche, le spectre d'hôte varie en fonction de la souche de *P. acanthamoeba* considérée. La souche Hc semble plus virulente que la Bn9 vis-à-vis de l'espèce amibienne *Acanthamoeba lenticulata*. La souche Hc fut incriminée dans une épidémie de fièvre alors que la souche Bn9 fut isolée d'un prélèvement nasal d'un individu sain. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les différences de virulence et de spectre d'hôte sur les amibes.

Nous avons observé pour la première fois la croissance de *P. naegleriophila* sur des cellules. L'origine canine de ces cellules peut indiquer une spécificité d'hôte et éventuellement une transmission zoonotique mais ces hypothèses sont à vérifier.

Nous avons également observé la formation de vésicules lors de la multiplication de *C. sequanensis* dans de nombreuses amibes ; il s'agit d'un phénomène déjà décrit dans le cas de *L. pneumophila*. Ces vésicules remplies de bactéries peuvent présenter un risque en santé humaine compte tenu de leur taille, qui laisse supposer qu'elles peuvent être inhalées.

Une souche de *C. trachomatis* ayant été isolée d'une *Acanthamoeba*, nous avons essayé d'infecter différentes souches d'*Acanthamoebae* avec *C. trachomatis*. A ce jour, les résultats ne sont pas clairs, même si aucune multiplication évidente ni aucun effet cytopathiques n'ont été observés, certaines images de fluorescence avec un anticorps spécifique semblent indiquer que *C. trachomatis* pourrait infecter certaines souches d'amibes. Ces résultats restent malgré tout à confirmer.

Nous avons montré que *C. sequanensis* n'était pas capable de survivre dans les kystes d'amibes, seules quelques *Chlamydia*-like en sont capables. La majorité de ces bactéries se

trouvent sous forme libre dans l'environnement ou dans les trophozoïtes d'amibes. Nous avons donc voulu étudier leur capacité de survie dans l'environnement et leur résistance aux biocides.

Nous avons mis en évidence que les *Chlamydia*-like étaient capables de survivre aussi bien séchées sur surface qu'en milieu liquide alors que *C. trachomatis* a une survie très limitée. Certaines de ces bactéries sont capables de survivre plus de dix semaines en milieu liquide. La présence de substance organique telle que le sang permet d'augmenter leur survie séchées sur surface.

Il semble également que ces bactéries résistent à une température de 55°C, elles sont en revanche inactivées par la plupart des biocides testés. Une légère résistance de la souche Hc a été observée pour le peroxyde d'hydrogène, ce qui peut poser problème dans la mesure où ce principe actif est en général utilisé à de plus faibles concentrations notamment dans les produits destinés à la désinfection des lentilles de contact. Globalement, les *Chlamydia*-like sont sensibles aux biocides utilisés pour la décontamination des surfaces et du matériel médical, il en va de même pour les trophozoïtes excepté dans le cas de la glutaraldéhyde. Les *Chlamydia*-like empêchant la formation de kystes amibiens seront donc probablement inactivées par ces traitements alors que les bactéries capables de survivre dans les kystes seront, elles, probablement protégées par les kystes.

## **Chapitre V : Conclusions et perspectives**

Les *Acanthamoebae* sont reconnues depuis plusieurs décennies comme des pathogènes pour l'homme, elles sont responsables de plusieurs infections parfois très graves comme l'encéphalite granulomateuse amibienne, le plus souvent mortelle, la kératite amibienne, infection liée aux amibes la plus répandues, ou encore l'amibiase cutanée.

Au fil du temps, des amibes ont également été isolées de divers prélèvements chez des patients, leur rôle pathogène pourrait donc être plus étendu, bien que le problème majeur posé par les amibes reste la kératite amibienne. En effet, l'essor des lentilles de contact a multiplié le nombre de cas d'infections recensées, avec des conséquences parfois graves, pouvant aller jusqu'à la cécité. Si de nombreuses études sont disponibles sur la problématique de la désinfection des amibes par des biocides utilisés pour les lentilles, en revanche, peu de données sont disponibles pour d'autres applications telles que la désinfection de surface ou de matériel médical. A ce jour, il n'existe pas de protocole de référence pour l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les amibes comme c'est le cas pour les bactéries ou encore les virus. Cette absence de cadre a conduit à une accumulation de données difficilement comparables, puisque chaque étude utilise des souches d'amibes différentes, les cultive et les enkyste selon ses propres protocoles... Ces différences ont eu pour conséquences de fournir des résultats peu comparables, voire totalement discordants (Tableau X).

Le but de notre travail a donc été d'étudier l'influence de différents paramètres dans l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les amibes du genre *Acanthamoeba*. Nous avons mis au point un protocole et testé de nombreux biocides et principes actifs utilisés dans le cadre de la décontamination des surfaces et du matériel médical.

Nous avons mis en évidence une très grande variabilité selon les souches d'amibes mais aussi selon les méthodes de culture et d'enkystement utilisées. Les différents biocides et principes actifs ont également montré une activité très variable et mis en évidence l'importance de la formulation de ces désinfectants.

Le choix des souches utilisées est primordial dans la mesure où les souches environnementales testées dans cette étude se sont avérées plus résistantes que les souches de référence. Il convient de prendre des souches isolées si possible dans l'environnement à étudier, par exemple, des souches isolées de patients atteints de kératite, sur des lentilles de contact ou au niveau des boîtiers de stockage dans le cas de produits destinés à la désinfection des lentilles. Des souches isolées dans les réseaux d'eau potable, notamment au niveau de robinets peuvent être idéales dans le cas d'une étude sur la contamination de surfaces ou de matériel médical par de l'eau. Dans notre cas, les souches les plus résistantes sont celles



isolées au niveau de réseaux d'eau hospitaliers, par prélèvement d'eau ou par écouvillonnage de robinet.

Globalement, ces souches doivent en grande partie appartenir au génotype T4 puisqu'il regroupe la majorité des souches responsables des pathologies citées.

Dans certaines études, les auteurs indiquent que les kystes les plus proches de ceux de l'environnement sont ceux obtenus sur gélose NNA [126, 373, 389] après culture en milieu synthétique, alors que pour d'autres, il s'agit des kystes obtenus dans du tampon d'enkystement [122]. Il se peut que selon l'environnement étudié l'une ou l'autre de ces deux méthodes soient plus proches des conditions réelles d'enkystement. Il convient d'être prudent dans la mesure où il a également été rapporté qu'après plusieurs passages sur milieu synthétique, les amibes perdent leur capacité d'enkystement. La perte de certaines caractéristiques interviendrait après quelques mois de culture sur milieu synthétique [389]. En effet, les amibes étant cultivées à température et pH constants, en excès de nutriments, un phénomène de régulation négative de certains gènes devenus facultatifs interviendrait, menant à une perte de la capacité d'enkystement et à une diminution de la résistance à la température [389]. Dans le cas où l'évaluation de l'efficacité des biocides serait réalisée à partir de trophozoïtes cultivés en milieu synthétique, il serait donc nécessaire de définir un temps maximal de culture afin de ne pas fausser les résultats. Il ne faudrait pas conclure à une sensibilité qui ne serait en réalité due qu'à une perte de la capacité d'enkystement des souches étudiées. Il a même été suggéré que ces amibes ne soient pas cultivées plus de 5 fois avant d'être enkystées [122]. Il semble cependant plus prudent de cultiver les amibes à tester 3 fois sur cellules avant de les enkyster afin de leur faire retrouver leur capacité d'enkystement, leur virulence et les autres fonctions ayant été inhibées par une culture prolongée en milieu axénique. En effet, cette étape de culture sur cellules humaines permet de restaurer les capacités intrinsèques des amibes [404]. Dans la mesure où les conditions environnementales semblent très éloignées de la culture en milieu synthétique, avec son abondance de nutriments, sa température contrôlée... la culture sur cellules semble être la meilleure alternative, même si elle est plus contraignante. En effet, cela nécessite de cultiver de grandes quantités de cellules selon le nombre de souches d'amibes à évaluer.

Il serait intéressant de réaliser ces mêmes tests sur des souches cultivées à long terme sur cellules afin d'observer ou non une modification des caractéristiques, liée à une adaptation des amibes.

Pour être le plus proche possible des conditions de l'environnement, il semble nécessaire de réaliser ces tests sur des kystes agrégés, c'est-à-dire non traités au SDS avant

utilisation, en effet, il est tout à fait probable que les agrégats de kystes soient plus difficiles à désinfecter, ceux étant situés vers l'intérieur seraient à priori moins en contact avec le biocide et pourraient donc être protégés par les kystes situés vers l'extérieur. Un tel phénomène pourrait permettre aux kystes amibiens de survivre en grand nombre notamment lors de traitements des réseaux d'eau. Il ne serait cependant plus possible de standardiser les tests dans la mesure où la taille des agrégats et donc le nombre de kystes les composant ne seraient pas possible à standardiser. Un test évaluant en parallèle l'activité des biocides sur des kystes traités et non-traités au SDS semble indispensable afin de connaître l'influence de ce traitement sur les résultats. Cependant, il semble difficile de ne réaliser les tests que sur des kystes agrégés, en effet, les agrégats produits seront de tailles et de formes très variables, produisant ainsi probablement des résultats également très variables.

Le problème se pose également dans le cas de trophozoïtes et de kystes présents dans les biofilms, les résultats obtenus dans les différentes études réalisées ne sont pas transposables à de telles conditions. Dans les études déjà publiées, l'efficacité des biocides semblent très différentes selon que l'on considère les amibes libres ou les amibes intégrées à des biofilms.

Se pose néanmoins la question de la représentativité de ces kystes par rapport à ceux rencontrés dans l'environnement et les réseaux d'eau. Il est en effet tentant de vouloir produire les kystes les plus résistants mais il faut que les résultats obtenus aient une signification et donnent une indication réelle de l'efficacité des produits désinfectants sur les souches qui sont réellement à décontaminer aussi bien sur des lentilles de contact, que sur des surfaces ou encore du matériel médical.

En tenant compte de la littérature disponible et de nos propres résultats, nous proposons un protocole pour l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les *Acanthamoebae* (voir Annexes).

Cette étude a permis de montrer que seul un des produits commerciaux testés est efficace sur les 3 types de kystes pour toutes les souches testées, les autres ont une efficacité parfois très limitée. Nous avons également montré que les kystes n'étaient pas la seule forme résistante, les trophozoïtes de la plupart des souches environnementales testées se sont avérés résistants à la glutaraldéhyde ou à des biocides à base de glutaraldéhyde. Or il s'agit d'un principe actif très répandu. De tels résultats avaient été mis en évidence précédemment mais uniquement sur la souche *A. polyphaga* Linc-AP1 alors que les biocides testés étaient destinés à la

décontamination des bronchoscopes [163]. Ces résultats sont d'autant plus inquiétants qu'il s'agit de matériel médical utilisé lors d'actes invasifs et que les amibes en question peuvent héberger des endosymbiontes, comme environ 25% des amibes isolées de l'environnement. Les micro-organismes hébergés peuvent être divers : des virus, des protozoaires ou le plus souvent, des bactéries. En effet, de nombreuses espèces de bactéries, pouvant être pathogènes, sont impliquées dans des interactions avec des amibes.

Ces endosymbiontes peuvent être des *Chlamydia*-like, bactéries responsables de nombreuses infections respiratoires ou toutes sortes d'autres bactéries pathogènes. Dans le cas des bronchoscopes et d'autres matériels médicaux porteurs d'amibes résistantes aux traitements de désinfection, les patients peuvent être contaminés aussi bien par des amibes que par des bactéries ou virus hébergés par celles-ci. Ce problème peut se poser avec tout le matériel médical non autoclavable. Le patient pourrait même être contaminé par une ou plusieurs souches d'amibes présentes au niveau de ses cavités nasales, dans la mesure où la présence d'amibes dans les cavités nasales de patients et de volontaires sains a été plusieurs fois mise en évidence [98, 99, 319, 428-432].

Concernant la problématique des *Chlamydia*-like, il est aujourd'hui avéré que ces bactéries peuvent être pathogènes aussi bien pour l'homme que pour l'animal. Nous avons démontré une faible résistance aux biocides de ces bactéries mais également une capacité importante à survivre dans l'environnement, cette survie pouvant même être accrue par une association avec des amibes libres. Les amibes pourraient également permettre une meilleure survie des *Chlamydia*-like aux biocides, notamment dans le cas d'espèces capables de survivre dans les kystes d'amibes. Il est aujourd'hui nécessaire d'évaluer l'activité des biocides sur des complexes kyste/*Chlamydia*-like, lorsque ces bactéries le permettent, afin de connaître le potentiel de survie de ces micro-organismes. Il est difficile d'évaluer précisément le nombre de cas d'infections liées à des *Chlamydia*-like, en effet, ces bactéries sont encore peu connues et difficiles à identifier. Elles ne sont recherchées dans des prélèvements, le plus souvent par PCR, que dans de rares centres spécialisés dans leur étude. Au fil du temps, le nombre d'infections pourrait donc fortement augmenter si la fréquence de leur dépistage vient à augmenter, principalement dans le cas d'avortements spontanés et d'infections respiratoires. Il convient de noter que dans environ 50% des cas, les infections respiratoires sont d'étiologie inconnue, on peut donc penser qu'une partie de ces cas pourrait être causée par les *Chlamydia*-like.

A ce jour, de nombreux traitements de désinfection sont mis en place afin de contrôler l'environnement, les réseaux d'eau potable sont traités au chlore par exemple, afin de maintenir le nombre de micro-organismes présents à un niveau acceptable et de limiter les problèmes sanitaires. Néanmoins, comme nous avons pu le constater dans cette étude, les amibes sont résistantes à de nombreux biocides, de tels traitements pourraient donc sélectionner les populations les plus résistantes et leur permettre ainsi de proliférer. Compte tenu du fait que les souches d'*Acanthamoebae* les plus résistantes de cette étude ont été isolées en milieu hospitalier, on peut penser que les traitements qui y sont réalisés ont mené à la sélection de ces souches résistantes. Il en va de même pour les bactéries ou les virus qui peuvent aussi résister à des traitements de désinfection, quant aux micro-organismes capables de croître dans les amibes, ils pourraient également être protégés des traitements par cette association. Ces interactions amibes/micro-organismes pourraient développer la virulence ainsi que la résistance des endosymbiontes. Ce problème de sélection des micro-organismes résistants aux traitements peut également se poser dans l'agro-alimentaire, où il est notamment question de décontaminer des aliments par trempage dans des solutions désinfectantes avant conditionnement. Il semblerait également que l'utilisation de biocides à des concentrations sub-létales puisse sélectionner des bactéries résistantes aux antibiotiques. En effet, des phénomènes de résistance croisée antibiotique/biocide semblent à prendre en compte, notamment pour les bactéries.

De plus, la large utilisation qui est faite des biocides, aussi bien en milieu hospitalier, que dans l'industrie agro-alimentaire, ou encore dans les élevages de bétail, peut mener à des rejets dans les eaux usées ainsi que dans l'environnement ce qui pourrait également conduire à une sélection des micro-organismes résistants à ces molécules. A ce jour, la question de la pression de sélection exercée par les biocides sur les micro-organismes n'est pas claire. En effet, des études contradictoires sont publiées, mais il convient d'être prudent, les effets des relargage de ces produits dans l'environnement sont pour l'instant inconnus mais il semble nécessaire de surveiller et d'étudier leurs effets.

Les premiers résultats de certaines de nos expériences laissent à penser que *C. trachomatis* pourrait infecter certaines *Acanthamoebae* et peut être s'y multiplier. Compte tenu du rôle pathogène de cette bactérie, cette association peut inquiéter, en effet, les amibes pourraient donc permettre une dissémination de la bactérie normalement peu résistante dans l'environnement. De plus, il a été montré pour d'autres espèces comme *L. pneumophila* que la croissance intra-amibienne augmenterait la virulence, ce qui pourrait être applicable à *C.*

*trachomatis*. Dans le cas des mycobactéries, la croissance intra-amibienne permet également une augmentation de la résistance aux antibiotiques et aux biocides, ces observations pourraient être transposables à *C. trachomatis*.

Il est nécessaire de confirmer ces résultats et de tester la croissance de *C. trachomatis* sur un plus grand nombre d'amibes, il serait également intéressant d'étudier la possibilité de *C. trachomatis* de survivre dans les kystes d'amibes ainsi que sa résistance aux biocides dans un tel cas.

---

# Communications

## Article publié

- Resistance of *Acanthamoeba* spp. cysts to disinfection treatments used in healthcare settings.  
**Coulon C**, Collignon A, Mc Donnell G, Thomas V. J Clin Microbiol.  
Accepté le 21 mai 2010

## Posters

- Resistance of *Acanthamoeba* spp. cysts to disinfection treatments  
7th International Conference of the Hospital Infection Society, Liverpool, 10th - 13th October 2010  
**C. Coulon**, A. Collignon, G. McDonnell, V. Thomas
- Resistance of Chlamydia-like bacteria to disinfection and survival on surfaces  
7th International Conference of the Hospital Infection Society, Liverpool, 10th - 13th October 2010  
**C. Coulon**, A. Collignon, G. McDonnell, V. Thomas
- Resistance of *Chlamydia*-like to disinfection treatments and survival on surfaces  
**C. Coulon**, A. Collignon, G. McDonnell, V. Thomas  
Poster P183 présenté à la 7th International Conference Legionella 2009, Pasteur institute, October 13-17 2009, Paris
- Resistance of *Acanthamoeba* spp. Cysts to disinfection treatments  
**C. Coulon**, A. Collignon, G. McDonnell, V. Thomas  
Poster P182 présenté à la 7th International Conference Legionella 2009, Pasteur institute, October 13-17 2009, Paris
- Resistance of *Acanthamoeba* spp. cysts to disinfection treatments  
**C. Coulon**, A. Collignon, G. McDonnell, V. Thomas  
Free-Living Amoebae Meeting 2009- Puerto de La Cruz (Tenerife) from 17th to 21st May 2009
- Résistance des kystes d'*Acanthamoeba* spp aux traitements de désinfection  
**C. Coulon**, A. Collignon, G. McDonnell, V. Thomas  
Journée de l'école doctorale Chatenay-Malabry 2009

---

## **Annexes**

## Protocole pour l'évaluation de l'efficacité des biocides sur les kystes d'*Acanthamoebae*

- Choix des souches :

Souches isolées de l'environnement à étudier, majoritairement du groupe T4 (responsables de la plupart des pathologies) et souches de référence.

Exemple de souches de référence à utiliser :

*A. castellanii* ATCC 30010, *A. castellanii* CCAP 1501/10, *A. polyphaga* 1501/18.

- Croissance des trophozoites :

Trois repiquages sur lignées cellulaires (ex : HEp-2).

Les cellules HEp-2 ATCC CCL-23 sont cultivées en milieu DMEM à 37°C. Quand les cellules sont à confluence, enlever le milieu de culture cellulaire, rincer avec du NaCl 0.9%, remplacer le milieu de culture cellulaire (DMEM) par du NaCl 0.9%. Ajouter  $\sim 10^6$  trophozoites et incuber à 28°C [389, 404].

- Enkystement :

Les trophozoites cultivés sur cellules sont récupérés, lavés en  $\frac{1}{4}$  Ringer, et enkystés en tampon Neff (0.1M KCl, 0.02M Tris, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM NaHCO<sub>3</sub>) durant une semaine à 33°C.

- Kystes :

Les kystes sont récupérés et lavés en  $\frac{1}{4}$  Ringer, traités au SDS 0.5% 10 min pour lyser la majorité des kystes non matures et dissocier les agrégats [84, 403]. Ils sont ensuite ajustés à  $10^7$  to  $10^8$  kystes/ml en  $\frac{1}{4}$  Ringer et stockés à 4°C maximum 15 jours.

- Tests de désinfection :

100µl de la suspension de kystes ( $10^6$  to  $10^7$  kystes) sont mélangés à 900µl du biocide à tester. Vortexer le tube et incuber selon la durée et la température recommandées par le fabricant. 5 minutes avant la fin, centrifuger le mélange à 14000 rpm durant 5 min. Jeter le surnageant et ajouter 900µl de neutralisant Dey-Engley [392], vortexer, neutraliser 5 minutes puis centrifuger 5 minutes à 14000 rpm. Jeter le surnageant et ajouter 900µl de Ringer. Réaliser les dilutions en séries et déposer sur des plaques 48 puits préalablement remplies de 500µl de



gélose NNA, et de *E. coli* ATCC 25922 (6 puits par dilution). Incuber les plaques à 28°C durant une semaine. Observer le désenkystement des amibes dans les puits au microscope.

Calculer le log de réduction selon la méthode de Spearman-Kärber.

Comme contrôle, les puits positifs peuvent être grattés et remis en PYG et antibiotique afin d'observer la croissance des trophozoites.

### Méthode de Spearman-Karber

Diluer l'échantillon à tester selon une progression géométrique, c'est-à-dire de raison constante entre les dilutions successives, et ensemercer un volume constant (en général 0.1 ml) de chaque dilution. Le facteur de dilution le plus couramment utilisé est le facteur décimal.

Pour que la formule de Spearman-Karber soit applicable, il faut utiliser un nombre constant de tubes ou de cupules de bouillonensemencé à l'aide de chaque dilution, un facteur de dilution constant et une gamme de dilutions suffisamment large pour encadrer à la fois les dilutions de part et d'autre desquelles 100 pour cent des sujets donneront une réaction positive, et les dilutions de part et d'autre desquelles 100 pour cent des sujets donneront une réaction négative.

Si une ou plusieurs de ces conditions ne sont pas satisfaites, on suppose parfois que pour un facteur de dilution constant, la dilution supérieure ou inférieure venant après la dernière effectuée aurait donné le résultat souhaité. Une telle "fabrication" de données ne repose sur aucun fondement théorique, mais si elle est appliquée avec suffisamment de prudence, elle n'est pas dangereuse. Cependant, il est préférable de répéter le titrage avec une gamme plus appropriée de dilutions, ce qui est indispensable s'il y a de graves lacunes dans les données.

Selon la formule de Spearman-Karber:

$$*** \text{Log}_{10} \text{ dose médiane} = (X_0) - (d/2) + dS (r_i/n_i)$$

où:

$X_0$	= $\log_{10}$ de la valeur réciproque de la dilution la plus basse à laquelle tous les inoculum d'épreuve sont positifs.
$d$	= $\log_{10}$ du facteur de dilution (c'est-à-dire la différence entre les intervalles des logarithmes de dilution).
$n_i$	= nombre d'inoculum d'épreuve utilisés à chaque dilution (compte tenu des pertes accidentelles).
$R_i$	= nombre d'inoculum positifs d'épreuve (sur $n_i$ ).
$S$ ( $r_i/n_i$ )	= $S(P)$ = somme de la proportion d'épreuves positives commençant à la dilution la plus basse et donnant 100 pour cent de résultats positifs.

La sommation commence à la dilution  $X_0$

L'écart-type estimatif est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Log écart-type} = d \cdot \sqrt{\frac{E(p^*(1-p))}{(n_i-1)}}$$

Tableau X : Récapitulatif de la désinfection des amibes

Souche testée	Conditions d'exposition	Durée d'exposition	Méthode de croissance/production des kystes	Méthode de dénombrement	Abattement/MAC/MCC	Réf.
<b>Biocides chimiques</b>						
<b>Biocides cationioniques</b>						
<b>Chlorhexidine</b>						
<i>A. culbertsoni</i>	chlorhexidine gluconate 0.006%, EDTA 0.05%	24h	tampon tryptose phosphate et enkystement	désenkystement en tampon tryptose phosphate	72%	[129]
<i>A. castellanii</i> Neff	chlorhexidine gluconate 0.005%	45s à 8h	milieu OGMA enkystement tampon Neff	survie des amibes en gelose	après 8h: <10 kystes/ml	[132]
	chlorhexidine gluconate 0.006%				après 8h: <10 kystes/ml	
<i>A. castellanii</i>	chlorhexidine (150 mg/ml)-thimerosal (50 mg/ml)	6h	PYG enkystement en PBS	microscopie	trophozoites:100% kystes: 90%	[135]
<i>A. castellanii</i>	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%	6h à 14 jours	enkystement sur NNA+E.coli	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	survie 24h	[136]
	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 6h	
	Chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 24h	
	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 6h	
<i>A. polyphaga</i>	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 6h	
	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 6h	

<i>A. culbertsoni</i>	Chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 24h	
	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 6h	
	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 24h	
	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 3j	
<i>Acanthamoebae spp.</i>	Chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 24h	
	Thimerosal, 0.001%; chlorhexidine, 0.005%; EDTA, 0.1%				survie 3j	
<i>Acanthamoebae spp.</i>	chlorhexidine	48h	NNA + <i>E.coli</i> enkystement sur NNA + <i>E. coli</i>	microscopie	trophozoite: 0.49-1.9 µg/ml moyenne: 0,71 µg/ml kystes: 0.49-15,6 µg/ml moyenne 2,77 µg/ml	[137]
<i>A. castellanii</i>	chlorhexidine gluconate 0.005%, thimerosal 0.001%	10 min	PYG enkystement en PYG	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i>	kystes et trophozoites tués	[160]
<i>A. polyphaga</i>				observation de trophozoites	reste des trophozoites et des kystes	
<i>A. castellanii</i> Neff	Chlorhexidine diacetate	10 min	PYG PYG + 50 mM MgC12	survie des amibes en gélose	trophozoites: 12,5µg/ml kystes: 25µg/ml	[141]
<i>A. castellanii</i> Neff	Chlorhexidine diacetate	0 à 36h	PYG enkystement tampon Neff	survie des amibes en gélose	MTC: 8µg/ml MCC:27µg/ml	[134]

## Ammoniums quaternaires

<i>A. culbertsoni</i>	polyaminopropylbiguani de 0.0015%, EDTA 0.005%	24h	tampon tryptose phosphate et enkystement	déenkystement en tampon tryptose phosphate	1%	[129]
	polyaminopropylbiguani de 0.00005%, surfactant polyquaternium-1 0.001%				13%	
	benzalkonium chloride 0.003%, EDTA				27%	
					72%	
<i>A. castellanii</i>	benzalkonium chloride (40 mg/ml)	une nuit			trophozoites: 100% kystes: 90%	[135]
	polyaminopropyl biguanide (PABP) (0.5 mg/ml)	4h	PYG enkystement en PBS	microscopie	trophozoites:0% kystes: 50%	
	polyquaternium 1 (11 mg/ml)	4h			trophozoites:0% kystes: 0%	
<i>Acanthamoebae</i> <i>spp.</i>	polyhexaméthylène biguanide (PHMB)	48h	NNA + <i>E.coli</i> enkystement sur NNA + <i>E. coli</i>	microscopie	trophozoite: 0.49-3.9 µg/ml moyenne: 1,3 µg/ml kystes: 0.49-3.9 µg/ml moyenne 2,2 µg/ml	[137]
<i>A. castellanii</i> ATCC 30010 <i>A. polyphaga</i> ATCC 30461	polyaminopropyl biguanide (PAPB) RT 4.5, 9, 22.5, 45, and 90 ppm	30s à 24h	PYG enkystement en PYG	survie des amibes en gélose	survie à 1h= 0% à 45 et 90ppm >10% de survie à 24h à 4,5ppm survie à 1h= 0% à 90ppm >10% de survie à 24h à 4,5ppm	[140]
<i>A. castellanii</i> Neff	polyhexaméthylène biguanide (PHMB)  benzalkonium chloride	10 min	PYG PYG + 50 mM MgC12	survie des amibes en gélose	trophozoites: 12,5µg/ml kystes: 25µg/ml trophozoites: 25µg/ml kystes: 50µg/ml	[141]
<i>A. castellanii</i>	0.0001% polyhexaméthylène biguanide,	6h à 24h 20°C	NNA + <i>E.coli</i> enkystement sur NNA + <i>E. coli</i>	déenkystement sur NNA + <i>E.</i> <i>coli</i> observation de trophozoites	30%	[143]
	0.001% polyquaternium- 1				40%	

0.00005% polyaminopropyl biguanide					30%	
<i>Acanthamoebae</i> spp.	Polyaminopropyl biguanide 0.0005%, 0.11% EDTA	/	PYG enkystement en tampon Neff	survie des amibes en gélose	temps nécessaire >8h jusqu'à 7 jours	[145]
	Polyhexaméthylène biguanide (0.001) benzalkonium chloride 0.001%, EDTA 0.02%					
<i>A. castellanii</i>	Polyquad 0.001%	4 à 6h	croissance sur gélose NNA + <i>E. coli</i>	déenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	0%	[126]
	Polyquad 0.001%, Aldox 0.0005%				0%	
	Propylène glycol, Polyquad 0.001%, Aldox 0.0005%				0%	
	Polyhexaméthylène biguanide 0.0001%, Poloxamer 237				0%	
	Chlorhexidine gluconate 0.003%, polyaminopropyl biguanide 0.0005%				0%	
	Polyaminopropyl biguanide 0.0001%				0%	
	Polyhexanide 0.0001%				0%	
<i>A. polyphaga</i>	Polyaminopropyl biguanide 0.0001%	4 à 6h	croissance sur gélose NNA + <i>E. coli</i>	déenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	0%	
	Polyquad 0.001%				0%	
	Polyquad 0.001%, Aldox 0.0005%				0%	
	Propylène glycol, Polyquad 0.001%, Aldox 0.0005%				0%	
Polyhexaméthylène biguanide 0.0001%, Poloxamer 237					0%	

<i>A. hatchetti</i>	Chlorhexidine gluconate 0.003%, polyaminopropyl biguanide 0.0005%	4 à 6h	croissance sur gélose NNA + <i>E. coli</i>	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	0%	
	Polyaminopropyl biguanide 0.0001%				0%	
	Polyhexanide 0.0001%				0%	
	Polyaminopropyl biguanide 0.0001%				0%	
	Polyquad 0.001%				0%	
	Polyquad 0.001%, Aldox 0.0005%				0%	
	Propylene glycol, Polyquad 0.001%, Aldox 0.0005%				0%	
	Polyhexamethylene biguanide 0.0001%, Poloxamer 237				0%	
	Chlorhexidine gluconate 0.003%, polyaminopropyl biguanide 0.0005%				0%	
	Polyaminopropyl biguanide 0.0001%				0%	
<i>A. castellanii</i> Neff	benzalkonium chloride 0.003% polyaminopropyl biguanide 0.0015%	45s à 8h	milieu OGMA enkystement tampon Neff	survie des amibes en gélose	après 8h: 8.5 x10 <sup>1</sup> kystes/ml après 8h: 1.0 x10 <sup>4</sup> kystes/ml	[132]
<i>A. castellanii</i> Neff	Polyhexaméthylène biguanide	0 à 36h	PYG enkystement tampon Neff	survie des amibes en gélose	MTC: 2.5µg/ml MCC:>500µg/ml	[134]
	Benzalkonium chloride	0 à 36h	PYG enkystement tampon Neff	survie des amibes en gélose	MTC: 12µg/ml MCC:40µg/ml	



<i>A. castellanii</i>	Polyhexaméthylène biguanide 0.02%	24h	PYG enkystement en tampon de Page	culture en PYG	sensible	[159]
-----------------------	-----------------------------------	-----	--------------------------------------	----------------	----------	-------

**Composés halogénés:** Chlore, Brome, Iode

<i>A. culbertsoni</i>	ammonium chloride, thimerosal 0.002%	24h	tampon tryptose phosphate et enkystement	désenkystement en tampon tryptose phosphate	82%	[129]
<i>A. castellanii</i>	alkyl triethanol ammonium chloride 0.013%, thimerosal 0.002%	10min	PYG enkystement en PYG	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	reste des trophozoites et des kystes	[160]
<i>A. castellanii</i> ATCC 1501	chlore 1.10 mg/l	30min	milieu Neff	Gélose NM + <i>Enterobacter cloacae</i>	100%	[133]
<i>A. culbertsoni</i> A-1	chlore 1.25 mg/l				100%	
<i>Acanthamoebae</i> spp.	alkyl triethanol ammonium chloride 0.3%, thimerosal 0.02%	/	PYG enkystement en tampon Neff	survie des amibes en gélose	temps nécessaire >8h jusqu'à 7 jours	[145]
<i>A. culbertsoni</i> A-1	chlore	24h	milieu MYAS + <i>E. coli</i>	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	MCC: 2.25µg/ml	[150]
<i>A. polyphaga</i>					MCC: 2µg/ml	
<i>A. castellanii</i> ATCC 30234	chlore 5mg/l	30 sec	PYG	culture en PYG pas de kystes	1.10*3 log de réduction	[433]
<i>A. castellanii</i> <i>Acanthamoeba</i> sp.	chlore 1-20 mg/l	10-60 min	PYG	désenkystement en PYG et sur NNA + <i>E. coli</i>	0 à 5 log de réduction	[151]
<i>A. polyphaga</i>	bromonitropropanediol 2-10000 mg/l	2-18h	PYG / PAS + <i>E. coli</i> tampon de Neff	PAS + <i>E. coli</i> microscopie	à 18h MAC: 13-25 mg/l MCC: >10000 mg/l	[434]

	sodium hypochlorite 1-100 mg/l				à 18h activité ++++	
	chlore 5 mg/l				à 18h MAC: 1-2 mg/l MCC: >50 mg/l	
<i>Acanthamoeba</i> sp.	chlore 2.5 mg/l monochloramine 0.5 mg/l	0-106j	biofilm	méthodes moléculaires, microscopie	réduction des amibes libres mais pas du biofilm	[149]
<i>A. polyphaga</i> Linc-AP1	chlore 15 mg/l	24h	PYG enkystement en PAS	microscopie	survie	[202]
<i>A. polyphaga</i>	chlore 8 à 100 mg/l	5min à 2h	NNA + <i>E. coli</i>	énumération	3500 mg/L pour obtenir 4 log de réduction sur les kystes	[155]
<i>Acanthamoebae</i> spp.	povidone-iodée 10%	48h	milieu CGVS enkystement NNA + <i>E. coli</i>	désenkystement sur CGVS observation de trophozoites	MAC: 0.125-5 % MCC: <0.25->10%	[154]

**Agents oxydants****Dioxyde de chlore**

<i>A. castellanii</i> ATCC 1501	CIO <sub>2</sub> 3.4 mg/l	30min	milieu Neff	Gélose NM + <i>Enterobacter cloacae</i>	100%	[133]
<i>A. culbertsoni</i> A-1	CIO <sub>2</sub> 3.4 mg/l				100%	
<i>A. polyphaga</i>	CIO <sub>2</sub> 0.5 à 7 mg/l	5min à 2h	NNA + <i>E. coli</i>	énumération	80 mg/L pour obtenir 4 log de réduction sur les kystes	[155]
<i>Acanthamoeba</i> sp.	ozone 0.5 mg/l	0-106j	biofilm	méthodes moléculaires, microscopie	réduction des amibes libres mais pas du biofilm	[149]

**Ozone**

<i>A. castellanii</i> ATCC 1501	O <sub>3</sub> 6.75 mg/l	30min	milieu Neff	Gélose NM + <i>Enterobacter cloacae</i>	reste 20 amibes	[133]
<i>A. culbertsoni</i> A-1	O <sub>3</sub> 6.75 mg/l				reste 0.05 amibes (MPN)	

<i>A. polyphaga</i>	O3 0.5 à 1.7 mg/l	5min à 2h	NNA + <i>E. coli</i>	énumération	15 mg/L pour obtenir 4 log de réduction sur les kystes	[155]
<i>Acanthamoeba</i> sp.	ozone 0.5 mg/l	0-106j	biofilm	méthodes moléculaires, microscopie	réduction des amibes libres mais pas du biofilm	[149]

## Péroxyde d'hydrogène

<i>A. castellanii</i>	peroxyde d'hydrogène (30000 mg/ml)	30min 6h	PYG enkystement en PBS	microscopie	100% pour les trophozoites 50-90% pour les kystes	[135]
<i>A. culbertsoni</i>	H2O2, 3%	6h à 14 jours	enkystement sur NNA+E.coli	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i>	survie 6h	[136]
<i>A. castellanii</i>				observation de trophozoites		
<i>A. polyphaga</i>						
<i>A. castellanii</i> Neff	H2O2	10 min	PYG PYG + 50 mM MgC12	survie des amibes en gélose	trophozoites: <1% kystes: 3%	[141]
<i>A. castellanii</i>	H2O2, 3%	6h 20°C	NNA + <i>E.coli</i> enkystement sur NNA + <i>E. coli</i>	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	50% de survie	[143]
<i>A. culbertsoni</i>	H2O2, 3%	24h	tampon tryptose phosphate et enkystement	désenkystement en tampon tryptose phosphate	18-38%	[129]
<i>A. castellanii</i>	H2O2, 3%	10 et 30 min	PYG enkystement en PYG	désenkystement sur NNA + <i>E. coli</i>	reste des trophozoites et des kystes	[160]
<i>A. polyphaga</i>				observation de trophozoites	reste des trophozoites et des kystes	
<i>Acanthamoebae</i> spp.	H2O2, 3%	/	PYG enkystement en tampon Neff	survie des amibes en gélose	temps nécessaire 4-8h jusqu'à 2 jours	[145]
<i>A. castellanii</i>	H2O2, 3%	6H	croissance sur gélose	désenkystement sur	33% 100%	[126]

<i>A. polyphaga</i>			NNA + <i>E. coli</i>	NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	66% 100% 33% 66%	
<i>A. hatchetti</i>						
<i>A. castellanii</i> Neff	H2O2	0 à 36h	PYG enkystement tampon Neff	survie des amibes en gélose	MTC: 0.6µg/ml MCC:2.1µg/ml	[134]
<i>A. polyphaga</i> Ros	H2O2, 3%	0 à 8h	PYG enkystement en tampon Neff	désenkystement sur NNA + <i>E.</i> <i>coli</i> observation de trophozoites	>3-log de réduction après 8h	[158]
<i>A. castellanii</i>	H2O2, 3%	4h	PYG enkystement en tampon de Page	culture en PYG	résistant	[159]
<i>A. polyphaga</i>	H2O2, 3%	4-6h	croissance en mileu 6 enkystement en MgCl, NNA, Neff, Taurine	désenkystement avec <i>E. coli</i> observation de trophozoites	0.9± 0.3 à 4.3± 0.1 log de réduction	[122]
<b>Acide peracétique</b>						
<i>A. polyphaga</i> Linc-AP1	PAA	30min-2h	PYG	culture en PYG microscopie	24h: efficace sur les trophozoites	[163]
<i>A. polyphaga</i>	PAA 1-1200 mg/l	2-18h	PYG / PAS + <i>E. coli</i> tampon de Neff	PAS + <i>E. coli</i> microscopie	à 18h MAC: 8 mg/l MCC: 150 mg/l	kilvington 1990
<b>Aldehydes: Glutaraldéhyde, OPA, Formaldéhyde</b>						
<i>A. polyphaga</i> Linc-AP1	glutaraldéhyde 2%	30min-24h	PYG	culture en PYG microscopie	24h: efficace sur les trophozoites	[163]
<i>A. castellanii</i>	formaline 10%	30min	PYG enkystement en tampon de Page	culture en PYG	sensible	[159]

**Alcools:** Ethanol, n-propanol, Alcool isopropylique

<i>A. castellanii</i>	alcool isopropylique 20%	6h	PYG enkystement en tampon de Page	culture en PYG	sensible	[159]
<i>A. culbertsoni</i>	alcool isopropylique 20%, surfactant	24h	tampon tryptose phosphate et enkystement	déenkystement en tampon tryptose phosphate	94%	[129]

**Biocides physiques****Température**

<i>A. castellanii</i> Neff	chaleur	0 à 36h	PYG enkystement tampon Neff	survie des amibes en gélose	MTC: 46°C MCC:56°C	[134]
<i>A. castellanii</i> <i>Acanthamoeba</i> sp.	chaleur 80°C	10-60 min	PYG	déenkystement en PYG et sur NNA + <i>E. coli</i>	survie 10min	[151]
<i>A. castellanii</i> <i>A. polyphaga</i>	chaleur 80°C	10min	PYG enkystement en PYG	déenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	100%	[160]
<i>A. castellanii</i>	chaleur 65°C -160°C/45°C 5 fois	5-20min /	PYG enkystement en tampon de Page	culture en PYG	sensible résistant	[159]
<i>A. castellanii</i> <i>A. polyphaga</i>	congélation/décongélation température -60°C	15sec 3-5min	PYG enkystement en PYG	survie des amibes en gélose	3 plaques/3 2 plaques/3	[172]
<i>A. castellanii</i> <i>A. polyphaga</i>	température -50 à -130°C	60sec	PYG enkystement en PYG	déenkystement sur NNA + <i>E. coli</i> observation de trophozoites	trophozoites 100% reste des kystes	[171]
<i>A. polyphaga</i>	50 à 70°C	5min à 2h	NNA + <i>E. coli</i>	évaluation énumération	1 à >5 log de réduction	[155]

## UV

<i>A. culbertsoni</i> ATCC 30171	60 mW·s/cm <sup>2</sup> 170 mW·s/cm <sup>2</sup>		NNA + <i>E. coli</i>	microscopie	2 à 4 log de réduction	[166]
<i>A. polyphaga</i>	26, 36, 213, 618, 1212 mJ/cm <sup>2</sup>		NNA + <i>E. coli</i>	énumération	2.4 à >4.5 log de réduction	[155]
<i>A. polyphaga</i> <i>Ros</i>	870W/m <sup>2</sup> à 300 nm	0 à 8h	milieu axénique semi-défini enkystement en milieu de culture + 50-mmol MgCl <sub>2</sub> milieu axénique semi-défini	culture en Ringer + <i>E. coli</i>	trophozoites: 4 log de réduction en 2-6 kystes: pas de réduction après 8h	[435]
<i>A. polyphaga</i> <i>Ros</i>	850 W/m <sup>2</sup>	0 à 6h	enkystement en milieu de culture + 50-mmol MgCl <sub>2</sub> PYG	culture en Ringer + <i>E. coli</i>	6h à 50°C ou 4H à 55% pour inactiver tous les kystes	[436]
<i>A. castellanii</i>	UVB 200–800 mJ/cm <sup>2</sup>	/	enkystement en tampon de Page	culture en PYG	résistant	[159]

## Radiations gamma

<i>A. castellanii</i>	50-250 Krad	/	enkystement en tampon de Page	culture en PYG	résistant	[159]
-----------------------	-------------	---	-------------------------------	----------------	-----------	-------

## Autres traitements

<i>A. comandoni</i>						
<i>A. castellanii</i>	micro-onde	3-8 min	/	/	100% trophozoites et kystes après 3 min	[170]
<i>A. hatchetti</i>						

MCC : concentration minimale cysticide

MAC : concentration minimale amoebicide (trophozoites)

En gris : résistant

En bleu : sensible

Ce tableau résume l'activité de différents biocides sur les kystes et/ou trophozoites de différentes *Acanthamoebae*.

Il met en évidence la multitude de protocoles utilisés (souches, méthode de culture des trophozoites, méthode d'enkystement, de lecture...) ainsi que les différences de résultats obtenus, parfois meme pour des souches identiques.

Ce tableau permet donc de mettre en évidence la difficulté de comparer les différentes études disponibles ainsi que les résultats souvent discordants qui en resultent.

## **Références bibliographiques**



1. Castellani, A., *An amoeba found in culture of a yeast: preliminary note*. J. Trop. Med. Hyg., 1930. **33:160**.
2. Culbertson, C.G., et al., *Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba*. Am J Pathol, 1959. **35(1)**: p. 185-97.
3. Jager, B.V. and W.P. Stamm, *Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus Hartmannella in a patient with Hodgkin's disease*. Lancet, 1972. **2(7791)**: p. 1343-5.
4. Naginton, J., et al., *Amoebic infection of the eye*. Lancet, 1974. **2(7896)**: p. 1537-40.
5. Khan, N.A., *Acanthamoeba: biology and pathogenesis*. 2009.
6. Marciano-Cabral, F. and G. Cabral, *Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16(2)**: p. 273-307.
7. Liu, H., et al., *Genetic diversity of Acanthamoeba isolated from ocean sediments*. Korean J Parasitol, 2006. **44(2)**: p. 117-25.
8. Ettinger, M.R., et al., *Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA*. Parasitol Res, 2003. **89(1)**: p. 6-15.
9. Lorenzo-Morales, J., et al., *Pathogenic Acanthamoeba strains from water sources in Jamaica, West Indies*. Ann Trop Med Parasitol, 2005. **99(8)**: p. 751-8.
10. Kasprzak, W., *[Free-living, potentially pathogenic amoebae in natural environments]*. Wiad Parazytol, 1974. **20(2-3)**: p. 244-6.
11. Befinger, M., P. Myjak, and H. Pietkiewicz, *Occurrence of amphizoic amoebae in Lake Zarnowieckie*. Bull Inst Marit Trop Med Gdynia, 1986. **37(3-4)**: p. 275-86.
12. da Silva, M.A. and J.A. da Rosa, *[Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust]*. Rev Saude Publica, 2003. **37(2)**: p. 242-6.
13. Sawyer, T.K., *Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55(5)**: p. 1074-7.
14. Rivera, F., et al., *Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs*. Environ Res, 1987. **42(1)**: p. 149-54.
15. Rodriguez-Zaragoza, S., et al., *Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosi, SLP, Mexico*. J Expo Anal Environ Epidemiol, 1993. **3 Suppl 1**: p. 229-41.
16. Rivera F., B.P., Ramirez E., Calderon A., Gallegos E., Rodriguez S., Ortiz R., Hernandez D. & Rivera V., *Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico city and its suburbs*. Water, Air, and Soil Pollution, 1994. **74, 65-87**.
17. Rodriguez-Zaragoza, M.-B., *Prevalence of pathogenic Acanthamoeba (Protozoa:Amoebidae) in the atmosphere of the city of San Luis Potosi, Mexico*. Toxicology and Industrial Health, 1997. **13, 519-526**.
18. Kingston, D. and D.C. Warhurst, *Isolation of amoebae from the air*. J Med Microbiol, 1969. **2(1)**: p. 27-36.
19. Brown, T.J., R.T. Cursons, and E.A. Keys, *Amoebae from antarctic soil and water*. Appl Environ Microbiol, 1982. **44(2)**: p. 491-3.

20. Rezaeian M , N.M., Farnia Sh, \* Motevalli Haghi A, *Isolation of Acanthamoeba Spp. from Different Environmental Sources*. Iranian J Parasitol, 2008. **Vol.3, No.1, 2008**, : p. pp. 44-47.
21. Rodriguez Zaragoza, S., E. Mayzlish, and Y. Steinberger, *Seasonal changes in free-living amoeba species in the root canopy of Zygophyllum dumosum in the Negev Desert, Israel*. Microb Ecol, 2005. **49**(1): p. 134-41.
22. Schuster, F.L. and G.S. Visvesvara, *Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals*. Int J Parasitol, 2004. **34**(9): p. 1001-27.
23. Khan, N.A., *Pathogenesis of Acanthamoeba infections*. Microb Pathog, 2003. **34**(6): p. 277-85.
24. Khan, N.A., *Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(4): p. 564-95.
25. De Jonckheere, J.F., *Ecology of Acanthamoeba*. Rev Infect Dis, 1991. **13 Suppl 5**: p. S385-7.
26. Barbaree, J.M., et al., *Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of Legionella pneumophila*. Appl Environ Microbiol, 1986. **51**(2): p. 422-4.
27. Berk, S.G., et al., *Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(23): p. 7440-4.
28. Cerva, L., *Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of Naegleria*. Science, 1969. **163**(867): p. 576.
29. Cerva, L. and G. Huldt, *Limax amoebae in five swimming pools in Stockholm*. Folia Parasitol (Praha), 1974. **21**(1): p. 71-5.
30. Rivera, F., et al., *Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico*. J Protozool, 1981. **28**(1): p. 54-6.
31. Napolitano, J.J., *Isolation of amoebae from edible mushrooms*. Appl Environ Microbiol, 1982. **44**(1): p. 255-7.
32. Barbeau, J. and T. Buhler, *Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines*. Res Microbiol, 2001. **152**(8): p. 753-60.
33. John, T., D. Desai, and D. Sahm, *Adherence of Acanthamoeba castellanii cysts and trophozoites to unworn soft contact lenses*. Am J Ophthalmol, 1989. **108**(6): p. 658-64.
34. Larkin, D.F., S. Kilvington, and D.L. Easty, *Contamination of contact lens storage cases by Acanthamoeba and bacteria*. Br J Ophthalmol, 1990. **74**(3): p. 133-5.
35. Michel, R. and T. Menn, *[Acanthamoeba, Naegleria and invertebrates in wet areas of physiotherapy equipment in hospitals]*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1991. **191**(4): p. 423-37.
36. Rohr, U., et al., *Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(5): p. 1822-4.
37. Thomas, V., et al., *Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(4): p. 2428-2438.

38. Casemore, D.P., *Free-living amoebae in home dialysis unit*. Lancet, 1977. **2**(8047): p. 1078.
39. Paszko-Kolva, C., et al., *Isolation of amoebae and Pseudomonas and Legionella spp. from eyewash stations*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(1): p. 163-7.
40. Walochnik J, A.H., *Die Parasiten des Menschen aus der Sicht der Koevolution*. Denisia 20, zugleich Kataloge der Oberösterreichischen Landesmuseen, 2007: p. pp. 323ff.
41. Pussard, M., and R. Pons., *Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoebae(Protozoa, Amoebida)*. Protistologica, 1977. **13**: p. 557:598.
42. Daggett, P.M., et al., *A molecular approach to the phylogeny of Acanthamoeba*. Biosystems, 1985. **18**(3-4): p. 399-405.
43. Stratford, M.P., and A. J. Griffiths., *Variations in the properties and morphology of cysts of Acanthamoeba castellanii*. J. Gen. Microbiol., 1978. **108**: p. 33.
44. Pecavar, V., *Amoeba of medical relevance in reptiles. Establishment of a PCR detection system for parasitic amoebae.*, in *Antropology*. 2009, University of Vienna: Vienna, Austria.
45. Pussard M, P.R., *Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoebae(Protozoa, Amoebida)*. Protistologica, 1977. **13**: p. 557:598.
46. Walochnik J, A.H., *Die Diagnostik von Infektionen mit freilebenden Amöben (FLA) Diagnostics of Infections with free-living amoebae (FLA)*. LaboratoriumsMedizin. , 2005. **Band 29, Heft 6**: p. Seiten 446-456.
47. Corsaro, D. and D. Venditti, *Phylogenetic evidence for a new genotype of Acanthamoeba (Amoebozoa, Acanthamoebida)*. Parasitol Res, 2010. **107**(1): p. 233-8.
48. Gast, R.J., et al., *Subgenus systematics of Acanthamoeba: four nuclear 18S rDNA sequence types*. J Eukaryot Microbiol, 1996. **43**(6): p. 498-504.
49. Stothard, D.R., et al., *The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types*. J Eukaryot Microbiol, 1998. **45**(1): p. 45-54.
50. Horn, M., et al., *Novel bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. related to the Paramecium caudatum symbiont Caedibacter caryophilus*. Environ Microbiol, 1999. **1**(4): p. 357-67.
51. Gast, R.J., *Development of an Acanthamoeba-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype*. J Eukaryot Microbiol, 2001. **48**(6): p. 609-15.
52. Hewett, M.K., Robinson, B.S., Monis, P.T., Saint, C.P., *Identification of a new Acanthamoeba 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species Acanthamoeba jacobsi Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae)*. Acta Protozoologica 2003. **42**: p. 325-329.
53. Neff, R.J. and R.H. Neff, *The biochemistry of amoebic encystment*. Symp Soc Exp Biol, 1969. **23**: p. 51-81.
54. Band, R.N. and S. Mohrlök, *The cell cycle and induced amitosis in Acanthamoeba*. J Protozool, 1973. **20**(5): p. 654-7.

55. Bowers, B. and E.D. Korn, *The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment*. J Cell Biol, 1969. **41**(3): p. 786-805.
56. Chavez-Munguia, B., et al., *Ultrastructural study of encystation and excystation in Acanthamoeba castellanii*. J Eukaryot Microbiol, 2005. **52**(2): p. 153-8.
57. Weisman, R.A., *Differentiation in Acanthamoeba castellanii*. Annu Rev Microbiol, 1976. **30**: p. 189-219.
58. Dudley, R., E.L. Jarroll, and N.A. Khan, *Carbohydrate analysis of Acanthamoeba castellanii*. Exp Parasitol, 2009. **122**(4): p. 338-43.
59. Barrett, R.A. and M. Alexander, *Resistance of Cysts of Amoebae to Microbial Decomposition*. Appl Environ Microbiol, 1977. **33**(3): p. 670-674.
60. Sriram, R., et al., *Survival of Acanthamoeba cysts after desiccation for more than 20 years*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(12): p. 4045-8.
61. Kliescikova, J., J. Kulda, and E. Nohynkova, *Stress-Induced Pseudocyst Formation - A Newly Identified Mechanism of Protection against Organic Solvents in Acanthamoebae of the T4 Genotype*. Protist, 2010.
62. Kliescikova, J., J. Kulda, and E. Nohynkova, *Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in acanthamoebae*. Exp Parasitol, 2010.
63. Hirukawa, Y., et al., *Structure and expression of a cyst specific protein of Acanthamoeba castellanii*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1398**(1): p. 47-56.
64. Krishna-Murti, C.R.S., O. P., *Differenciation of pathogenic amoebae :encystation and excystation of Acanthamoeba culbertsoni - A model*. Journal of Biosciences, 1984. **6**(475-489).
65. Dudley, R., S. Alsam, and N.A. Khan, *The role of proteases in the differentiation of Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **286**(1): p. 9-15.
66. Griffiths, A.J. and S.M. Bowen, *Some aspects of the control of encystment of an amoeba Hartmanella castellanii*. J Gen Microbiol, 1968. **53**(1): p. Suppl:ix.
67. Byers, T.J., et al., *Molecular aspects of the cell cycle and encystment of Acanthamoeba*. Rev Infect Dis, 1991. **13 Suppl 5**: p. S373-84.
68. Dudley, R., S. Alsam, and N.A. Khan, *Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of Acanthamoeba keratitis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **75**(1): p. 133-40.
69. Korn, E.D. and R.A. Weisman, *Phagocytosis of latex beads by Acanthamoeba. II. Electron microscopic study of the initial events*. J Cell Biol, 1967. **34**(1): p. 219-27.
70. Bowers, B. and T.E. Olszewski, *Pinocytosis in Acanthamoeba castellanii. Kinetics and morphology*. J Cell Biol, 1972. **53**(3): p. 681-94.
71. Bowers, B. and T.E. Olszewski, *Acanthamoeba discriminates internally between digestible and indigestible particles*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 317-22.
72. Bowers, B., *A morphological study of plasma and phagosome membranes during endocytosis in Acanthamoeba*. J Cell Biol, 1980. **84**(2): p. 246-60.

73. Garner, A., *Pathogenesis of acanthamoebic keratitis: hypothesis based on a histological analysis of 30 cases*. Br J Ophthalmol, 1993. **77**(6): p. 366-70.
74. Vemuganti, G.K., et al., *Keratocyte loss in corneal infection through apoptosis: a histologic study of 59 cases*. BMC Ophthalmol, 2004. **4**: p. 16.
75. Vemuganti, G.K., et al., *Keratocyte loss in Acanthamoeba keratitis: phagocytosis, necrosis or apoptosis?* Indian J Ophthalmol, 2000. **48**(4): p. 291-4.
76. Barratt, J.L., et al., *Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(4): p. 795-836.
77. Beattie, T.K., et al., *Enhanced attachment of acanthamoeba to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection?* Ophthalmology, 2003. **110**(4): p. 765-71.
78. John, T., D. Desai, and D. Sahm, *Adherence of Acanthamoeba castellanii to new daily wear, extended wear, and disposable soft contact lenses*. Clao J, 1991. **17**(2): p. 109-13.
79. John, T., D. Desai, and D. Sahm, *Adherence of Acanthamoeba castellanii cysts and trophozoites to extended wear soft contact lenses*. Rev Infect Dis, 1991. **13 Suppl 5**: p. S419-20.
80. Kilvington, S. and D.F. Larkin, *Acanthamoeba adherence to contact lenses and removal by cleaning agents*. Eye (Lond), 1990. **4 ( Pt 4)**: p. 589-93.
81. Niederkorn, J.Y., et al., *The pathogenesis of Acanthamoeba keratitis*. Microbes Infect, 1999. **1**(6): p. 437-43.
82. Chang, P.C. and H.K. Soong, *Acanthamoeba keratitis in non-contact lens wearers*. Arch Ophthalmol, 1991. **109**(4): p. 463-4.
83. Sharma, S., M. Srinivasan, and C. George, *Acanthamoeba keratitis in non-contact lens wearers*. Arch Ophthalmol, 1990. **108**(5): p. 676-8.
84. Dudley, R., et al., *Acanthamoeba isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells*. Acta Trop, 2005. **95**(2): p. 100-8.
85. Dart, J.K., F. Stapleton, and D. Minassian, *Contact lenses and other risk factors in microbial keratitis*. Lancet, 1991. **338**(8768): p. 650-3.
86. Alvord, L., et al., *Oxygen permeability of a new type of high Dk soft contact lens material*. Optom Vis Sci, 1998. **75**(1): p. 30-6.
87. Barr, O., MS, FAAO, *Contact Lens Spectrum's annual report of major corporate and product developments and events in the contact lens industry in 2004, as well as predictions for 2005*. Contact lens spectrum, 2005.
88. Stehr-Green, J.K., T.M. Bailey, and G.S. Visvesvara, *The epidemiology of Acanthamoeba keratitis in the United States*. Am J Ophthalmol, 1989. **107**(4): p. 331-6.
89. Radford, C.F., D.C. Minassian, and J.K. Dart, *Acanthamoeba keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors*. Br J Ophthalmol, 2002. **86**(5): p. 536-42.

90. Lam, D.S., et al., *Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America*. Eye (Lond), 2002. **16**(5): p. 608-18.
91. Seal, D.V., et al., *Population-based cohort study of microbial keratitis in Scotland: incidence and features*. Cont Lens Anterior Eye, 1999. **22**(2): p. 49-57.
92. Martinez, A.J. and K. Janitschke, *Acanthamoeba, an opportunistic microorganism: a review*. Infection, 1985. **13**(6): p. 251-6.
93. Martinez, A.J., *Infection of the central nervous system due to Acanthamoeba*. Rev Infect Dis, 1991. **13 Suppl 5**: p. S399-402.
94. Martinez, A.J. and G.S. Visvesvara, *Free-living, amphizoic and opportunistic amebas*. Brain Pathol, 1997. **7**(1): p. 583-98.
95. Heath, K.V., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV)/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) mortality in industrialized nations, 1987-1991*. Int J Epidemiol, 1998. **27**(4): p. 685-90.
96. Rivera, F., et al., *Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II*. Environ Res, 1986. **39**(2): p. 364-71.
97. Rivera, F., et al., *Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients*. Environ Res, 1984. **33**(2): p. 428-40.
98. Cerva, L., C. Serbus, and V. Skocil, *Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man*. Folia Parasitol (Praha), 1973. **20**(1): p. 97-103.
99. Lawande, R.V., et al., *Recovery of soil Amebas from the nasal passages of children during the dusty harmattan period in Zaria*. Am J Clin Pathol, 1979. **71**(2): p. 201-3.
100. Abraham, S.N. and R.V. Lawande, *Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population in Zaria, Nigeria*. J Trop Med Hyg, 1982. **85**(5): p. 217-22.
101. Santos, L.C., et al., *Acanthamoeba spp. in urine of critically ill patients*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(7): p. 1144-6.
102. Lanocha N., K.-B.D., Maciejewska A., Sawczuk M., Wilk A. & Kuzna-Grygiel W., *The occurrence Acanthamoeba (free living amoeba) in environmental and respiratory samples in Poland*. Acta Protozoologica, 2009. **48**, 271-279.
103. Wang, S.S. and H.A. Feldman, *Isolation of hartmannella species from human throats*. N Engl J Med, 1967. **277**(22): p. 1174-9.
104. May, L.P., G.S. Sidhu, and M.R. Buchness, *Diagnosis of Acanthamoeba infection by cutaneous manifestations in a man seropositive to HIV*. J Am Acad Dermatol, 1992. **26**(2 Pt 2): p. 352-5.
105. Selby, D.M., et al., *Amebic osteomyelitis in a child with acquired immunodeficiency syndrome: a case report*. Pediatr Pathol Lab Med, 1998. **18**(1): p. 89-95.
106. Nachega, J.B., et al., *Successful treatment of Acanthamoeba rhinosinusitis in a patient with AIDS*. AIDS Patient Care STDS, 2005. **19**(10): p. 621-5.
107. Rivera, M.A. and T.A. Padhya, *Acanthamoeba: a rare primary cause of rhinosinusitis*. Laryngoscope, 2002. **112**(7 Pt 1): p. 1201-3.

108. Hansen, B. and G. Kronborg, *Acanthamoeba keratitis in a non-contact lens wearer with human immunodeficiency virus*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(3): p. 207-9.
109. Kettesy, B., et al., [*Acanthamoeba keratitis*]. Orv Hetil, 2008. **149**(43): p. 2037-45.
110. Lindsay, R.G., et al., *Acanthamoeba keratitis and contact lens wear*. Clin Exp Optom, 2007. **90**(5): p. 351-60.
111. Dunand, V.A., et al., *Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review*. Clin Infect Dis, 1997. **25**(2): p. 267-72.
112. Sell, J.J., F.W. Rupp, and W.W. Orrison, Jr., *Granulomatous amebic encephalitis caused by acanthamoeba*. Neuroradiology, 1997. **39**(6): p. 434-6.
113. Helton, J., M. Loveless, and C.R. White, Jr., *Cutaneous acanthamoeba infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient*. Am J Dermatopathol, 1993. **15**(2): p. 146-9.
114. Rosenberg, A.S. and M.B. Morgan, *Disseminated acanthamoebiasis presenting as lobular panniculitis with necrotizing vasculitis in a patient with AIDS*. J Cutan Pathol, 2001. **28**(6): p. 307-13.
115. Heffler, K.F., et al., *Acanthamoeba endophthalmitis in acquired immunodeficiency syndrome*. Am J Ophthalmol, 1996. **122**(4): p. 584-6.
116. Duarte, A.G., et al., *Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2006. **25**(2): p. 237-40.
117. Fung, K.T., et al., *Cure of Acanthamoeba cerebral abscess in a liver transplant patient*. Liver Transpl, 2008. **14**(3): p. 308-12.
118. Oliva, S., et al., *Successful treatment of widely disseminated acanthamoebiasis*. South Med J, 1999. **92**(1): p. 55-7.
119. Steinberg, J.P., et al., *Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(5): p. e43-9.
120. Van Hamme, C., et al., [*Cutaneous acanthamoebiasis in a lung transplant patient*]. Ann Dermatol Venereol, 2001. **128**(11): p. 1237-40.
121. Vernon, S.E., et al., *Acanthamoeba infection in lung transplantation: report of a case and review of the literature*. Transpl Infect Dis, 2005. **7**(3-4): p. 154-7.
122. Hughes, R., W. Heaselgrave, and S. Kilvington, *Acanthamoeba polyphaga strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(10): p. 3080-4.
123. Anger, C. and J.M. Lally, *Acanthamoeba: a review of its potential to cause keratitis, current lens care solution disinfection standards and methodologies, and strategies to reduce patient risk*. Eye Contact Lens, 2008. **34**(5): p. 247-53.
124. Buck, S.L., R.A. Rosenthal, and B.A. Schlech, *Methods used to evaluate the effectiveness of contact lens care solutions and other compounds against Acanthamoeba: a review of the literature*. Clao J, 2000. **26**(2): p. 72-84.

125. Pumidonming, W., M. Koehsler, and J. Walochnik, *Acanthamoeba strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture*. Parasitol Res, 2009.
126. Johnston, S.P., et al., *Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection in multiple contact lens solutions*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(7): p. 2040-5.
127. Gilbert, P. and L.E. Moore, *Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet*. J Appl Microbiol, 2005. **99**(4): p. 703-15.
128. McDonnell, G., *Antisepsis, Disinfection and Sterilization. Types, Action and Resistance.*, ed. A. Press. 2007, Washington, DC: ASM Press.
129. Connor, C.G., S.L. Hopkins, and R.D. Salisbury, *Effectivity of contact lens disinfection systems against Acanthamoeba culbertsoni*. Optom Vis Sci, 1991. **68**(2): p. 138-41.
130. Penley, C.A., S.W. Willis, and S.G. Sickler, *Comparative antimicrobial efficacy of soft and rigid gas permeable contact lens solutions against Acanthamoeba*. Clao J, 1989. **15**(4): p. 257-60.
131. Silvany, R.E., et al., *The effect of currently available contact lens disinfection systems on Acanthamoeba castellanii and Acanthamoeba polyphaga*. Ophthalmology, 1990. **97**(3): p. 286-90.
132. Hugo, E.R., et al., *Quantitative enumeration of acanthamoeba for evaluation of cyst inactivation in contact lens care solutions*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(3): p. 655-7.
133. Cursons, R.T., T.J. Brown, and E.A. Keys, *Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions*. Appl Environ Microbiol, 1980. **40**(1): p. 62-6.
134. Turner, N.A., et al., *Emergence of resistance to biocides during differentiation of Acanthamoeba castellanii*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(1): p. 27-34.
135. Zanetti, S., et al., *Susceptibility of Acanthamoeba castellanii to contact lens disinfecting solutions*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(7): p. 1596-8.
136. Brandt, F.H., D.A. Ware, and G.S. Visvesvara, *Viability of Acanthamoeba cysts in ophthalmic solutions*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(5): p. 1144-6.
137. Elder, M.J., S. Kilvington, and J.K. Dart, *A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. **35**(3): p. 1059-64.
138. Hay, J., et al., *Drug resistance and Acanthamoeba keratitis: the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy*. Eye (Lond), 1994. **8 ( Pt 5)**: p. 555-63.
139. Seal, D., et al., *Successful medical therapy of Acanthamoeba keratitis with topical chlorhexidine and propamidine*. Eye (Lond), 1996. **10 ( Pt 4)**: p. 413-21.
140. Burger, R.M., R.J. Franco, and K. Drlica, *Killing acanthamoebae with polyaminopropyl biguanide: quantitation and kinetics*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(4): p. 886-8.
141. Khunkitti, W., et al., *The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of Acanthamoeba castellanii*. J Appl Bacteriol, 1996. **81**(1): p. 73-7.
142. Silvany, R.E., J.M. Dougherty, and J.P. McCulley, *Effect of contact lens preservatives on Acanthamoeba*. Ophthalmology, 1991. **98**(6): p. 854-7.



143. Cengiz, A.M., N. Harmis, and F. Stapleton, *Co-incubation of Acanthamoeba castellanii with strains of Pseudomonas aeruginosa alters the survival of amoeba*. Clin Experiment Ophthalmol, 2000. **28**(3): p. 191-3.
144. Kilvington, *Reducing the risk of microbial keratitis in soft contact lens wearers*. Optician, 1998.
145. Niszl, I.A. and M.B. Markus, *Anti-Acanthamoeba activity of contact lens solutions*. Br J Ophthalmol, 1998. **82**(9): p. 1033-8.
146. Buck, S.L., R.A. Rosenthal, and R.L. Abshire, *Amoebicidal activity of a preserved contact lens multipurpose disinfecting solution compared to a disinfection/neutralisation peroxide system*. Cont Lens Anterior Eye, 1998. **21**(3): p. 81-4.
147. Verani, J.R., et al., *National outbreak of Acanthamoeba keratitis associated with use of a contact lens solution, United States*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(8): p. 1236-42.
148. Mogoia, E., et al., *Acanthamoeba castellanii: cellular changes induced by chlorination*. Exp Parasitol. **126**(1): p. 97-102.
149. Thomas, V., et al., *Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence*. J Appl Microbiol, 2004. **97**(5): p. 950-963.
150. De Jonckheere, J. and H. van de Voorde, *Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine*. Appl Environ Microbiol, 1976. **31**(2): p. 294-7.
151. Storey, M.V., et al., *The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae*. Scand J Infect Dis, 2004. **36**(9): p. 656-662.
152. Kilvington, S. and J. Price, *Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure*. J Appl Bacteriol, 1990. **68**: p. 519-525.
153. Martin-Navarro, C.M., et al., *Acanthamoeba spp.: efficacy of Bioclen FR One Step, a povidone-iodine based system for the disinfection of contact lenses*. Exp Parasitol. **126**(1): p. 109-12.
154. Gatti, S., et al., *In vitro effectiveness of povidone-iodine on Acanthamoeba isolates from human cornea*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(9): p. 2232-4.
155. Loret , J., Robert , Anselme, Saucedo ,Ribas, Martinez et Catalan *Elimination of free-living amoebae by drinking water treatment processes*. Eur. j. water qual., 2008. **39**: p. 37-50.
156. Langlais, P., *Action of ozone on trophozoites and free amoeba cysts, whether pathogenic or not*. Ozone: science and engineering, 1986. **8**(187-98).
157. Grillot, R. and P. Ambroise-Thomas, *[Free-living amoebae in the Grenoble area swimming pool water. Influence of th "winter-summer" use and of the sterilising procedure (author's transl)]*. Rev Epidemiol Sante Publique, 1980. **28**(2): p. 185-207.
158. Hughes, R. and S. Kilvington, *Comparison of hydrogen peroxide contact lens disinfection systems and solutions against Acanthamoeba polyphaga*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2038-43.
159. Aksozek, A., et al., *Resistance of Acanthamoeba castellanii cysts to physical, chemical, and radiological conditions*. J Parasitol, 2002. **88**(3): p. 621-3.

160. Ludwig, I.H., et al., *Susceptibility of Acanthamoeba to soft contact lens disinfection systems*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986. **27**(4): p. 626-8.
161. Hughes, R., P.W. Andrew, and S. Kilvington, *Enhanced killing of Acanthamoeba cysts with a plant peroxidase-hydrogen peroxide-halide antimicrobial system*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(5): p. 2563-7.
162. Thomas V. & McDonnell, G., *Efficacy of hydrogen peroxyde gas against amoebal cysts and amoebae-associated mycobacteria*, in *Poster presented at the 108th ASM general meeting*. 2008: Boston, USA 1-5 June.
163. Greub, G. and D. Raoult, *Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2003. **24**(10): p. 784-6.
164. Meisler, D.M., et al., *Susceptibility of Acanthamoeba to surgical instrument sterilization techniques*. Am J Ophthalmol, 1985. **99**(6): p. 724-5.
165. Hijnen, W.A., E.F. Beerendonk, and G.J. Medema, *Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review*. Water Res, 2006. **40**(1): p. 3-22.
166. Maya, C., et al., *Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoebae inactivation*. Water Science and Technology: Water Supply, 2003. **3**(4): p. 285-291.
167. Hwang, T.S., et al., *Disinfection capacity of PuriLens contact lens cleaning unit against Acanthamoeba*. Eye Contact Lens, 2004. **30**(1): p. 42-3.
168. Loret, J.F., et al., *Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management*. Water Sci Technol, 2008. **58**(3): p. 571-7.
169. Hillebrandt, S. and I. Muller, *Repair of damage caused by UV- and X-irradiation in the amoeboflagellate Naegleria gruberi*. Radiat Environ Biophys, 1991. **30**(2): p. 123-30.
170. Hiti, K., et al., *Microwave treatment of contact lens cases contaminated with acanthamoeba*. Cornea, 2001. **20**(5): p. 467-70.
171. Meisler, D.M., et al., *Susceptibility of Acanthamoeba to cryotherapeutic method*. Arch Ophthalmol, 1986. **104**(1): p. 130-1.
172. Matoba, A.Y., et al., *The effects of freezing and antibiotics on the viability of Acanthamoeba cysts*. Arch Ophthalmol, 1989. **107**(3): p. 439-40.
173. Thomas, V., *Sensitivity and resistance of protozoa to biocides*, in *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization - 5th edition - In Press*, A. Fraiese, Lambert, PA and Maillard, J-Y, Editor. 2011.
174. Fenner, L., et al., *Are clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa more virulent than hospital environmental isolates in amebal co-culture test?* Crit Care Med, 2006. **34**(3): p. 823-8.
175. Goy, G., et al., *The Neff-strain of Acanthamoeba castellanii, a tool to test the virulence of Mycobacterium kansasii*. Research in Microbiology, 2007. **158**(4): p. 393-397.
176. Raoult, D., et al., *The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1344-50.
177. La Scola, B., et al., *A giant virus in amoebae*. Science, 2003. **299**(5615): p. 2033.

178. La Scola, B., *Mimivirus in pneumonia patients*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(3): p. 449-52.
179. Raoult, D., B. La Scola, and R. Birtles, *The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(1): p. 95-102.
180. La Scola, B., et al., *The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 100-4.
181. Boyer, M., et al., *Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21848-53.
182. Thomas, V., et al., *Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets*. Environmental Microbiology - In Press, 2011.
183. Mattana, A., et al., *Acanthamoeba castellanii promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(4): p. 665-71.
184. Lorenzo-Morales, J., et al., *Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of Acanthamoeba in the Canary Islands, Spain*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(4): p. 753-6.
185. Danes, L. and L. Cerva, *Survival of polioviruses and echoviruses in Acanthamoeba castellanii cultivated in vitro*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1981. **25**(2): p. 169-74.
186. Baron, D., C. Danglot, and R. Vilagines, *[Role of a free-living amoeba from water, Acanthamoeba castellanii, in the transport of naked or enveloped animal viruses]*. C R Seances Acad Sci D, 1980. **291**(7): p. 629-32.
187. Alp, S., *[Melanin and its role on the virulence of Cryptococcus neoformans.]*. Mikrobiyol Bul. **44**(3): p. 519-526.
188. Steenbergen, J.N., H.A. Shuman, and A. Casadevall, *Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **11**: p. 11.
189. Gomez-Couso, H., E. Paniagua-Crespo, and E. Ares-Mazas, *Acanthamoeba as a temporal vehicle of Cryptosporidium*. Parasitol Res, 2006.
190. Winiiecka-Krusnell, J., et al., *Toxoplasma gondii: uptake and survival of oocysts in free-living amoebae*. Exp Parasitol, 2009. **121**(2): p. 124-31.
191. Fritsche, T.R., et al., *Occurrence of bacterial endosymbionts in Acanthamoeba spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(5): p. 1122-6.
192. Heinz, E., et al., *An Acanthamoeba sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts*. Environ Microbiol, 2007. **9**(6): p. 1604-9.
193. King, C.H., et al., *Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination*. Appl Environ Microbiol, 1988. **54**(12): p. 3023-33.
194. Barker, J., et al., *Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation [published erratum appears in Appl Environ Microbiol 1992 Dec;58(12):4089]*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(8): p. 2420-5.

195. Rowbotham, T.J., *Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae*. J Clin Pathol, 1983. **36**(9): p. 978-86.
196. Rowbotham, T.J., *Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae*. J Clin Pathol, 1980. **33**(12): p. 1179-83.
197. Berk, S.G., et al., *Production of respirable vesicles containing live Legionella pneumophila cells by two Acanthamoeba spp.* Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(1): p. 279-86.
198. Hoebe, C.J. and J.L. Kool, *Control of legionella in drinking-water systems*. Lancet, 2000. **355**(9221): p. 2093-4.
199. Jadin, J.B., *Amibes Limax vecteurs possibles de Mycobacteries et de M. leprae*. Acta Leprol, 1975. **59**: p. 57-67.
200. Cirillo, J.D., et al., *Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3759-3767.
201. Adekambi, T., et al., *Amoebal coculture of "Mycobacterium massiliense" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5493-501.
202. Adekambi, T., et al., *Survival of environmental mycobacteria in Acanthamoeba polyphaga*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(9): p. 5974-81.
203. Miltner, E.C. and L.E. Bermudez, *Mycobacterium avium grown in Acanthamoeba castellanii is protected from the effects of antimicrobials*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(7): p. 1990-4.
204. Thomas, V., et al., *Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**: p. 231-259.
205. Ecke, D.J., et al., *The Microbial Rosetta Stone database: A common structure for microbial biosecurity threat agents*. BMC Microbiology, 2005. **5**(19).
206. Greub, G., B. La Scola, and D. Raoult, *Amoebae-resisting bacteria isolated from human nasal swabs by amoebal coculture*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(3): p. 470-7.
207. Pagnier, I., D. Raoult, and B. La Scola, *Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an Acanthamoeba polyphaga co-culture procedure*. Environ Microbiol, 2008. **10**(5): p. 1135-44.
208. Thomas, V., et al., *Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant*. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2728-45.
209. Rahman, M., et al., *Aeromonas-Acanthamoeba interaction and early shift to a viable but nonculturable state of Aeromonas by Acanthamoeba*. J Appl Microbiol, 2008. **104**(5): p. 1449-57.
210. Evstigneeva, A., et al., *Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and Streptococcus pneumoniae*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 2): p. 657-64.
211. Lebbadi, M., et al., *Cocultivation of the amoeba Naegleria fowleri and the amoebicin-producing strain Bacillus licheniformis M-4*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(4): p. 1649-52.

212. Landers, P., et al., *Survival and growth of Burkholderia cepacia within the free-living amoeba Acanthamoeba polyphaga*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. **19**(2): p. 121-3.
213. Lamothe, J., S. Thyssen, and M.A. Valvano, *Burkholderia cepacia complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of Acanthamoeba polyphaga*. Cell Microbiol, 2004. **6**(12): p. 1127-38.
214. Inglis, T.J., et al., *Interaction between Burkholderia pseudomallei and Acanthamoeba species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1681-6.
215. Axelsson-Olsson, D., et al., *Acanthamoeba-Campylobacter coculture as a novel method for enrichment of Campylobacter species*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(21): p. 6864-9.
216. Essig, A., et al., *Infection of Acanthamoeba castellanii by Chlamydia pneumoniae*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(4): p. 1396-9.
217. La Scola, B. and D. Raoult, *Survival of Coxiella burnetii within free-living amoeba Acanthamoeba castellanii*. Clin Microbiol Infect, 2001. **7**(2): p. 75-9.
218. Barker, J., T.J. Humphrey, and M.W. Brown, *Survival of Escherichia coli 0157 in a soil protozoan: implications for disease*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **173**(2): p. 291-5.
219. Alsam, S., et al., *Escherichia coli interactions with Acanthamoeba: a symbiosis with environmental and clinical implications*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 6): p. 689-94.
220. Abd, H., et al., *Survival and growth of Francisella tularensis in Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(1): p. 600-6.
221. Winiecka-Krusnell, J., et al., *Free-living amoebae promote growth and survival of Helicobacter pylori*. Scand J Infect Dis, 2002. **34**(4): p. 253-6.
222. Fields, B.S., et al., *Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of Legionella species*. Infect Immun, 1986. **53**(3): p. 553-9.
223. La Scola, B., et al., *Isolation of Legionella anisa using an amoebic coculture procedure*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(1): p. 365-6.
224. Thomas, V., N. Casson, and G. Greub, *Criblamydia sequanensis, a new intracellular Chlamydiales isolated from Seine river water using amoebal co-culture*. Environmental Microbiology, 2006. **8**(12): p. 2125-2135.
225. Kuroki, H., et al., *Legionella impletisoli sp. nov. and Legionella yabuuchiae sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan*. Syst Appl Microbiol, 2006.
226. Steele, T.W. and A.M. McLennan, *Infection of Tetrahymena pyriformis by Legionella longbeachae and other Legionella species found in potting mixes*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(3): p. 1081-3.
227. Doyle, R.M., et al., *Sequence analysis of the mip gene of the soilborne pathogen Legionella longbeachae*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1492-9.
228. Kuiper, M., *Occurrence of Legionella pneumophila and Hartmannella vermiformis in fresh water environments and their interactions in biofilms*. 2006, Wageningen University: Wageningen, the Netherlands.

229. La Scola, B., et al., *Amoeba-resisting bacteria and ventilator-associated pneumonia*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(7): p. 815-21.
230. Zhou, X., J. Elmore, and D.R. Call, *Interactions between the environmental pathogen Listeria monocytogenes and a free-living protozoan (Acanthamoeba castellanii)*. Environ Microbiol, 2007. **9**(4): p. 913-22.
231. Ly, T.M. and H.E. Muller, *Heat tolerance of free living and of intracellular Listeria*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1989. **189**(3): p. 272-6.
232. Ly, T.M. and H.E. Muller, *Ingested Listeria monocytogenes survive and multiply in protozoa*. J Med Microbiol, 1990. **33**(1): p. 51-4.
233. Steinert, M., et al., *Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with Acanthamoeba polyphaga and survive within cyst walls*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(6): p. 2256-2261.
234. Strahl, E.D., G.E. Gillaspay, and J.O. Falkinham, 3rd, *Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Mycobacterium scrofulaceum by Tetrahymena pyriformis and their intracellular growth*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4432-9.
235. Skriwan, C., et al., *Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba Dictyostelium discoideum*. Int J Med Microbiol, 2002. **291**(8): p. 615-24.
236. Mura, M., et al., *Replication and long-term persistence of bovine and human strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis within Acanthamoeba polyphaga*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 854-9.
237. Whan, L., I.R. Grant, and M.T. Rowe, *Interaction between Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and environmental protozoa*. BMC Microbiol, 2006. **6**: p. 63.
238. Taylor, S.J., et al., *Infection of Acanthamoeba castellanii with Mycobacterium bovis and M. bovis BCG and survival of M. bovis within the amoebae*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(7): p. 4316-9.
239. Lahiri, R. and J.L. Krahenbuhl, *The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle*. Lepr Rev, 2008. **79**(4): p. 401-9.
240. Solomon, J.M., G.S. Leung, and R.R. Isberg, *Intracellular replication of Mycobacterium marinum within Dictyostelium discoideum: efficient replication in the absence of host coronin*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3578-86.
241. Krishna Prasad, B.N. and S.K. Gupta, *Preliminary report on the engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown Acanthamoeba castellanii Douglas, 1930*. Current Science, 1978. **47**(7): p. 245-247.
242. Eddyani, M., et al., *Occurrence of free-living amoebae in communities of low and high endemicity for Buruli ulcer in southern Benin*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(21): p. 6547-53.
243. Drancourt, M., T. Adekambi, and D. Raoult, *Interactions between Mycobacterium xenopi, amoeba and human cells*. J Hosp Infect, 2006. **65**(2): p. 138-142.
244. Hundt, M.J. and C.G. Ruffolo, *Interaction of Pasteurella multocida with free-living amoebae*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(9): p. 5458-64.

245. Wagner, Y., et al., *Periodontopathogenic bacteria multiply in the environmental amoeba Acanthamoeba castellanii*. Int J Hyg Environ Health, 2006.
246. Michel, R., H. Burghardt, and H. Bergmann, [*Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with Pseudomonas aeruginosa, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital*]. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1995. **196**(6): p. 532-44.
247. Hwang, M.G., H. Katayama, and S. Ohgaki, *Effect of intracellular resuscitation of Legionella pneumophila in Acanthamoeba polyphaga cells on the antimicrobial properties of silver and copper*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(23): p. 7434-9.
248. Michel, R. and B. Hauröder, *Isolation of an Acanthamoeba strain with intracellular Burkholderia pickettii infection*. Zentralbl Bakteriologie, 1997. **285**(4): p. 541-57.
249. Gaze, W.H., et al., *Interactions between Salmonella typhimurium and Acanthamoeba polyphaga, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles*. Microb Ecol, 2003.
250. Saeed, A., et al., *Acanthamoeba castellanii an environmental host for Shigella dysenteriae and Shigella sonnei*. Arch Microbiol, 2009. **191**(1): p. 83-8.
251. Jeong, H.J., et al., *Acanthamoeba: could it be an environmental host of Shigella?* Exp Parasitol, 2007. **115**(2): p. 181-6.
252. Marciano-Cabral, F., *Introductory remarks: bacterial endosymbionts or pathogens of free-living amoebae I*. J Eukaryot Microbiol, 2004. **51**(5): p. 497-501.
253. Huws, S.A., et al., *Amoebae promote persistence of epidemic strains of MRSA*. Environ Microbiol, 2006. **8**(6): p. 1130-3.
254. Fallon, R.J. and T.J. Rowbotham, *Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to Legionella micdadei associated with use of a whirlpool*. J Clin Pathol, 1990. **43**(6): p. 479-83.
255. Thom, S., D. Warhurst, and B.S. Drasar, *Association of Vibrio cholerae with fresh water amoebae*. J Med Microbiol, 1992. **36**(5): p. 303-6.
256. Abd, H., A. Weintraub, and G. Sandstrom, *Intracellular survival and replication of Vibrio cholerae O139 in aquatic free-living amoebae*. Environ Microbiol, 2005. **7**(7): p. 1003-8.
257. Laskowski-Arce, M.A. and K. Orth, *Acanthamoeba castellanii promotes the survival of Vibrio parahaemolyticus*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(23): p. 7183-8.
258. Nikul'shin, S.V., et al., [*Associations of the soil amoeba Hartmannella rhyssodes with the bacterial causative agents of plague and pseudotuberculosis in an experiment*]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 1992(9-10): p. 2-5.
259. Thomas, V., N. Casson, and G. Greub, *New Afipia and Bosea strains isolated from various water sources by amoebal co-culture*. Systematic and Applied Microbiology, 2007: p. In Press.
260. Berger, P., et al., *Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(2): p. 248-255.

261. Birtles, R.J., et al., *Phylogenetic diversity of intra-amoebal legionellae as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison*. Microbiology, 1996. **142** ( Pt 12): p. 3525-30.
262. Birtles, R.J., et al., *Chlamydia-like obligate parasite of free-living amoebae*. Lancet, 1997. **349**(9056): p. 925-6.
263. McNally, C., et al., *Potential importance of Legionella species as etiologies in community acquired pneumonia (CAP)*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2000. **38**(2): p. 79-82.
264. Tomov, A.T., et al., *Persistence and multiplication of obligate anaerobe bacteria in amoebae under aerobic conditions*. Anaerobe, 1999. **5**: p. 19-23.
265. Bedson, S.P., and J. W. Bland., *Morphological study of psittacosis virus with the description of a developmental cycle*. Br. J. of Exp. Pathol, 1932. **13**:461-466.
266. Corsaro, D., et al., '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*', an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: Blattodea). Syst Appl Microbiol, 2007. **30**: p. 221-228.
267. Kostanjsek, R., et al., '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 2): p. 543-9.
268. Hatch, T.P., *Chlamydia. Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity*, in *Developmental Biology*. In R. S. Stephens (ed.). 1999, American Society for Microbiology, Washington, : D.C., USA. p. p. 29-68.
269. Haider, S., et al., *Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of chlamydiae*. Mol Microbiol.
270. Herring, A.J., *Typing Chlamydia psittaci--a review of methods and recent findings*. Br Vet J, 1993. **149**(5): p. 455-75.
271. Skerman, V.B.D., McGowan, V. & Sneath, P. H. A., *Approved lists of bacterial names*. Int J Syst Bacteriol, 1980. **30**: p. 225±420.
272. Page, L.A., *Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales) : unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus Chlamydia*, Jones, Rake and Stearns, 1945. Int J Syst Bacteriol, 1966. **16**: p. 22-252.
273. Page, L.A., *Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia*. Jones, Rake, and Stearns, 1945. Int J Sys Bacteriol, 1968. **18**: p. 51-66.
274. Storz, J., Page, L. A., *Taxonomy of the chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus Chamydia family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov.* Int J Syst Bacteriol, 1971. **21**: p. 332-334.
275. Grayston, J.T., Kuo, C.-C., Campbell, L. A. & Wang, S.-P., *Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp. strain TWAR*. Int J Syst Bacteriol, 1989. **39**: p. 88-90.
276. Fukushi, H. and K. Hirai, *Proposal of Chlamydia pecorum sp. nov. for Chlamydia strains derived from ruminants*. Int J Syst Bacteriol, 1992. **42**(2): p. 306-8.
277. Everett, K.D. and A.A. Andersen, *The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for Chlamydia spp.* Int J Syst Bacteriol, 1997. **47**(2): p. 461-73.



278. Kahane, S., E. Metzger, and M.G. Friedman, *Evidence that the novel microorganism 'Z' may belong to a new genus in the family Chlamydiaceae*. FEMS Microbiol Lett, 1995. **126**(2): p. 203-7.
279. Everett, K.D., R.M. Bush, and A.A. Andersen, *Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms*. Int J Syst Bacteriol, 1999. **49 Pt 2**: p. 415-40.
280. Rurangirwa, F.R., et al., *Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov.* Int J Syst Bacteriol, 1999. **49 Pt 2**: p. 577-81.
281. Greub, G., *International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae. minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA*. Int J Syst Bacteriol, 2010. **60**: p. 2691-2693.
282. Wheelhouse, N., et al., *Novel chlamydia-like organisms as cause of bovine abortions, UK*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(8): p. 1323-4.
283. Borel, N., et al., *Parachlamydia spp. and related Chlamydia-like organisms and bovine abortion*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(12): p. 1904-7.
284. Ruhl, S., et al., *Evidence for Parachlamydia in bovine abortion*. Vet Microbiol, 2009. **135**(1-2): p. 169-74.
285. Ruhl, S., et al., *Parachlamydia acanthamoebae infection and abortion in small ruminants*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(12): p. 1966-8.
286. Lieberman, D., et al., *Serological evidence of acute infection with the Chlamydia-like microorganism Simkania negevensis (Z) in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002. **21**(4): p. 307-9.
287. Friedman, M.G., B. Dvoskin, and S. Kahane, *Infections with the chlamydia-like microorganism Simkania negevensis, a possible emerging pathogen*. Microbes Infect, 2003. **5**(11): p. 1013-21.
288. Greenberg, D., et al., *High rate of Simkania negevensis among Canadian inuit infants hospitalized with lower respiratory tract infections*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(8): p. 506-8.
289. Baud, D., et al., *Waddlia chondrophila : A potential agent of human foetal death* Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(8): p. *In Press*.
290. Horn, m., *Chlamydiae as Symbionts in Eukaryotes*. Annu. Rev. Microbiol. 2008. **62**:113–31, 2008.
291. Bodetti, T.J., et al., *Wide range of Chlamydiales types detected in native Australian mammals*. Vet Microbiol, 2003. **96**(2): p. 177-87.
292. Chua, P.K., et al., *Isolation of Waddlia malaysiensis, a novel intracellular bacterium, from fruit bat (Eonycteris spelaea)*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(2): p. 271-7.
293. Corsaro, D. and D. Venditti, *Emerging chlamydial infections*. Crit Rev Microbiol, 2004. **30**(2): p. 75-106.

294. Draghi, A., 2nd, et al., *Characterization of "Candidatus Piscichlamydia salmonis" (Order Chlamydiales), a Chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (Salmo salar)*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(11): p. 5286-97.
295. Greub, G. and D. Raoult, *Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(6): p. 625-30.
296. Michel, R., et al., *Free-living amoebae serve as a host for the Chlamydia-like bacterium Simkania negevensis*. Acta Protozoologica, 2005. **44**: p. 113-121.
297. Michel, R., et al., *Free-living amoebae may serve as hosts for the Chlamydia-like bacterium Waddlia chondrophila isolated from an aborted bovine foetus*. Acta Protozoologica, 2004. **43**: p. 37-42.
298. Soldati, G., et al., *Detection of mycobacteria and chlamydiae in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study*. Vet Pathol, 2004. **41**(4): p. 388-97.
299. Thao, M.L., et al., *Phylogenetic evidence for two new insect-associated Chlamydia of the family Simkaniaceae*. Curr Microbiol, 2003. **47**(1): p. 46-50.
300. de Barbeyrac, B. and C. Bebear, *[Chlamydial pathogenesis: diagnostic and therapeutic consequences]*. Arch Pediatr, 2005. **12 Suppl 1**: p. S26-31.
301. Iovieno, A., et al., *Detection of bacterial endosymbionts in clinical acanthamoeba isolates*. Ophthalmology, 2010. **117**(3): p. 445-52, 452 e1-3.
302. Grayston, J.T., et al., *A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR*. J Infect Dis, 1990. **161**(4): p. 618-25.
303. Kuo, C.C., et al., *Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries*. J Infect Dis, 1993. **167**(4): p. 841-9.
304. Mussa, F.F., et al., *Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update*. J Vasc Surg, 2006. **43**(6): p. 1301-7.
305. Greub, G. and D. Raoult, *Crescent bodies of Parachlamydia acanthamoeba and its life cycle within Acanthamoeba polyphaga: an electron micrograph study*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(6): p. 3076-84.
306. Greub, G., J.L. Mege, and D. Raoult, *Parachlamydia acanthamoeba enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis*. Infect Immun, 2003. **71**(10): p. 5979-85.
307. Greub, G., et al., *Lack of microbicidal response in human macrophages infected with Parachlamydia acanthamoebae*. Microbes Infect, 2005. **7**(4): p. 714-9.
308. Marrie, T.J., et al., *Legionella-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(6): p. 1026-9.
309. Greub, G., et al., *Serological hint suggesting that Parachlamydiaceae are agents of pneumonia in polytraumatized intensive care patients*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **990**: p. 311-9.
310. Ossewaarde, J.M. and A. Meijer, *Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales*. Microbiology, 1999. **145**(Pt 2): p. 411-7.

311. Haider, S., et al., *Chlamydia-like bacteria in respiratory samples of community-acquired pneumonia patients*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **281**(2): p. 198-202.
312. Corsaro, D., et al., *A new Chlamydia-like 16S rDNA sequence from a clinical sample*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 3): p. 515-516.
313. Greub, G., et al., *Parachlamydiaceae as rare agents of pneumonia*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(6): p. 755-6.
314. Baud, D., et al., *Evidence of maternal-fetal transmission of Parachlamydia acanthamoebae*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(1): p. 120-1.
315. Contini, C., et al., *Molecular detection of Parachlamydia-like organisms in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. Mult Scler, 2008. **14**(4): p. 564-6.
316. Greub, G., *Parachlamydia acanthamoebae, an emerging agent of pneumonia*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(1): p. 18-28.
317. Casson, N., et al., *Parachlamydia acanthamoebae enters and multiplies within pneumocytes and lung fibroblasts*. Microbes Infect, 2006. **8**(5): p. 1294-1300.
318. Casson, N., et al., *Murine model of pneumonia caused by Parachlamydia acanthamoebae*. Microb Pathog, 2008.
319. Amann, R., et al., *Obligate intracellular bacterial parasites of Acanthamoebae related to Chlamydia spp.* Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(1): p. 115-121.
320. Greub, G., et al., *High throughput sequencing and proteomics to identify immunogenic proteins of a new pathogen: the dirty genome approach*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8423.
321. Collingro, A., et al., *Recovery of an environmental chlamydia strain from activated sludge by co-cultivation with Acanthamoeba sp.* Microbiology, 2005. **151**(Pt 1): p. 301-9.
322. Fritsche, T.R., et al., *Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of Acanthamoeba spp.* Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(6): p. 2613-9.
323. Fritsche, T.R., D. Sobek, and R.K. Gautom, *Enhancement of in vitro cytopathogenicity by Acanthamoeba spp. following acquisition of bacterial endosymbionts*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **166**(2): p. 231-6.
324. Collingro, A., et al., *'Candidatus Protochlamydia amoebophila', an endosymbiont of Acanthamoeba spp.* Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 5): p. 1863-6.
325. Horn, M., et al., *Illuminating the evolutionary history of chlamydiae*. Science, 2004. **304**(5671): p. 728-30.
326. Nakamura, S., *Endosymbiotic bacterium Protochlamydia can survive in acanthamoebae following encystation*. Environmental Microbiology Reports, 2010. **2**(611-618).
327. Michel, R., et al., *A coccoid bacterial parasite of Naegleria sp. (Schizopyrenida: Vahlkampfiidae) inhibits cyst formation of its host but not transformation to the flagellate stage*. Acta Protozoologica, 2000. **39**: p. 199 - 207.
328. Casson, N., et al., *Protochlamydia naegleriophila as etiologic agent of pneumonia*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(1): p. 168-72.

329. Horn, M., et al., *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*, 2000. **146**(Pt 5): p. 1231-9.
330. von Bomhard, W., et al., *Detection of novel chlamydiae in cats with ocular disease*. *Am J Vet Res*, 2003. **64**(11): p. 1421-8.
331. Draghi, A., 2nd, et al., *Characterization of a Neochlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in cultured Arctic charr *Salvelinus alpinus**. *Dis Aquat Organ*, 2007. **76**(1): p. 27-38.
332. Corsaro, D., et al., *Novel Chlamydiales strains isolated from a water treatment plant*. *Environ Microbiol*, 2009. **11**(1): p. 188-200.
333. Dilbeck, P.M., et al., *Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus*. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**(4): p. 814-6.
334. Corsaro, D., M. Valassina, and D. Venditti, *Increasing diversity within Chlamydiae*. *Crit Rev Microbiol*, 2003. **29**(1): p. 37-78.
335. Henning, K., et al., *Neospora caninum and Waddlia chondrophila strain 2032/99 in a septic stillborn calf*. *Vet Microbiol*, 2002. **85**(3): p. 285-92.
336. Bertelli, C., et al., *The Waddlia genome: a window into chlamydial biology*. *PLoS One*. **5**(5): p. e10890.
337. Dilbeck-Robertson, P., et al., *Results of a new serologic test suggest an association of Waddlia chondrophila with bovine abortion*. *J Vet Diagn Invest*, 2003. **15**(6): p. 568-9.
338. Borel, N., et al., *Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland*. *Vet Pathol*, 2006. **43**(5): p. 702-8.
339. Baud, D., L. Regan, and G. Greub, *Emerging role of Chlamydia and Chlamydia-like organisms in adverse pregnancy outcomes*. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. **21**(1): p. 70-6.
340. Goy, G., et al., *Development of a real-time PCR for the specific detection of Waddlia chondrophila in clinical samples*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009. **28**(12): p. 1483-6.
341. Goy, G., A. Croxatto, and G. Greub, *Waddlia chondrophila enters and multiplies within human macrophages*. *Microbes Infect*, 2008.
342. Everett, K.D., et al., *An unspliced group I intron in 23S rRNA links Chlamydiales, chloroplasts, and mitochondria*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(16): p. 4734-40.
343. Horn, M. and M. Wagner, *Evidence for additional genus-level diversity of Chlamydiales in the environment*. *FEMS Microbiol Lett*, 2001. **204**(1): p. 71-4.
344. Kahane, S., et al., *Infection of Acanthamoeba polyphaga with Simkania negevensis and S. negevensis survival within amoebal cysts*. *Appl Environ Microbiol*, 2001. **67**(10): p. 4789-95.
345. Lieberman, D., S. Kahane, and M.G. Friedman, *Pneumonia with serological evidence of acute infection with the Chlamydia-like microorganism "Z"*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 578-82.
346. Kahane, S., et al., *High prevalence of "Simkania Z," a novel Chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis*. *J Infect Dis*, 1998. **177**(5): p. 1425-9.

347. Friedman, M.G., et al., *Seroprevalence of IgG antibodies to the chlamydia-like microorganism 'Simkania Z' by ELISA*. *Epidemiol Infect*, 1999. **122**(1): p. 117-23.
348. Kahane, S. *Partial characterization of Simkania negevensis isolates and comparison with Chlamydiales type strains*. in *Proceedings of the Fourth Meeting of the European Society for Chlamydial Research 2000*. Bologna, Italy.
349. Fasoli, L., et al., *Simkania negevensis in community-acquired pneumonia in Italian children*. *Scand J Infect Dis*, 2008. **40**(3): p. 269-72.
350. Heiskanen-Kosma, T., M. Paldanius, and M. Korppi, *Simkania negevensis may be a true cause of community acquired pneumonia in children*. *Scand J Infect Dis*, 2007: p. 1-4.
351. Friedman, D., Hartley. *Seropositivity for the novel microorganism Simkania negevensis in Israel, North America and Great Britain*. in *Proceedings of the Fourth Meeting of the European Society for Chlamydial Research 2000*. Bologna, Italy.
352. Friedman, M.G., et al., *Detection of Simkania negevensis by culture, PCR, and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK*. *J Clin Pathol*, 2006. **59**(3): p. 331-3.
353. Husain, S., et al., *Simkania negevensis in bronchoalveolar lavage of lung transplant recipients: a possible association with acute rejection*. *Transplantation*, 2007. **83**(2): p. 138-43.
354. Shay, M.T., et al., *Chlamydia isopodii sp. n., an obligate intracellular parasite of Porcellio scaber*. *Exp Cell Biol*, 1985. **53**(2): p. 115-20.
355. Drobne, D., et al., *Morphological description of bacterial infection of digestive glands in the terrestrial isopod Porcellio scaber (Isopoda, crustacea)*. *J Invertebr Pathol*, 1999. **73**(1): p. 113-9.
356. Lamoth, F., et al., *Parachlamydia and rhabdochlamydia in premature neonates*. *Emerg Infect Dis*, 2009. **15**(12): p. 2072-5.
357. Casson, N., et al., *New diagnostic real-time PCR for specific detection of Parachlamydia acanthamoebae DNA in clinical samples*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(4): p. 1491-3.
358. Maurin, M., A. Bryskier, and D. Raoult, *Antibiotic susceptibilities of Parachlamydia acanthamoeba in amoebae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(9): p. 3065-7.
359. Janda, *Amoeba-Resistant Bacteria: Their Role in Human Infections*. *Clinical microbiology newsletter*, 2010. **32**(n°23).
360. Goy, G. and G. Greub, *Antibiotic susceptibility of Waddlia chondrophila in Acanthamoeba castellanii amoeba*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009.
361. Kahane, S., et al., *Simkania negevensis strain ZT: growth, antigenic and genome characteristics*. *Int J Syst Bacteriol*, 1999. **49 Pt 2**: p. 815-20.
362. Casson, N. and G. Greub, *Resistance of different Chlamydia-like organisms to quinolones and mutations in the quinoline resistance-determining region of the DNA gyrase A- and topoisomerase-encoding genes*. *Int J Antimicrob Agents*, 2006.
363. Greub, G., B. La Scola, and D. Raoult, *Parachlamydia acanthamoeba is endosymbiotic or lytic for Acanthamoeba polyphaga depending on the incubation temperature*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **990**: p. 628-34.

364. Schmitz-Esser, S., et al., *Diversity of bacterial endosymbionts of environmental acanthamoeba isolates*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(18): p. 5822-31.
365. Fritsche, T.R., et al., *In situ detection of novel bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(1): p. 206-12.
366. Corsaro, D., et al., *Saccamoeba lacustris, sp. nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel chlamydia 'Candidatus Metachlamydia lacustris' (Chlamydiae: Parachlamydiaceae)*. Eur J Protistol. **46**(2): p. 86-95.
367. Matsuo, J., et al., *Novel Parachlamydia acanthamoebae quantification method based on coculture with amoebae*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(20): p. 6397-404.
368. Hayashi, Y., et al., *Host range of obligate intracellular bacterium Parachlamydia acanthamoebae*. Microbiol Immunol, 2010. **54**(11): p. 707-13.
369. Michel, R., K.D. Muller, and R. Hoffmann, *Enlarged Chlamydia-like organisms as spontaneous infection of Acanthamoeba castellanii*. Parasitol Res, 2001. **87**(3): p. 248-51.
370. Gautom, R.K. and T.R. Fritsche, *Transmissibility of bacterial endosymbionts between isolates of Acanthamoeba spp.* J Eukaryot Microbiol, 1995. **42**(5): p. 452-6.
371. Griffiths, E., A.K. Petrich, and R.S. Gupta, *Conserved indels in essential proteins that are distinctive characteristics of Chlamydiales and provide novel means for their identification*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 8): p. 2647-57.
372. Kahane, S., et al., *Versatility of Simkania negevensis infection in vitro and induction of host cell inflammatory cytokine response*. J Infect, 2007. **55**(2): p. e13-21.
373. Kilvington, S. and C. Anger, *A comparison of cyst age and assay method of the efficacy of contact lens disinfectants against Acanthamoeba*. Br J Ophthalmol, 2001. **85**(3): p. 336-40.
374. Lorenzo-Morales, J., et al., *Glycogen phosphorylase in Acanthamoeba spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(3): p. 509-17.
375. Kohler, M., et al., *Acanthamoeba strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture*. Parasitol Res, 2008. **102**(5): p. 1069-72.
376. Critchley, M. and R. Bentham, *The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae*. J Appl Microbiol, 2009. **106**(3): p. 784-9.
377. Wilson, J. and A.B. Margolin, *Efficacy of glutaraldehyde disinfectant against Cryptosporidium parvum in the presence of various organic soils*. J AOAC Int, 2003. **86**(1): p. 96-100.
378. Barbee, S.L., et al., *Inactivation of Cryptosporidium parvum oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes*. Gastrointest Endosc, 1999. **49**(5): p. 605-11.
379. Best, M., et al., *Efficacies of selected disinfectants against Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(10): p. 2234-9.
380. Eterpi, M., G. McDonnell, and V. Thomas, *Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses*. J Hosp Infect, 2009. **73**(1): p. 64-70.

381. Rodriguez-Zaragoza, S., *Ecology of free-living amoebae*. Crit Rev Microbiol, 1994. **20**(3): p. 225-241.
382. Santos, L.C., et al., *Acanthamoeba spp. in urine of critically ill patients*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(7): p. 1144-1146.
383. Neff, R.J., et al., *Induction of synchronous encystation (differentiation) in Acanthamoeba spp.*, in *Methods in Cell Physiology*, D.M. Prescott, Editor. 1964, Academic Press, New York. p. 55-83.
384. Dart, J.K., V.P. Saw, and S. Kilvington, *Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009*. Am J Ophthalmol, 2009. **148**(4): p. 487-499 e2.
385. Visvesvara, G.S., H. Moura, and F.L. Schuster, *Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **50**(1): p. 1-26.
386. Greub, G. and D. Raoult, *Microorganisms resistant to free-living amoebae*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(2): p. 413-33.
387. Thomas, V., et al., *Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality*. FEMS Microbiology Reviews, 2010. **34**(3): p. 231-259.
388. Coulon, C., et al., *Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(8): p. 2689-97.
389. Koehsler, M., et al., *Acanthamoeba strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture*. Parasitol Res, 2008. **102**(5): p. 1069-72.
390. Pumidonming, W., M. Koehsler, and J. Walochnik, *Acanthamoeba strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture*. Parasitol Res, 2010. **106**(3): p. 553-9.
391. Koehsler, M., et al., *Acanthamoeba castellanii: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **299**(2): p. 121-7.
392. Buck, S.L. and R.A. Rosenthal, *A quantitative method to evaluate neutralizer toxicity against Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(9): p. 3521-6.
393. Bayer, J., et al., *Thematic workshop on fluorescence compensation settings in multicolor flow cytometry*. Cytometry B Clin Cytom, 2007. **72**(1): p. 8-13.
394. Barker, J. and M.R. Brown, *Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment*. Microbiology, 1994. **140** ( Pt 6): p. 1253-9.
395. Thomas, V. and G. McDonnell, *Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns*. Lett Appl Microbiol, 2007. **45**(4): p. 349-57.
396. Axelsson-Olsson, D., et al., *Protozoan Acanthamoeba polyphaga as a potential reservoir for Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(2): p. 987-92.
397. Beattie, T.K., et al., *Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 2992-3000.

398. Mouchtouri, V., E. Velonakis, and C. Hadjichristodoulou, *Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by Legionella species*. Am J Infect Control, 2007. **35**(9): p. 623-7.
399. Lloyd, D., et al., *Encystation in Acanthamoeba castellanii: development of biocide resistance*. J Eukaryot Microbiol, 2001. **48**(1): p. 11-6.
400. Connell, C., et al., *Encystation of Acanthamoeba castellanii: dye uptake for assessment by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy*. J Appl Microbiol, 2001. **90**(5): p. 706-12.
401. Kilvington, S., et al., *Encystment of Acanthamoeba during incubation in multipurpose contact lens disinfectant solutions and experimental formulations*. Eye & contact lens, 2008. **34**(3): p. 133-9.
402. Glaser, K.C., N.D. Hetrick, and R.E. Molestina, *Evidence for a previously unrecognized mycobacterial endosymbiont in Acanthamoeba castellanii strain Ma (ATCC (R) 50370 )*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2011. **58**(1): p. 75-6.
403. Coulon, C., et al., *Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(8): p. 2689-97.
404. Koehsler, M., et al., *Acanthamoeba castellanii : growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **299**(2): p. 121-7.
405. Horn, M., *Chlamydiae as symbionts in Eukaryotes*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 113-31.
406. Corsaro, D. and G. Greub, *Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(2): p. 283-297.
407. Goy, G., A. Croxatto, and G. Greub, *Waddlia chondrophila enters and multiplies within human macrophages*. Microbes Infect, 2008. **10**(5): p. 556-62.
408. Baud, D., L. Regan, and G. Greub, *Emerging role of Chlamydia and Chlamydia-like organisms in adverse pregnancy outcomes*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(1): p. 70-76.
409. Baud, D., et al., *Waddlia chondrophila, a potential agent of human fetal death*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(8): p. 1239-43.
410. Ruhl, S., et al., *Evidence for Parachlamydia in bovine abortion*. Vet Microbiol, 2009. **135**(1-2): p. 169-174.
411. Baud, D., et al., *Seroprevalence of different Chlamydia-like organisms in an asymptomatic population*. Clinical Microbiology and Infection, 2009: p. 2008-2010.
412. Thomas, V., et al., *Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant*. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2728-2745.
413. Hoffmann, R. and R. Michel, *Hartmannella vermiformis (Gymnamoebia) isolated from tap water harboured simultaneously two different bacterial endocytobionts*. Endocytobiosis and Cell Research, 2001. **14**: p. 103-113.
414. Verkooyen, R.P., et al., *Survival of Chlamydia pneumoniae following contact with various surfaces*. Clin Microbiol Infect, 1995. **1**(2): p. 114-118.



415. Matsuo, J., et al., *Stability of Chlamydomonas pneumoniae in a harsh environment without a requirement for acanthamoebae*. Microbiology and immunology, 2010. **54**(2): p. 63-73.
416. Haider, S., et al., *Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of chlamydiae*. Mol Microbiol, 2010. **77**(3): p. 687-700.
417. Fukumoto, T., et al., *Impact of free-living amoebae on presence of Parachlamydia acanthamoebae in the hospital environment and its survival in vitro without requirement for amoebae*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(9): p. 3360-3365.
418. Poppert, S., et al., *Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(8): p. 4081-9.
419. Lamoth, F. and G. Greub, *Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia*. FEMS Microbiology Reviews, 2010. **34**( 3): p. 260-280.
420. Hayashi, Y., et al., *Host range of obligate intracellular bacterium Parachlamydia acanthamoebae*. Microbiology and Immunology, 2010. **54**(11): p. 707-13.
421. Lewis, D.M., et al., *Microbiological and serological studies of an outbreak of "humidifier fever" in a print shop*, in *Biodeterioration Research*, G.C. Llewellyn and C.E. O'Rear, Editors. 1990, Plenum Press: New York, USA. p. 467-477.
422. Michel, R., et al., *Acanthamoeba from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite*. European Journal of Protistology, 1994. **30**: p. 104-110.
423. Anand, C.M., et al., *Interaction of L. pneumophila and a free living amoeba (Acanthamoeba palestinensis)*. J Hyg (Lond), 1983. **91**(2): p. 167-78.
424. Iovieno, A., et al., *Detection of bacterial endosymbionts in clinical Acanthamoeba isolates*. Ophthalmology, 2010. **117**(3): p. 445-52.
425. Wirz, M., et al., *Predator or prey? Chlamydomonas abortus infections of a free-living amoebae, Acanthamoeba castellanii 9GU*. Microbes Infect, 2008. **10**(6): p. 591-7.
426. Kahane, S., et al., *Evidence for the presence of Simkania negevensis in drinking water and in reclaimed wastewater in Israel*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(6): p. 3346-51.
427. Dupuy, M., et al., *Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba*. Water Research, 2011. **45**(3): p. 1087-94.
428. Shumaker, J.B., et al., *Naegleria gruberi: isolation from nasal swab of a healthy individual*. Lancet, 1971. **2**(7724): p. 602-3.
429. Dvorak, R. and V. Skocil, *[Amoeba of the Limax group in the nasal mucous membrane]*. Cesk Otolaryngol, 1972. **21**(6): p. 279-84.
430. Simitzis, A.M., F. Le Goff, and M.T. L'Azou, *[Isolation of free-living amoebae from the nasal mucosa of man. Potential risk (author's transl)]*. Ann Parasitol Hum Comp, 1979. **54**(2): p. 121-7.
431. Molet, B., et al., *[Isolation of free-living amoebae from nasal swabs in 300 healthy persons (author's transl)]*. Rev Otoneuroophthalmol, 1981. **53**(2): p. 121-6.
432. Michel, R., R. Rohl, and H. Schneider, *[Isolation of free-living amoebae from nasal mucosa of healthy individuals]*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B, 1982. **176**(2-3): p. 155-9.

433. Mogoia, E., et al., *Acanthamoeba castellanii*: Cellular changes induced by chlorination. *Experimental Parasitology*, 2010. **126**(1): p. 97-102.
434. Kilvington, *Activity of water biocide chemicals and contact lens disinfectants on pathogenic free-living amoebae*. international biodeterioration, 1990.
435. Lonnen, J., et al., *Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water*. *Water Research*, 2005. **39**(5): p. 877-83.
436. Heaselgrave, W., et al., *Solar disinfection of poliovirus and Acanthamoeba polyphaga cysts in water - a laboratory study using simulated sunlight*. *Lett Appl Microbiol*, 2006. **43**(2): p. 125-30.