

Université de Montréal

Amibes à potentiel pathogène dans les unités dentaires

par

Sabrina Gravel

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Microbiologie et Immunologie

Mai 2009

© Sabrina Gravel, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Amibes à potentiel pathogènes dans les unités dentaires

présenté par :
Sabrina Gravel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

George Szatmari, président-rapporteur
Jean Barbeau, directeur de recherche
Marc C. Lavoie, membre du jury

RESUME

Il a été bien documenté que les différentes canalisations des unités de soins dentaires contiennent un épais biofilm. Ce biofilm est constitué entre autres de bactéries, mais aussi d'amibes. Certaines amibes ont un potentiel pathogène et peuvent causer des infections graves. Deux cas d'infections amibiennes et possiblement reliées aux unités dentaires ont retenu notre attention et sont à l'origine du présent projet. L'identification morphologique des amibes afin de déterminer si elles présentent un potentiel pathogène ou non est une tâche ardue, même pour les protozoologistes chevronnés. Nous avons donc utilisé la réaction de polymérase en chaîne (PCR) pour identifier les amibes. Des nouvelles amorces ont été élaborées pour détecter les amibes des genres *Acanthamoeba* ainsi que *Naegleria*. Des échantillons d'eau et de terre ont été prélevés dans l'environnement, et des échantillons d'eau et de biofilm ont été prélevés dans les unités dentaires. Une partie de chaque échantillon a été mise en culture selon une méthode améliorée pour une identification morphologique, et l'autre partie a été soumise à un PCR direct. Des *Acanthamoebae* et/ou des *Naegleriae* ont été détectées dans 100% des échantillons, mais les espèces varient d'un échantillon à l'autre. Des amibes à potentiel pathogènes sont détectables dans les unités dentaires ainsi que dans l'environnement, et celles-ci pourraient représenter un risque pour la santé de certains individus.

Mors clés : Amibe, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, Unités dentaires, PCR, Biofilm.

ABSTRACT

It has been well documented that the various tubing of a dental unit are covered with a thick biofilm. This biofilm mostly consists of bacteria, but amoebae can be found within the biofilm as well. Some amoebae are potential pathogens and may cause serious infections. Two cases of amoebic infections that were possibly linked with dental units drew our attention and stimulated our researches. Morphologic identification of amoebae in order to determine their possible pathogenicity requires much expertise, and is even difficult for proficient protozoologists. Therefore, the use of PCR is essential to detect potentially pathogenic amoebae with subjectivity. We elaborated new primers for the detection of *Acanthamoeba* spp. and *Naegleria* spp. Samples of water and dirt were taken in the environment, and samples of water and biofilm were taken in dental units. A part of each samples was cultivated for morphological identification, when a second part was utilized for PCR identification. *Acanthamoebae* and/or *Naegleriae* were detected in 100% of our samples, but the species varied from one sample to another. Potentially pathogenic amoebae were detected in dental units and in the environment, which could represent a health risk for some individuals.

Key words: Amoeba, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, Dental Unit, PCR, Biofilm.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Remerciements	vii
Remerciements	vii
Dédicace	viii
CHAPITRE 1	1
Introduction	1
1.1. Cas cliniques d'infections amibiennes au Québec	4
1.2. Unités dentaires et biofilm	8
1.3. Amibes – Réservoir et genres importants	12
1.3.1. Amibes dans l'environnement	13
1.3.2. Amibes dans les unités dentaires.....	15
1.3.3. Amibes et endosymbiotes	17
1.3.4. Amibes à potentiel pathogène et pathologies associées	19
1.3.4.1. <i>Acanthamoeba</i> spp.	19
1.3.4.1.1. Kératite	22
1.3.4.1.2. Encéphalite granulomateuse amibienne	25
1.3.4.1.3. Amibiase cutanée	28
1.3.4.1.4. Facteurs de virulence	29
1.3.4.2. <i>Naegleria</i> spp.....	32
1.3.4.2.1. Méningoencéphalite amibienne primitive	35
1.3.4.2.2. Facteurs de virulence	38
1.3.4.3. Autres genres et espèces amphizoïques	40
1.4. Identification des amibes	42
1.4.1. Méthodes de culture	42
1.4.2. Morphologie.....	44
1.4.3. Identification par réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	49

CHAPITRE 2.....	51
2.1 Buts et hypothèses	51
CHAPITRE 3.....	52
3.1 Article manuscrit.....	52
3.2 PCR Detection of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae in Dental Units	53
CHAPITRE 4.....	75
Discussion	75
RÉFÉRENCES	81
ANNEXE I.....	I
Méthodes non publiées	II
Résultats non publiés	V
ANNEXE II.....	VIII
ANNEXE III.....	X
ANNEXE IV	XIV
ANNEXE V	XVIII
1- 4th ASM international meeting on Biofilms, Marsh 2007	XVIII
2- 34è congrès de l'ACFAS, Mai 2007	XX
3- 36è congrès de l'ACFAS, Mai 2009	XXI
4- 109th ASM international meeting Mai 2009	XXII
ANNEXE VI	XXIV

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Detection of <i>Acanthamoeba</i> sp. and <i>Naegleria</i> sp. in water, suction and filter samples by PCR.....	65
Tableau 2 PCR results for detection of <i>Acanthamoeba</i> (A) sp. and <i>Naegleria</i> (N) sp., and genotypes of <i>Acanthamoebae</i> (in brackets), for primary and secondary samples	67
Tableau 3 Échantillons du Québec.....	IV
Tableau 4 Échantillons environnementaux suspectés pour certains genres d'amibes.....	V

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Unité dentaire	8
Figure 2 Section longitudinale de la canalisation d'eau d'une pièce à main .	10
Figure 3 Amibes associées au biofilm	13
Figure 4 Acanthamibes et biofilm.....	14
Figure 5 Biofilm d'une canalisation d'eau d'unité dentaire	16
Figure 6 <i>Acanthamoeba</i> avec endosymbiotes bactériens	18
Figure 7 <i>Acanthamoeba Castellanii</i> ATCC 30898	20
Figure 8 Oeil infecté avec <i>Acanthamoeba</i>	23
Figure 9 Section coronale des hémisphères cérébraux - EGA	26
Figure 10 Microscopies électroniques représentatives d' <i>Acanthamoeba</i> pathogène et non-pathogène	30
Figure 11 Trophozoïte de <i>Naegleria fowleri</i> carter ATCC 30174	33
Figure 12 Amibes sur pétri avec <i>E. coli</i> tué par la chaleur.....	43
Figure 13 <i>Naegleria fowleri</i>	45
Figure 14 Acanthamibe et kystes du groupe III et du génotype T4.....	47
Figure 15 Typical dental unit.....	58
Figure 16 Trophozoïte and cyst	64
Figure 17 Gel electrophoresis of <i>Acanthamoeba Castellanii</i>	65
Figure 18 PCR de sensibilité et spécificité pour les amorces ACA et NAE....	VI
Figure 19 <i>Acanthamoeba castellanii</i> en MEB	VII

REMERCIEMENTS

Au cours de ma maîtrise j'ai eu l'occasion de rencontrer beaucoup de personnes qui m'ont grandement aidée. Que ce soit en me donnant des conseils ou en me fournissant des échantillons, tous les gens que j'ai croisés devraient être remerciés. Premièrement, un énorme merci à mon directeur de maîtrise Dr. Jean Barbeau, de m'avoir offert un si beau projet qui m'a amené des connaissances et une passion qui me resteront pour toujours. Merci aux indispensables Annie et Jacynthe, sans qui de multiples montagnes auraient été beaucoup plus difficiles à gravir. À J-F et Dan pour le support moral ô combien apprécié et souvent nécessaire. Aux « gars » du labo de Dr. Stéphane Roy et à Stéphane Roy lui-même pour tout le temps consacré à m'expliquer les méandres de la biologie moléculaire. À toutes les personnes qui ont touché de près ou de loin à mon projet : Pr. Marc C. Lavoie pour son omniprésence en tant que conseiller tout au long de ma maîtrise, Ulysse de la clinique, tous les dentistes chez qui j'ai fait des prélèvements, Michel Boily pour les contacts, Hydro-Québec, Alcan, la ville de Trois-Rivières, Sylvia Francis-Zalzal, Hugues Charest et Louise Trudel de l'INSPQ, André Bérard, ... Les points de suspension sont pour les personnes dont j'oublie le nom, mais je n'oublie certainement pas leur aide. Les derniers mais non les moindres : ma famille collée-serrée, mon amour doux et mes amis abondants, mais ceux-ci savent déjà que je les remercie.

Merci à tous et à toutes.

Amoeba by John Hegley (83)

*hello amoeba I wish you were my pet
but you're not really big enough to be seen by the vet
are you?
you're a little blob of jelly
you've got no skin and bone
you're not a boy you're not a girl
and you're not on the telephone
I cannot get in touch with you
I cannot pull your leg
you look a bit like a fried egg
you're a long way down the ladder
that evolution trod
but you can eat with your feet
or to be more discreet
obtain food with your pseudopod
and you don't have to have a partner
to start a family
you can multiply by dividing
[...]
you're not so simple
you little protoplasmic pimple*

*À tous ceux qui ont embarqué dans ma bulle :
Papa, Maman, Serge,
mes amis et mes amours...*

CHAPITRE 1

Introduction

Les amibes libres sont des protozoaires non pathogènes, comparativement aux amibes parasitaires qui nécessitent un hôte pour croître. Cependant, des infections dues aux amibes libres ont été rapportées mondialement dans la littérature car certaines amibes libres se comportent comme pathogène opportuniste (4, 26-28, 30, 46, 86, 102, 108). Bien que très peu ont été cités au Canada, deux cas singuliers de kératite et de méningoencéphalite amibiennes à avoir été rapportés au Québec ont retenu notre attention car ils sont tous deux reliés à l'utilisation d'unités de traitement dentaires. Il a déjà été démontré que la présence de biofilm dans les canalisations des unités dentaires favorise la croissance des amibes (11, 124, 126), mais jusqu'à maintenant l'identification de ces amibes n'a été basée que sur des critères morphologiques. Il est maintenant possible de déterminer par réaction de polymérase en chaîne (PCR) la présence des certaines amibes à potentiel pathogène, et donc de déterminer si les amibes retrouvées dans les unités dentaires représentent un risque infectieux.

Les infections à amibes libres sont de rares événements, mais selon l'amibe en cause et le foyer d'infection les personnes atteintes ont des séquelles permanentes ou encore y succombent. On note la kératite et la méningoencéphalite granulomateuse, toutes deux causées par *Acanthamoeba* sp., et la méningoencéphalite amibienne primitive à *Naegleria fowleri* (204-206). Le diagnostique de ces maladies est souvent fait trop tard et le traitement s'avère inefficace dans beaucoup de cas. Il est donc important d'identifier les réservoirs potentiels d'amibes pathogènes afin de diminuer les risques d'éclosion de ces infections.

Dans la littérature, nous n'avons retracé qu'une seule étude sur les amibes dans l'environnement au Canada (175). En 1969, T. Scholten a isolé du sol en Ontario des amibes des genres *Hartmanella*, *Acanthamoeba* et *Naegleria* sp. dont certaines avaient une température de croissance de 37°C. L'auteur relate un cas clinique d'infection amibienne disséminée chez une femme au Québec ayant eu lieu en 1954, mais il est impossible d'obtenir plus d'informations. En 2009 une étude a été publiée par P. McAllum *et al.* sur la tendance des cas de kératites à Acanthamibes en Ontario (133). Son équipe a démontré qu'il y a non seulement une évolution saisonnière des cas mais aussi une augmentation du nombre cas par année, de 1999 à 2006. Ainsi, il y a plus de kératites amibiennes l'été et l'automne que l'hiver, et plus le port de lentilles cornéennes est populaire, plus le nombre d'infections par année augmente. Le Center for Disease Control (CDC) à Atlanta, É.-U. a noté une augmentation des cas de kératites, mais pas particulièrement des

méningoencéphalites primitives au cours des dernières années aux Etats-Unis (34, 35, 108). Parce que ces deux maladies sont très rares et présentent des signes cliniques relativement commun, elles génèrent peu de suspicion chez les professionnels de la santé.

1.1. Cas cliniques d'infections amibiennes au Québec

Cas #1 (1, 9)

En 1994, une patiente se présente dans une clinique dentaire de la région de Montréal pour le remplacement d'un pont. Lors de l'intervention, la turbine à haute vitesse est actionnée par inadvertance alors que celle-ci est à proximité du visage de la patiente. Un jet d'eau est projeté directement dans son œil droit. Sur le moment, la patiente est surprise, sans plus.

Au retour à la maison, elle commence à ressentir un inconfort au niveau de l'œil droit, malaise qui se transforme graduellement en douleur réelle au bout de quelques heures. L'œil présente des rougeurs et, au cours de la nuit, la douleur devient de plus en plus insupportable. La patiente doit donc consulter un ophtalmologiste qui lui prescrit des corticostéroïdes et de la gentamycine pour une conjonctivite aiguë. Deux jours plus tard, la douleur intense revient et une seconde consultation chez l'ophtalmologiste révèle trois abrasions sur la cornée, ainsi qu'un ulcère traumatique. Un traitement par occlusion est prescrit pendant 7 jours. Pendant les quelques jours suivant le retrait de l'occlusion, l'état de la cornée s'aggrave, si bien qu'on échantillonne les sécrétions oculaires afin d'identifier par culture le ou les microorganismes en cause. Plus de 57 jours après l'événement chez le dentiste, une amibe du genre *Acanthamoeba* est identifiée. Même si la

guérison est observée, la patiente a, 4 ans plus tard, encore des douleurs, une photophobie, une vision trouble, et son acuité visuelle est grandement diminuée. Une poursuite judiciaire est intentée contre la clinique dentaire, mais, même si le lien entre l'événement et l'infection est plausible, il est difficile, voir impossible à prouver. D'autant plus que la patiente portait habituellement des verres de contact, bien qu'elle ne les avait pas le jour de la consultation chez le dentiste. L'utilisation de verres de contact est reconnu comme étant le principal facteur de risque pour les kératites amibiennes (9).

Cas #2 (8)

Le 30 mai 2003, une dame de la région de Montréal âgée de 43 ans consulte son dentiste pour un traitement. L'intervention était un traitement de routine mais lors du nettoyage par l'hygiéniste dentaire, une des couronnes de la patiente est aspirée par l'appareil de succion. Le dentiste récupère la couronne dans le panier permettant de filtrer les débris d'origine buccale à l'extrémité distale de l'appareil de succion et la remet en bouche après l'avoir désinfectée.

Dans les jours qui suivent, la patiente éprouve plusieurs symptômes tels que des maux de têtes, de fortes migraines, des nausées, une vision trouble et autres malaises qui l'incitent à consulter un médecin. Plusieurs tests sont effectués et montrent une lésion frontale et médullaire très intense sans confirmation de la nature du trouble. Le 13 juin une biopsie suivie d'un examen histopathologique des tissus prélevés révèlent finalement une méningo-encéphalite amibienne primitive (MAP). Le pathologiste pense avoir vu des amibes, et la lame est envoyée au Center for Disease Control à Atlanta (É.-U.), mais les résultats en immunohistochimie n'ont pas permis d'identifier l'amibe en cause. La patiente suit une antibiothérapie pendant plus d'un mois et survit à l'infection, cependant elle demeure avec de lourdes séquelles neurologiques. On ne rapporte pas d'événements de baignade dans les jours qui ont précédé la maladie, ce qui laisse planer le doute sur l'épisode chez le dentiste. La vaste majorité des cas de MAP sont reliés à

des baignade dans des eaux contaminées par *N. fowleri* (30, 35, 78) Une poursuite en justice a été intentée, mais le lien cause à effet ne peut être démontré avec évidence et la poursuite est abandonnée.

1.2. Unités dentaires et biofilm

Les unités dentaires sont constituées d'un réseau de tubulures permettant d'acheminer l'eau et l'air aux pièces-à-main (turbines, détartreur ultrasonique et pistolet air/eau) (figure 1 A), ou d'aspirer les liquides à l'aide d'appareils de succion (pompe à salive et succion rapide) (figure 1 B). La partie distale de l'appareil de succion est reliée à un filtre à un filtre lâche qui permet de filtrer les gros débris (figure 1 C) . Ces canalisations sont donc constamment en contact avec l'eau, qui provient généralement du réseau d'aqueduc municipal.



Figure 1 Unité dentaire

A : canalisations d'eau et pièces à main ; B : appareils de succion et canalisations ; C : filtre des appareils de succion. (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

Une accumulation importante de biofilm dans les canalisations d'eau des unités dentaires a été amplement documentée (61, 71, 193). La source

du problème est en partie la stagnation de l'eau dans les canalisations lors des périodes d'inutilisation des appareils, comme la nuit et les weekends. Cette condition favorise grandement la prolifération bactérienne et l'établissement d'un biofilm sur les parois internes des canalisations (figure 2). De plus, le biofilm n'est pas soumis à des forces de cisaillement suffisantes pour l'expulser. Comme les canalisations d'eau ont un très petit diamètre (2 mm), l'eau, dû à l'écoulement laminaire, est virtuellement stagnante sur les parois, et en mouvement plus rapide au centre. Ces conditions font qu'en seulement 180 jours, toute la surface interne d'une canalisation d'unité dentaire se recouvre d'un épais biofilm (63). Les bactéries se détachent du biofilm et emplissent la colonne d'eau en grande quantité. Les comptes bactériens dans l'eau des unités dentaires varie de $1,5 \times 10^2$ à $1,6 \times 10^8$ UFC/100ml alors que la norme pour l'eau potable est de < 500 UFC/100ml (196).

Le biofilm retrouvé dans les canalisations d'eau des unités dentaire est constitué d'une grande variété de bactéries. Pour la plupart, ce sont des bactéries non pathogènes comme *Caulobacter* spp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Methylobacterium mesophilicum* ou encore *Moraxella* spp.. Cependant, certaines bactéries pathogènes ou opportunistes sont également retrouvées : *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp. et *Staphylococcus* spp. (14, 138, 151, 185, 196, 209). La majorité de ces bactéries sont des bacilles à Gram-négatif, ce qui entraîne la libération dans l'eau d'endotoxines

(lipopolysaccharide dégagé de la paroi des bactéries mortes) à des quantités détectables et peut-être suffisantes pour déclencher une réaction inflammatoire. Les quantités d'endotoxines libres dans l'eau des unités dentaires peut atteindre de 500 à 2560 unités par millilitre, alors que l'eau du robinet contient une moyenne de 66 unités d'endotoxines par millilitre (42, 67, 89, 151, 165). La présence des bactéries dans l'eau des unités dentaires peut représenter un risque pour la santé des patients mais aussi pour le personnel. En effet, l'eau peut servir à irriguer une plaie lors d'une chirurgie, mais peut aussi être aérosolisée par l'action des turbines, du détartreur ultrasonique et du pistolet air/eau. Les bioaérosols microscopiques (de 0,65 à 5 μm de diamètre) peuvent alors être inhalés ou projetés dans la gorge (67, 68, 151, 195).

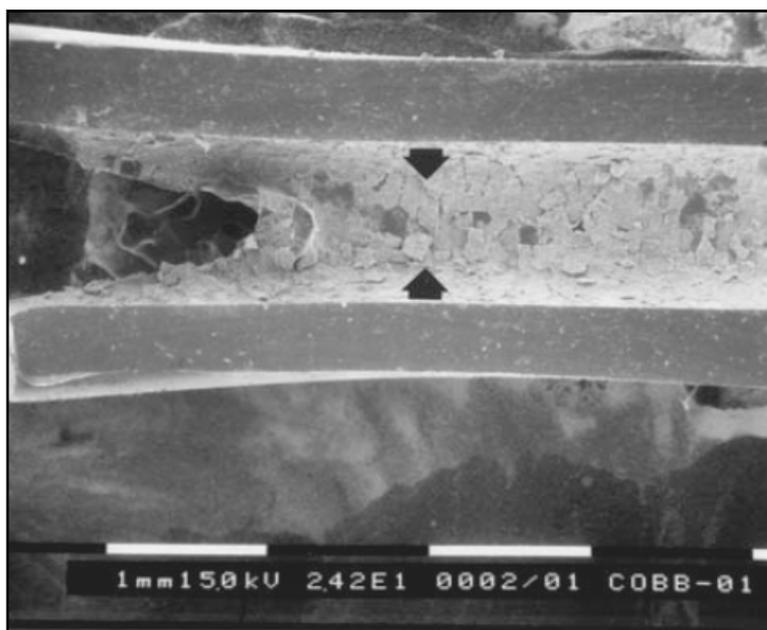


Figure 2 Section longitudinale de la canalisation d'eau d'une pièce à main

Les flèches montrent les couches confluentes de biofilm à l'intérieur des parois du tube. (barre = 1mm, 24.2X) (40)

Les bactéries retrouvées dans les biofilms des appareils de succion diffèrent légèrement de celles des canalisations d'eau. En effet, dans les canalisations d'eau les bactéries sont principalement des bacilles gram-négatifs, alors que dans les suctions on retrouve également des cocci et des bacilles gram-positif, dont 65% des isolats sont β -hémolytiques. Le biofilm des suctions est également constitué de cellules eucaryotes, de collagène et de fibrine, présumément issus de la cavité orale des patients.

La présence de biofilm bactérien dans les canalisations des unités dentaires entraîne la colonisation par des protozoaires, puisque ceux-ci nourrissent principalement de bactéries. On a principalement noté des amibes des genres *Hartmanella* sp., *Acanthamoeba* sp. et *Vanella* sp. (13, 14, 136, 138, 196). D'autres eucaryotes comme les moisissures et levures ont été aussi rapportés, mais l'occurrence de ces microorganismes est moins fréquente (192, 194, 196).

Dans la littérature, il y a peu de cas d'infections post-opératoires reliées à la contamination de l'eau des unités dentaires, et le risque est considéré comme étant relativement faible (7, 144, 150, 165). Toutefois, dû au contexte de l'utilisation de cette eau, les associations dentaires à travers le monde ont publié des recommandations pour abaisser les comptes bactériens (40, 151). L'atteinte des standards de l'eau potable, bien qu'elle soit une cible souhaitée, est difficile à atteindre sans désinfecter les tubulures (14, 40, 151).

1.3. Amibes – Réservoir et genres importants

Les amibes libres sont des protozoaires ubiquitaires dans l'environnement. Elles résistent à une grande variété de conditions, allant de la sécheresse à l'osmolarité élevée, en passant par des températures très chaudes ou très froides (28, 43, 65, 182, 190). Dû à leur grande résistance à des conditions adverses on les retrouve dans plusieurs milieux anthropogéniques. Certaines amibes libres non pathogènes et capables de compléter leur cycle de vie sans hôte, sont définies comme amphizoïques, c'est-à-dire qu'elles peuvent également vivre dans les tissus humains et animaux (124, 179, 205). Parmi les amibes amphizoïques, nous sommes intéressés par *Acanthamoeba* spp. et *Naegleria fowleri*.

1.3.1. Amibes dans l'environnement

Les amibes se retrouvent majoritairement dans des milieux riches en procaryotes tels que le sol et les milieux aquatiques (170). Toutes les amibes testées à cet effet sont incapables de se nourrir lorsqu'elles sont en suspension, même si celles-ci présentent une morphologie flottante ou flagellée. Elles sont dépendantes des surfaces, c'est pourquoi sous forme végétative elles se retrouvent surtout associées aux biofilms (figures 3 et 4) (90, 152, 156, 159, 160, 171). D'ailleurs, la cause majeure de mortalité bactérienne dans les biofilms de l'environnement est le ravage causé par les protozoaires (183). Lorsqu'elles sont enkystées, les amibes peuvent voyager dans l'air, notamment pendant la saison de l'Harmattan en Afrique (109, 112-114).

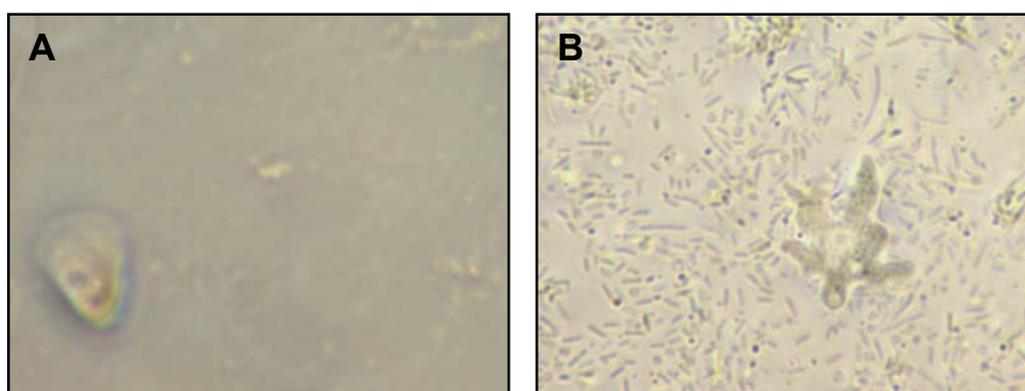


Figure 3 Amibes associées au biofilm

A : Amibe *Vanella* sp. sur un biofilm flottant ; B : Amibe de genre inconnu, sur un biofilm attaché. (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

Acanthamoeba castellanii a été isolée des réseaux d'aqueducs, des piscines publiques, dans des bouteilles d'eau potable, dans des conduites de ventilation, sur la plage, dans l'air et même dans le sol et l'eau de régions en Antarctique (28, 101, 118, 123, 127, 205). *Naegleria fowleri* peuple principalement les lacs artificiels et naturels, les eaux de refroidissement des usines ou les sources géothermales. Jusqu'à maintenant, la seule région où l'on a isolé ce protozoaire dans les réseaux d'aqueducs municipaux est l'Australie du sud, parce que l'eau y voyage dans des pipelines qui traversent le désert et sa température peut atteindre 45°C (30, 47, 53, 54, 78, 127, 162, 177).



Figure 4 Acanthamibes et biofilm

Acanthamibes pénétrant le biofilm bactérien. K : Kyste
Microscopie optique (1000X) (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

1.3.2. Amibes dans les unités dentaires

Comme mentionné précédemment, la présence de biofilm dans les unités dentaires favorise grandement la croissance des amibes naturellement retrouvées dans l'eau. Les amibes les plus fréquentes sont *Hartmannella* spp. et *Vanella* spp., autant dans les unités dentaires que dans l'eau potable (13, 136, 138, 197, 198). Ces amibes n'ont cependant jamais été associées directement à des pathologies. Par contre, *Naegleria* spp. et *Acanthamoeba* spp. ont aussi été identifiées, et leur potentiel pathogène peut représenter un risque infectieux (13, 70, 127, 136, 138, 197, 198). Dans les 3 articles traitant des amibes dans les unités dentaires, 100% des échantillons analysés contenaient des amibes, toutes espèces confondues (13, 136, 138). Des photos de biofilm provenant de tubulures d'unités dentaires, prises en microscopie électronique à transmission, ont montré que les amibes pouvaient se retrouver à la surface du biofilm sous forme de trophozoïte, ou encore enkystés et enchâssés dans la matrice d'EPS (figure 5) (11, 14).

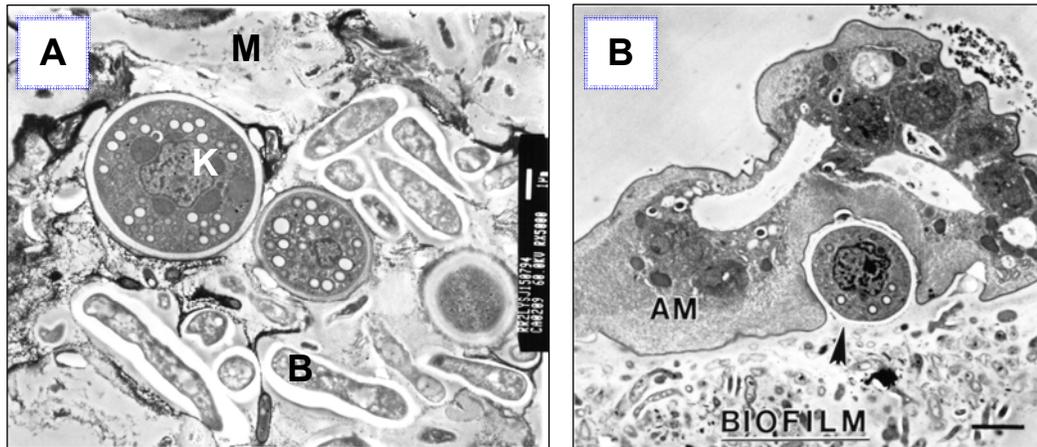


Figure 5 Biofilm d'une canalisation d'eau d'unité dentaire

A : K : kyste d'amibe ; B : bactérie ; M : matrice d'EPS (MET, 5000X) B : Amibe (AM) et kyste (flèche) dans une matrice de biofilm (biofilm) (TEM, rés. inconnue) (11)

Dans l'eau potable du robinet les concentrations totales d'amibes sont de 1,1 par ml, alors qu'elles atteignent en moyenne 83,2 par ml d'eau dans les unités dentaires. En drainant les canalisations d'eau pendant deux minutes comme il est recommandé par l'Association Dentaire Canadienne, les comptes en amibes baissent à 19,7 par ml. Le drainage peut donc diminuer le nombre d'amibes présentes dans l'eau, mais l'eau ne rencontre tout de même pas les standards de l'eau potable (9, 10, 13).

1.3.3. Amibes et endosymbiotes

Bien que la majorité des amibes dans les unités dentaires appartiennent à des espèces non pathogènes, leur présence en grand nombre peut poser un problème. Il a été bien documenté que des amibes de plusieurs espèces portent des bactéries endosymbiotes (figure 6) (77, 173). Parmi ces endosymbiotes, nous comptons *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogenes*, toutes étant des bactéries pathogènes ou opportunistes (45, 122, 189). Certaines amibes véhiculent aussi des bactéries qui sont souvent non identifiées ou non cultivables (84, 137, 210). Les bactéries intracellulaires peuvent faire éclater l'amibe (*Legionella* et *Listeria*), y demeurer sans se multiplier (certains coliformes et mycobactéries), ou encore se multiplier tout en résidant dans l'amibe (*Vibrio cholerae*) (20, 219). Les amibes peuvent aussi éjecter des vésicules contenant des bactéries viables, contribuant à la survie de ces dernières dans les milieux aquatiques (18, 26, 74).

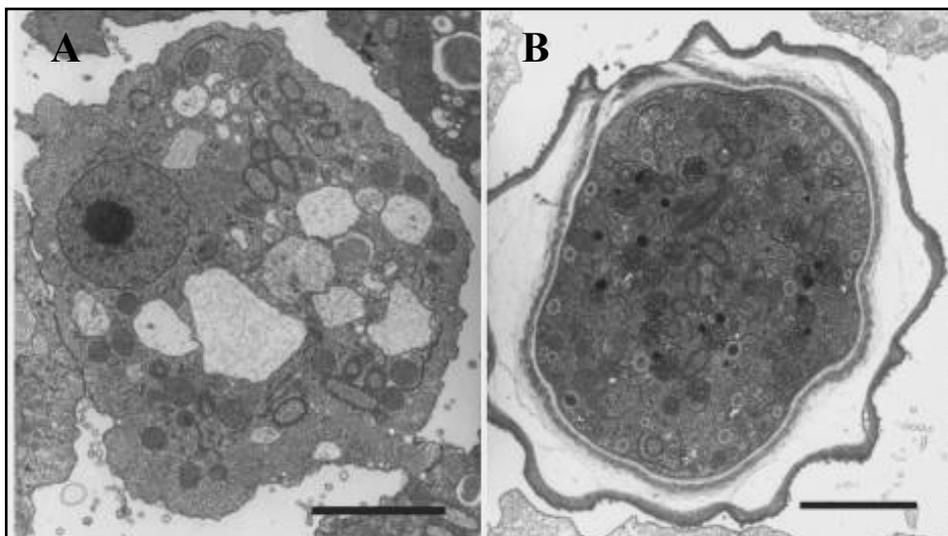


Figure 6 *Acanthamoeba* avec endosymbiotes bactériens

A : Des bacilles sont distribués dans le cytoplasme du trophozoïte ; B : Un kyste comprenant des endosymbiotes (Barre = 2 µm) (219)

Les amibes, grâce à leurs kystes, jouent un grand rôle dans la résistance des bactéries, en les protégeant des désinfectants et de la dessiccation. Par exemple, l'échec de traitements chocs de chloration pour éradiquer *Legionella pneumophila*, à l'origine d'éclosions de légionellose dans des systèmes de distribution d'eau ou dans divers environnements aquatiques, a été attribué à la protection par les amibes (26, 74, 91).

1.3.4. Amibes à potentiel pathogène et pathologies associées

1.3.4.1. *Acanthamoeba* spp.

La première acanthamibe à être isolée en 1913 par Puschkarew provenait d'un échantillon de terre et a été nommé *Amoeba polyphageus* (163). Cette amibe a été renommée *Acanthamoeba polyphaga* par Page en 1967 (147). Le genre *Acanthamoeba* est ubiquitaire dans l'eau et la terre, compte maintenant plus de 24 espèces différentes, est séparés en trois morphotypes kystiques et chaque espèce peut comporter un ou plusieurs génotypes de T1 à T15 (101, 104, 123, 164, 179, 205). La plupart des amibes pathogènes appartiennent au morphotype II et au génotype T4 (101, 211). Pour certaines kératites on a toutefois identifié des génotypes T2, T6 et T11, et dans des cas de méningoencéphalite granulomateuse (MEG) on a retrouvé des T1, T5, T10 et T12 (15, 37, 101, 134).

Les acanthamibes (figure 7) ont une préférence pour les bactéries à gram-négatif, et plus spécifiquement pour *E. coli* (156, 157). Elles les phagocytent à l'aide de leur longs prolongements cytoplasmiques : les acanthopodes (101, 102, 123, 139, 160). Il semble toutefois que les Pseudomonades aient une résistance à la phagocytose par les acanthamibes et il a été démontré que *P. aeruginosa* peut même tuer *Acanthamoeba* grâce à son TTSS (type III secretion system) (2, 131).

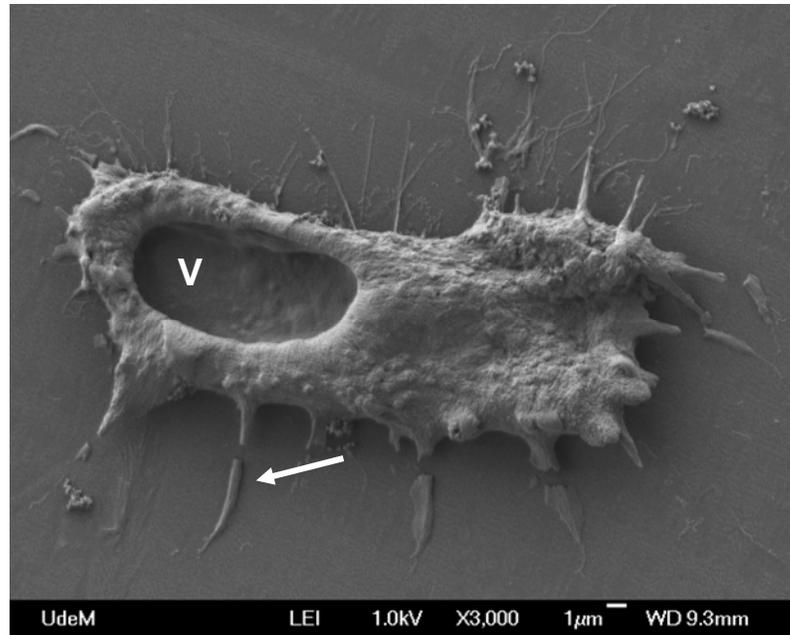


Figure 7 *Acanthamoeba Castellanii* ATCC 30898

Acanthopode (flèche) vacuole contractile affaissée (V) (MEB, 3000X) (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

La température de croissance des acanthamibes est d'au maximum 37°C avec une température optimale de 30°C. L'osmolarité idéale pour une croissance exponentielle de *Acanthamoeba* se situe entre 50 et 80 mOsmol. En deçà ou au-delà de ces valeurs, *Acanthamoeba* a tendance à s'enkyster (101, 123). Les kystes de *Acanthamoeba* comprennent une double paroi composée de protéines et de cellulose, ce qui les rend excessivement résistants aux variations de pH, à la dessiccation, aux agents antimicrobiens et à la congélation (4, 87, 117, 190). Des kystes de différentes espèces de *Acanthamoeba* ont été retrouvés complètement séchés sur de vieux pétris après 20 ans dans un réfrigérateur, et se sont avérés viables (4).

La division d'*Acanthamoeba* spp. se fait de façon asexuée, soit par fission binaire. Le nombre de chromosomes et la ploïdie que comprend *Acanthamoeba* spp. sont inconnus, mais son génome est évalué à environ 10^9 paires de bases. Ces données varient parce que comme le nombre de copies du génome est incertain, le contenu en ADN, qui se situe entre 1 et 5 pg, ne peut donner de réelle indication sur le nombre de paires de bases (29, 44). Les séquences codant pour l'ARNr sont arrangées 5' – 18S – 5.8S – 28S – 3', comme chez tout eucaryote. Le gène de l'ARNr 18S comprend 2,303 paires de bases, est séquencé complètement et constitue le meilleur moyen de différencier les différentes espèces de *Acanthamoeba* (22, 29, 191).

1.3.4.1.1. Kératite

La kératite amibienne (KA) est une infection aiguë de la cornée, causée par une acanthamibe, et peut survenir après un trauma ou chez un porteur de lentilles cornéennes (figure 8). Les premiers symptômes peuvent prendre quelques jours ou quelques semaines à apparaître, dépendant de l'inoculum de départ (101). L'infection est caractérisée par une production excessive de larmes, une photophobie, de l'inflammation, de la rougeur, une infiltration stromale, un œdème et une opacité stromale. Le tout s'accompagne d'une douleur intense due à une neurite radiale et à la formation d'un abcès, ce qui menace la vision de l'œil atteint (101). Le diagnostic clinique se fait par culture d'un échantillon de cornée, par observation directe en microscopie, ou moins communément par PCR (199, 220). L'observation requiert une familiarité particulière avec la morphologie amibienne par l'ophtalmologiste, sinon des méthodes plus objectives comme le PCR ou l'ELISA doivent être utilisées. Le traitement de la KA est difficile, car les kystes peuvent demeurer longtemps après la fin de l'antibiothérapie, et il n'est pas rare que la seule solution soit une transplantation de la cornée (98). Comme les amibes peuvent s'enkyster et résider profondément dans le stroma, il arrive parfois que l'infection revienne après une greffe de cornée (39, 155). Le diagnostic doit se faire très tôt et une rigoureuse antibiothérapie doit être appliquée pour augmenter les chances de guérison (101, 205).

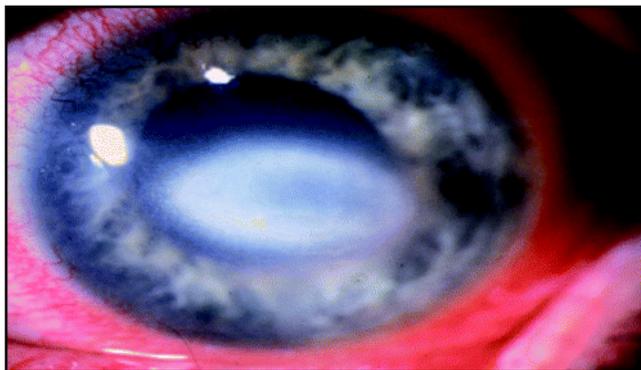


Figure 8 Oeil infecté avec *Acanthamoeba*
Épithélium ulcéré et infiltration stromale créant une opacité(101) .

La kératite amibienne est sans doute la plus fréquente, quoique rare, des infections à amibes amphizoïques. On compte un peu plus de 3000 cas rapportés mondialement, dont environ 80% sont survenus chez des personnes portant des verres de contact (19, 62, 69, 218). Seulement en 2007, les Etats-Unis ont connu leur plus grande quantité de kératites amibiennes, soit 138 réparties dans 35 états (34). Chez les porteurs de lentilles cornéennes le problème est amplifié par les mauvais nettoyages et entretiens des lentilles et étuis. L'incidence des kératites à acanthamibes est estimée à environ 2 cas par million de porteurs de verres de contact aux États-Unis (6, 95). Un biofilm bactérien peut se former dans le fond des étuis à verres de contact mal entretenus, créant un milieu de prolifération idéal pour *Acanthamoeba*, présente dans n'importe quelle source d'eau domestique. De plus, le port prolongé de verres de contact peut engendrer des micro-abrasions à la surface de la cornée, ce qui constitue une porte d'entrée parfaite pour l'amibe (6, 25, 145, 154, 221). Le contact avec l'acanthamibe peut se faire aussi via la poussière ou l'eau, chez quelqu'un

ayant une lésion préalable sur la cornée. Ceci constitue environ 20% des cas, et on compte parmi ceux-ci des infections suivant une inondation, dû à un fragment de glace, de la baignade ou encore suite à une éclaboussure d'eau d'unité dentaire (9, 98, 135, 205).

1.3.4.1.2. Encéphalite granulomateuse amibienne

On appelle encéphalite granulomateuse amibienne (EGA) l'infection causée par *Acanthamoeba* spp. qui occasionne une inflammation granulomateuse du parenchyme. Plus précisément, après leur entrée dans le sang, les trophozoïtes se retrouvent en périphérie des parois des petits et moyens vaisseaux sanguins du système nerveux central, causant une angiite qui se traduit en hémorragies, en thromboses, en œdème et finalement en nécrose du parenchyme. La nécrose parenchymateuse est accompagnée de granulomes, le tout occasionnant une inflammation qui varie selon l'état immunologique de la personne atteinte (figure 9) (80, 123).

La majorité des patients affectés d'EGA sont immunodéprimés, que ce soit suite à une transplantation d'organe ou par la maladie (VIH, Lupus, Hépatite C...) (15, 37, 72, 134, 205). Généralement, un patient entre en contact avec l'acanthamibe par respiration des kystes qui pénètrent dans l'organisme à partir des vaisseaux sanguins alvéolaires des poumons (100). Il est aussi répertorié que les amibes peuvent s'introduire par des lésions cutanées (123). Une fois entrées, sous leur forme trophozoïte elles se meuvent au sein de leur hôte et migrent par dissémination intravasculaire. Elles peuvent atteindre plusieurs organes, mais vont généralement gagner les limites de la barrière hémato-encéphalique du système nerveux central, qu'elles sont capables de traverser (100).

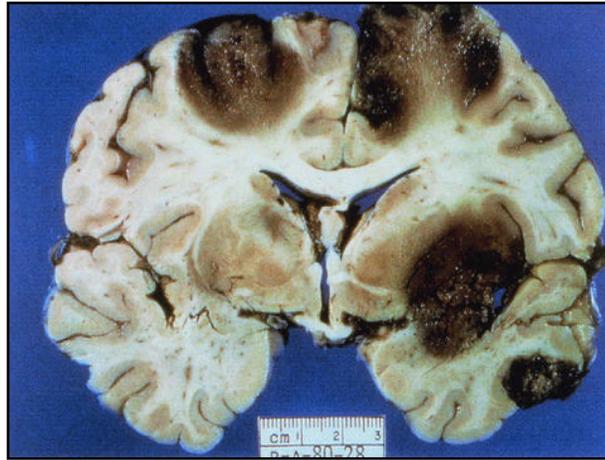


Figure 9 Section coronale des hémisphères cérébraux d'un patient décédé de EGA avec nécrose subcorticale (123).

La période d'incubation entre l'entrée de l'acanthamibe et l'apparition des symptômes est inconnue et difficile à établir. Les premiers signes cliniques peuvent prendre des semaines ou des mois à apparaître, et sont ceux de pratiquement n'importe quelle affection du système nerveux central. Le sujet infecté présente des nausées, maux de tête, confusions, fièvres, léthargies, une raideur dans le cou, des déficits neurologiques ciblés, des signes de pression intracrânienne élevée et finalement il est victime de crises d'épilepsie. Quelques jours ou semaines après les premiers symptômes, le patient succombe à la maladie. Une analyse post-mortem révèle des lésions hémorragiques chroniques en de multiples endroits du cortex. Généralement, les personnes souffrant de EGA présentent aussi plusieurs foyers d'infection situés hors du SNC, dans les viscères comme les reins, le foie ou les poumons (101, 123, 134).

La difficulté de diagnostic réside dans le fait que lors d'une ponction du liquide céphalorachidien, il n'y a généralement aucune amibe de visible, et s'il y en a, elles sont parfois confondues avec des leucocytes (37, 81, 134, 141). Puisque le diagnostic est difficile à établir et que le décès survient rapidement après l'apparition des premiers symptômes, il est peu probable de réussir à traiter un patient avec le bon antibiotique avant qu'il ne succombe. Quoi qu'il en soit, quelques cas de guérison sont rapportés dans la littérature (81, 143, 186, 188). Plusieurs antibiotiques ont un effet statique sur les acanthamibes *in vivo* mais peu arrivent à tuer les trophozoïtes ainsi que les kystes. D'ailleurs, elles sont d'autant plus résistantes aux antibiotiques lorsqu'elles sont enkystées, et des kystes sont fréquemment retrouvés sur le site de l'infection. Une thérapie combinant plus d'un médicament est la meilleure solution, par exemple un cocktail de kétoconazole, de fluconazole, de sulfadiazine, de pentamidine, d'amphotéricine B, de rifampine, d'azithromycine et/ou d'itraconazole a plus de chances d'être efficace (4, 101, 117, 123, 141).

1.3.4.1.3. Amibiase cutanée

L'amibiase cutanée est généralement un prélude à l'infection systémique. Les acanthamibes qui envahissent les tissus cutanés peuvent y être entrés par une lésion sur la peau, ou encore s'y retrouver suite à une dissémination intravasculaire des amibes entrées par le tractus respiratoire supérieur. L'infection peut prendre des semaines, voire même des mois à apparaître. Dans la plupart des cas rencontrés, une acanthamibiase disséminée précède ou succède l'amibiase cutanée, marquée par plusieurs foyers d'infection dans les organes et sur la peau. Chez les individus en santé, cette infection est très rare et se limite à des manifestations cutanées. En revanche, chez les patients immunodéprimés par le VIH ou chez les personnes ayant subi une transplantation d'organes, l'infection cutanée à acanthamibes s'étend à tout l'organisme et est létale (101, 123).

L'infection cutanée est marquée par la présence de papulonodules mous ou fermes drainant du matériel purulent, pour évoluer en plaies ulcérées qui ne guérissent pas. Des trophozoïtes et des kystes de *Acanthamoeba* sont visibles dans les biopsies, mais sont souvent confondues avec des macrophages ou des levures. Le traitement est composé des mêmes antibiotiques que pour la MAG, et peut guérir le patient seulement si le système nerveux central n'a pas encore été atteint (59, 64, 116, 149, 201).

1.3.4.1.4. Facteurs de virulence

Les acanthamibes du groupe morphologique II et du génotype T4 sont le plus souvent associées aux maladies ; ce sont par exemple des amibes du génotype T4 qui sont retrouvées dans 90% des cas de kératites (94, 101, 205, 211). L'association entre les infections humaines et une majorité d'amibes T4 est due à une plus grande virulence de celles-ci et à des propriétés qui augmentent leur transmissibilité, ainsi qu'à leur plus grande résistance aux agents thérapeutiques (101, 102, 104).

Chez une même espèce, l'intensité de la virulence peut varier entre les différentes souches, et peut aussi se convertir chez une même souche. L'inoculation d'une souche virulente ou avirulente dans une souris fait augmenter significativement la production de protéinase et de peroxydase, augmentant de ce fait la cytotoxicité de l'amibe (132). Ainsi, les enzymes hydrolytiques (sérine-protéinases, metalloprotéinase, peroxydase et phospholipases) permettent de différencier une souche d'*Acanthamoeba* virulente d'une souche non virulente (31, 103, 108). Par exemple, la sérine-protéase d'*Acanthamoeba* peut dégrader le collagène, l'élastine et la fibronectine, le fibrinogène et le plasminogène, les immunoglobulines A et G, l'albumine et finalement l'hémoglobine (38, 187).

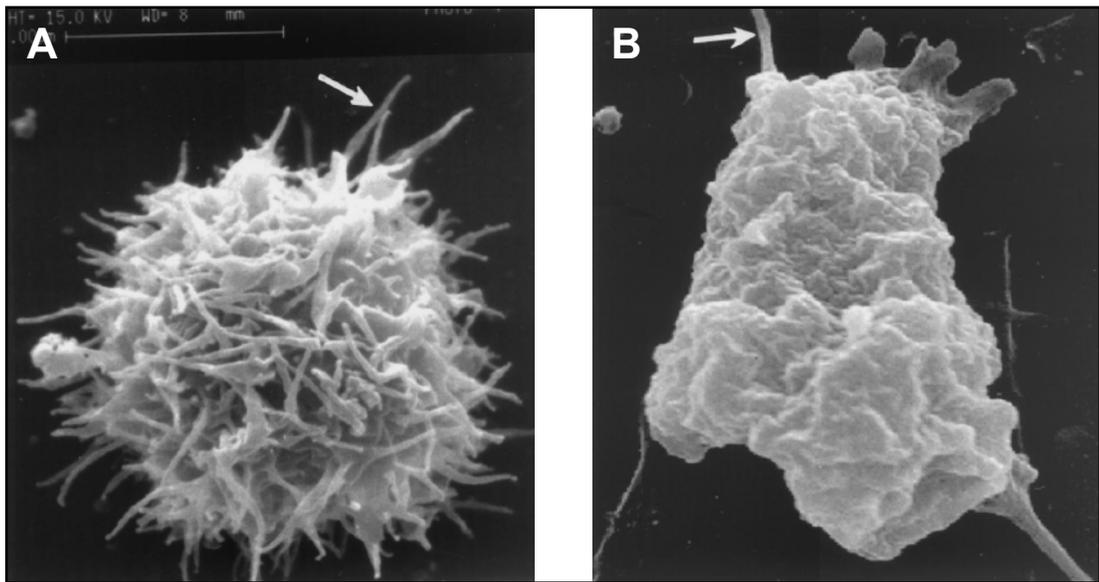


Figure 10 Microscopies électroniques représentatives d'*Acanthamoeba* pathogène et non-pathogène

A : *A. castellanii* (pathogène) ; B : *A. polyphaga* (non-pathogène) À noter les acanthopodes (flèches) beaucoup plus nombreux sur l'acanthamibe pathogène. (102)

À la surface de sa membrane, *Acanthamoeba* possède des Ecto-ATPases capables de causer un déséquilibre du Ca^{2+} intracellulaire et d'activer la cascade de l'apoptose chez les cellules de l'hôte (130). Pour ce faire, un contact entre l'amibe et la cellule hôte est nécessaire, et les acanthamibes les plus pathogènes et virulentes sont aussi celles qui adhèrent le plus fortement aux cellules humaines (31, 102, 110). L'attachement est en corrélation avec une plus grande quantité d'acanthopodes, caractéristique marquée chez les amibes plus virulentes (figure 10) (102). Les acanthopodes s'attachent aux cellules hôtes via une « mannose-binding-protein » présente sur toute la membrane de l'amibe (31). L'attachement aux kératocytes initie la kératite, et l'attachement aux cellules

endothéliales cérébrales initie la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique et ainsi l'invasion du système nerveux central et l'établissement de la méningoencéphalite (100-102).

Comme facteurs de virulence indirects, *Acanthamoeba* possède une résistance à l'osmolarité et aux variations de température élevées, elle tolère une large échelle de pH et elle peut s'enkyster et résister à plusieurs médicaments et désinfectants (51, 65, 101, 211).

1.3.4.2. *Naegleria* spp.

Il y a plus d'un siècle, Schardinger a identifié une amibe qui avait la particularité de se transformer en protozoaire flagellé, et l'a nommé *Amoeba gruberi*. C'est en 1912 que le genre *Naegleria* est suggéré par Alexeiff, et jusqu'en 1970 l'amibe n'a été étudiée que pour ses propriétés de transformation amibe-flagellé. Lorsque le premier cas de MAP est survenu en 1970 en Australie, Malcolm Fowler lui donne le nom de *Naegleria fowleri* (figure 11) (32, 47, 121).

Aujourd'hui, il y a plus de 20 espèces de *Naegleria* identifiées sur des bases moléculaires, mais seulement *Naegleria fowleri* a un potentiel pathogène chez les humains. *N. australiensis* et *N. italica* démontrent un pouvoir létal dans des modèles animaux, mais aucune infection humaine par ces espèces n'a été rapportée (47, 54, 121, 167). Outre la capacité de certaines souches de *N. fowleri* de causer une MAP, la température de croissance peut les différencier quant à leur pathogénicité. Les *Naegleriae* peuvent toutes croître à 30°C, la plupart à 37°C, mais c'est à 45°C que les amibes à potentiel pathogène comme *Naegleria fowleri* prolifèrent (146). C'est pour cette raison que *N. fowleri* est surtout retrouvé dans des sources d'eau chaude, comme des rejets thermiques et les eaux de refroidissement d'usines, ou des lacs dans des régions où la température est élevée. *Naegleria* est considéré « moins ubiquitaire » (177) que *Acanthamoeba*, bien

que l'on en retrouve dans la terre, dans les piscine chlorées, dans l'eau de puits, dans les systèmes de climatisation et même dans les cavités nasales de certaines personnes (21, 47, 92, 120, 121, 169, 204). Dans la nature comme *in vitro*, *Naegleria* spp. se nourrit particulièrement d'entérobactéries gram-négatif, mais peut aussi très bien croître sur des cellules de mammifères (121).



Figure 11 Trophozoïte de *Naegleria fowleri* carter ATCC 30174

L : lobopode ; Flèche : Noyau et nucléole.
Microscopie optique (1000x) (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

Naegleria spp. présente une forme trophique, une forme enkystée, et plus spécialement, une forme bi-flagellée. Lorsque les nutriments sont moins disponibles, il lui est possible de prendre la forme bi-flagellée qui lui permet de se déplacer sur de plus longues distances, d'atteindre une région plus nutritive, et de se re-différencier en trophozoïte. Sous forme flagellée, l'amibe ne se nourrit pas et ne se divise pas non plus. La forme kystique constituée

d'une double-couche contiguë de protéines et de cellulose lui permet de résister à la privation de nourriture, à la dessiccation et à une concentration en chlore libre maximale de 0,5 µg/ml (121, 179, 204, 213).

Tout comme *Acanthamoeba* sp., la ploïdie du génome de *Naegleria fowleri* est inconnue. Une électrophorèse en champ pulsé a révélé la présence de 23 chromosomes chez *N. gruberi*, mais la longueur des chromosomes varie d'une espèce à l'autre. On pense que *Naegleria* est polyploïde parce que la somme des chromosomes donne 19Mb alors que le génome est de 104Mb (47, 54). Les gènes de l'ARN ribosomal permettent de différencier les espèces de *Naegleria*, et principalement les « internal transcribed spacers » (ITS) et la séquence 5,8S. Ces derniers sont séquencés pour toutes les espèces et les séquences se retrouvent dans GenBank (47, 49, 50, 52, 54-57, 153).

1.3.4.2.1. Méningoencéphalite amibienne primitive

Une méningoencéphalite amibienne primitive (MAP) se définit par une leptoméningite fibrinopurulente associée à une nécrose, une hémorragie et un œdème du cerveau. C'est une inflammation méningique fulminante et rapidement fatale. Les trophozoïtes sont retrouvés plutôt dans les espaces périvasculaires, et des kystes sont rarement retrouvés au site de l'infection (80).

Dans un environnement aquatique, *Naegleria fowleri* réussit à pénétrer dans le cerveau de baigneurs d'élégante façon. Tout d'abord, il doit entrer en contact avec la muqueuse nasale, et adhérer au niveau de l'épithélium olfactif. Il traverse ensuite l'épithélium, et passe au travers de la zone criblée de l'os ethmoïde. L'amibe migre le long du nerf olfactif et se retrouve directement dans le cerveau où elle fait des dommages tissulaires et cause de l'inflammation. *Naegleria fowleri* lyse les érythrocytes et les cellules nerveuses et les ingère par phagocytose (36, 99, 124). On a rapporté que l'amibe peut également entrer en contact avec la muqueuse nasale sous forme de kystes disséminés dans de la poussière ou de la terre (114).

Une fois que l'hôte a été en contact avec *Naegleria fowleri* et que l'amibe ait migré dans le SNC, la période d'incubation varie entre 2 et 7 jours. Tout comme dans le cas de l'EAG, les symptômes sont ceux d'une méningite classique. L'infection se manifeste par des maux de tête soudains, une violente fièvre et une nausée. Graduellement une pharyngite peut apparaître, ainsi qu'une obstruction ou des écoulements nasaux. La progression de la maladie fait apparaître des symptômes tels qu'une léthargie, de la confusion, une raideur du cou, une ataxie cérébelleuse, des convulsions et une rapide détérioration de l'état général. Le patient tombe finalement dans un coma et décède en 2 à 14 jours. La différence majeure d'avec la MAG est qu'il n'y a pas de signes neurologiques ciblés, l'état de la personne étant affecté de manière générale (78, 124, 127, 162).

L'amphotéricine B semble être le seul antibiotique à avoir un effet sur le microorganisme *in vivo*. D'autres médicaments ont un impact sur *Naegleria fowleri* mais seulement *in vitro*. Parmi ceux-ci on note la rokitamycine, la rifampicine, le promadine, le clotrimazole, le miconazole et la piramycine (99, 106, 107).

La clé d'un diagnostic précoce et ainsi d'un traitement approprié repose sur une anamnèse complète du patient à la première consultation chez le médecin. Si le sujet a été exposé à de la poussière ou de la terre, ou s'il s'est baigné dans de l'eau thermale, un lac artificiel ou quelque nappe

d'eau que ce soit, une enquête en faveur d'une méningo-encéphalite amibienne devrait être effectuée.

Dans une eau dont le nombre de trophozoïtes de *Naegleria fowleri* est autour de 100 par litre, un individu en santé a 2,5 chances sur un million de contracter une MAP (30). Cette concentration en amibes est toutefois atteignable, entre autre dans les rejets thermiques d'une usine nucléaire, où la concentration en *Naegleria fowleri* peut atteindre 2 500 amibes par litre (17). Par contre, en comptant le nombre de MAP par années en Floride par rapport au nombre de baigneurs, les risques sont probablement plus près de un sur 2,5 millions (212). Malgré la rareté des cas de cette maladie, on retrouve des anticorps IgA et IgM anti-*Naegleria fowleri* chez pratiquement tous les humains testés, ce qui voudrait dire que l'exposition à cette amibe est fréquente (124, 125, 169).

Des cas de MAP ont été répertoriés dans plusieurs pays. Par exemple, il y a eu au total 121 cas aux Etats-Unis dont une guérison, 9 en Inde dont 5 guérisons, 6 au Venezuela, 1 en Italie et 2 au Nigeria (33, 35, 36, 41, 99, 114, 115, 167, 206). Le cas qui nous intéresse à Montréal n'a pas fait l'objet d'une publication, mais à notre connaissance il s'agit du seul cas documenté au Canada.

1.3.4.2.2. Facteurs de virulence

Tout comme *Acanthamoebae*, la virulence de *Naegleria fowleri* varie en fonction de la souche et de son environnement. Ainsi, lorsque l'amibe est cultivée de façon axénique, ou encore avec *E. coli* comme source de nutriments, elle présente une pathogénicité diminuée. Ceci se dénote par une faible production des enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, phosphatases et estérases) (215). Un passage sériel sur des cellules de rein de singe ou une infection *in vivo* chez la souris peut rétablir cette virulence (60). Alors que certaines souches ne font que phagocyter les cellules avec un « food cup », d'autres lysent les cellules nerveuses directement au contact pour ensuite ne phagocyter que les produits de cette lyse (124). La production de protéases a été plusieurs fois comparée chez des espèces non virulentes comme *Naegleria gruberi*, par rapport à *Naegleria fowleri*, et est indentifiée comme étant un des principaux facteurs de virulence (96, 181). De plus, *N. fowleri* produit de l'oxyde nitrique (ON) via des isoformes d'oxyde nitrique synthase ce qui contribue à créer des lésions tissulaires aux site d'invasion (172). De plus, deux protéines formatrices de pores ont aussi été caractérisées, et celles-ci ont une activité cytolytique sur les érythrocytes et les cellules humaines (85).

L'entrée directe dans le système nerveux central de son hôte permet à l'amibe d'échapper à beaucoup d'assauts du système immunitaire, même si la réponse finit inéluctablement par arriver. *Naegleria fowleri* possède des facteurs de virulence ciblant directement la réponse immunitaire : bien qu'activant le complément, il y présente une certaine résistance en exocytant des « blebs » (vésicules) aux endroits affectés par le complexe d'attaque membranaire (CAM), et ainsi libère sa membrane du CAM et évite la lyse (200, 214). De plus, les débris créés lors de la lyse des cellules neuronales par l'amibe peuvent attirer la microglie et ainsi activer les astrocytes et occasionner toute la cascade d'activation de la réponse immunitaire, ce qui a des répercussions fatales dans le système nerveux central (124).

L'adhérence aux cellules de la muqueuse nasale de l'hôte, sa locomotion rapide, son tropisme vers les cellules neuronales, sa forme kystique résistante et finalement sa prolifération rapide sont des facteurs de virulence indirects mais déterminants dans l'établissement de l'infection par *Naegleria fowleri* (27, 101, 124).

1.3.4.3. Autres genres et espèces amphizoïques

Hormis *Acanthamoeba* spp. et *Naegleria fowleri*, deux autres amibes ont été associées à des méningoencéphalites granulomateuses. *Balamuthia mandrillaris* et *Sappinia diploidea* ont causé une centaine de cas mondialement, mais encore ici on croit que ce nombre est sous estimé (66, 105, 166, 179, 204). En effet, pour certains cas de méningoencéphalite amibienne où l'amibe en cause n'avait pas été identifiée en immunohistochimie, des résultats en PCR ont montré qu'il s'agissait de *Balamuthia mandrillaris* (93, 205, 216).

Balamuthia mandrillaris a été isolé pour la première fois en 1986 par Visvesvara dans les tissus cérébraux d'un Babouin Mandrill femelle, décédée dans un parc zoologique (203, 207). Cette amibe cause une affection cutanée et systémique très semblable à *Acanthamoeba*. La différence majeure avec *Acanthamoeba* est que les infections à *Balamuthia mandrillaris* ne surviennent pas que chez des sujets immunodéprimés, mais chez des sujets en santé également (73, 97, 161). Comparativement aux infections à *Naegleria fowleri*, l'infection est moins fulminante et il n'y a pas d'historique de baignade chez les patients infectés. En effet, des méningoencéphalites à *Balamuthia mandrillaris* se sont développées suites à une piqûre d'épine de rosier, à une fracture ouverte, à du jardinage, ou encore sont d'origine tout à fait inconnue (46, 73, 97, 204). Il est aussi possible que l'amibe entre dans

l'organisme via les voies respiratoires inférieures, suite à l'inhalation de terre et de poussière (105). Entre l'apparition des premiers symptômes cutanés et les premières manifestations neurologiques, il peut y avoir un délai de 1 mois à 2 ans (73, 161, 204, 207).

L'amibe est retrouvée principalement dans la terre, où elle se nourrit des autres amibes (66). Il est démontré que *Balamuthia mandrillaris* ne peut croître avec *E. coli* comme source de nourriture, et a une croissance optimale sur des cellules endothéliales microvasculaires de cerveau humain (cellules HBMEC) (129, 177, 178).

Il existe pour le moment peu d'information sur *Sappinia diploidea*. La première infection cérébrale humaine par cette amibe a été diagnostiquée en 2001 chez un homme immunocompétent (75). Il s'agit d'une amibe pouvant croître sur *E. coli* et qui est surtout retrouvée dans la terre. Son noyau comprenant deux nucléoles lui est caractéristique et lui confère le nom de son espèce. L'association de *Sappinia diploidea* avec un premier cas de méningoencéphalite humaine suggère qu'il y a probablement d'autres amibes amphizoïques capables de causer ce genre d'infection (166, 179, 204, 206).

1.4. Identification des amibes

1.4.1. Méthodes de culture

La méthode de culture la plus ancienne et la plus utilisée est celle du pétri non-nutritif recouvert de *E. coli* ou de *Klebsiella aerogenes* (figure 12). Des pétris sont préparés avec 1,5% d'agar dans de la saline de Page (voir annexe V), et une suspension de *E. coli* tué par la chaleur est déposée sur la surface de façon à recouvrir la gélose et ainsi fournir un substrat nutritif aux amibes. Un échantillon de terre ou un faible inoculum d'eau peut être déposé au centre de la gélose et les amibes vont migrer de façon concentrique sur la gélose. Ceci permet ensuite de couper un morceau de gélose comprenant une ou quelques amibes et de cloner celles-ci en transférant le morceau sur une nouvelle gélose (52, 66, 109, 148, 175, 177, 184).

Une autre méthode publiée est celle de la croissance sur biofilm. Des échantillons d'eau sont versés dans des flasques à culture tissulaire, puis un milieu de croissance non sélectif (R2A) est ajouté au liquide. Les flasques sont incubées et un biofilm bactérien peut ainsi se former en quelques jours. Une fois que le biofilm est suffisamment épais, le milieu de culture est retiré et de la saline de Page est ajoutée. S'il y avait des amibes dans l'échantillon au départ, elles vont proliférer à la surface du biofilm (13).



Figure 12 Amibes sur pétri avec *E. coli* tué par la chaleur
(400X) (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

Les amibes peuvent aussi croître en milieu axénique. Pour les acanthamibes, le milieu le plus utilisé est le PYG (proteose peptone, yeast extract, glucose) (101, 123, 177). La croissance axénique de *Naegleria fowleri* est un peu plus difficile. Certains scientifiques préconisent le PYNFH (peptone, yeast extract, nucleic acids, folic acid, hémine) avec 10% de sérum bovin, d'autres le SCGYEM avec sérum bovin (Chang's serum-casein-glucose-yeast extract medium), le milieu de Cline, ou encore des milieux hautement complexes et chimiquement définis (121, 177). Le dénominateur commun de ces milieux est le sérum bovin et l'hémine, qui sont deux composantes nécessaires à la croissance de *Naegleria fowleri* en milieu axénique. Tous ces milieux vont être généralement additionnés d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline) afin d'éviter la contamination bactérienne.

1.4.2. Morphologie

La morphologie des amibes varie grandement au sein d'une même espèce. Les caractères morphologiques peuvent aussi varier en fonction du milieu de culture, comme par exemple *Naegleria fowleri* qui contient beaucoup plus de vacuoles et est plus étendu lorsqu'il est en culture axénique qu'en culture monoxénique (177). En 1988 Page a publié une clé d'identification des amibes libres d'eau douce et terrestres, et cette clé est aujourd'hui la plus utilisée par protozoologistes (146).

Selon cette clé, l'amibe *Naegleria fowleri* s'identifie comme suit : dans l'embranchement phylogénétique des rhizopodes, les amibes de la classe *Heterolobosea* se distinguent par leur forme cylindrique (non aplatie), leur mouvement monopode (non ramifié), leurs pseudopodes éruptifs (plutôt que réguliers), ont une longueur d'au maximum 65 μm , forment des kystes et plusieurs ont une forme flagellée. Dans l'ordre des *Schizophrenidae*, les amibes ne forment pas de corps de fructification. En général, n'importe quelle amibe du type « limax » (amibes monopodes et dont le corps est cylindrique) et ayant des pseudopodes éruptifs est probablement dans la famille des *Vahlkampfiid*, comme *Naegleria fowleri*. Les *Vahlkampfiid* se déplacent généralement plus rapidement que la majorité des amibes et sont aussi plus dodues. Les formes flagellées des amibes du genre *Naegleria* (figure 13) ont normalement deux flagelles, n'ont pas de cytosome et ne se

divisent pas. Les kystes des *Naegleriae* ont aussi des pores d'excystement qui sont obstrués. Dans le genre *Naegleria*, les quelque 20 espèces identifiées sont très semblables (47). Même si Page fournit un algorithme permettant l'identification de quelques-unes, il prend soin de spécifier que cette clé ne fournit qu'un indice sur l'espèce et que des méthodes plus fiables devraient être utilisées (tests biochimiques ou immunologiques, et de nos jours, la PCR). *Naegleria fowleri* devrait croître mal à 20°C et préférentiellement à 40°C. Elle est capable aussi de croître à 45°C et le pourtour des pores cystiques n'est que très mince. Finalement, le test ultime – quoique non fiable à 100% selon Page et Jonckheere (58, 146) – est le test d'agglutination à la concanavaline A, auquel *N. fowleri* est négatif.

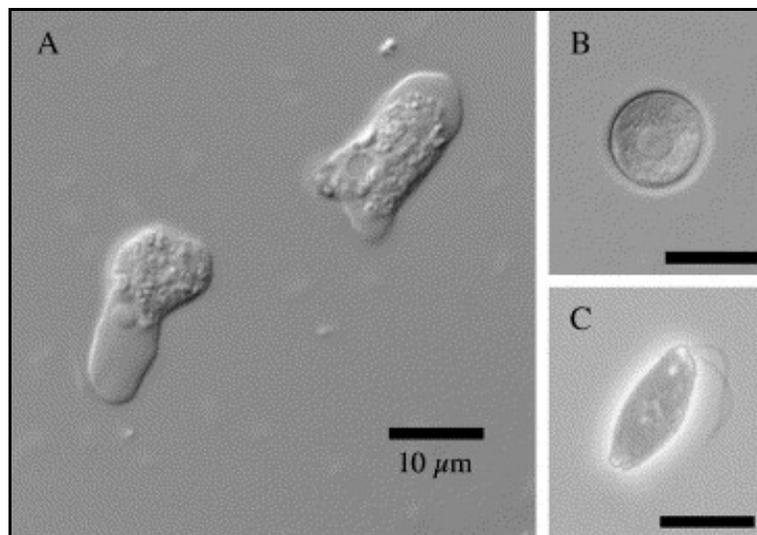


Figure 13 *Naegleria fowleri*

A : Trophozoïte ; B : Kyste ; C : Flagellé. Microscopie optique à contraste d'interférence différentiel et microscopie à contraste de phase (82).

Les *Acanthamoebae* sont pour leur part dans la classe des *Lobosea*, groupe le plus hétérogène. Elles sont dans l'ordre des *Acanthopodiae*, distinguées par leur forme plutôt aplatie et très changeante (figure 14). Elles ont généralement des pseudopodes qui sont également ramifiés, et jamais de forme discoïde régulière. On appelle leurs longs prolongements cytoplasmiques acanthopodes. Ils sont proéminents, minces et flexibles. Les kystes ont des pores obstrués par des opercules. Les amibes de la famille des *Acanthamoebidae* sont un peu larges par rapport à leur longueur, ont une silhouette irrégulière mais s'allongent lorsqu'elles se déplacent. Leurs acanthopodes caractéristiques sont effectivement minces et flexibles et proviennent d'un large lobopode hyalin. Il peut également y avoir de petites gouttelettes de lipide dans le cytoplasme, mais pas de cristaux. Le genre *Acanthamoeba* est distingué par les kystes à double paroi, qui contiennent des pores et des opercules préformés par lesquels l'amibe peut s'excyster, plutôt qu'en brisant le kyste. Les acanthamibes sont, selon Page, probablement le genre le plus fréquemment isolé dans l'environnement et le plus commun des protozoaires libres. Bien que les kystes permettent aisément de distinguer le genre, l'espèce est beaucoup plus difficile à identifier.



Figure 14 Acanthamibe et kystes du groupe III et du génotype T4

Isolée d'un bassin d'eau potable, nommée TR7. Microscopie optique à contraste de phase (1000X) (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

Pussard et Pons ont publié en 1977 une description complète des kystes de toutes les espèces d'acanthamibes connues à ce moment, avec des critères morphologiques comme le nombre de pores, la relation entre la membrane interne et externe et le nombre de bras de l'endokyste (164). Ces critères leur ont permis de classer les acanthamibes en trois groupes morphologiques distincts. Plus tard, en 1998, Stothard *et al.* publient la classification des acanthamibes en groupes génotypiques grâce à l'amplification par PCR et au séquençage d'une partie du gène de l'ARNr 18S (191). À ce jour on compte plus de 15 génotypes, de T1 à T15 (22, 23, 104, 123).

Il est à noter que la clé d'identification de Page (146) a été publiée en 1988 et que la classification des eucaryotes a été révisée depuis (3). Publiée en 2005, la nouvelle classification des eucaryotes proposée par la Société Internationale des Protozoologistes a peu d'impact sur la classification des *acanthamoeba* et des *Naegleria*, mais elle permet toutefois de les reclasser selon les études phylogénétiques qui ont été faites ces 30 dernières années (3). La nouvelle classification ne comprend pas de titres tels que règne, embranchement, classe, ordre, etc... mais le vocabulaire y est plutôt changé et mis à jour. Selon la nouvelle classification, les acanthamibes font partie du super-groupe des Amoebozoa, et sont la le premier rang des Acanthamoebidae. Les *Naegleriae* quant à eux font partie du super-groupe des Excavata et sont dans le premier rang des Heterolobosea.

1.4.3. Identification par réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Comme la morphologie des amibes est très changeante, l'utilisation d'une méthode objective est préférable pour l'identification. Plusieurs amorces différentes ont été élaborées pour identifier les amibes des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* (16, 111, 120, 128, 174). Pour *Acanthamoeba*, les amorces les plus utilisées ont été réalisées par Booton *et al.* et sont une adaptation des amorces de Stothard, qui permettent l'identification du génotype d'une souche pure d'acanthamibes (23, 191). Ces amorces se nomment JDP1 et JDP2, et amplifient le fragment diagnostique 3 (DF3) de l'ADNr 18S qui, une fois séquencé avec les amorces 892 et 892C, peut être comparé dans BLAST pour connaître le génotype de l'acanthamibe (22-24, 55, 119, 145, 176, 191, 217, 218). Pour la différenciation des espèces de *Naegleria* en culture pure, les amorces les plus utilisées ont été élaborées par De Jonckheere en 1998 et amplifient les sections ITS1, 5,8S et ITS2 de l'ADNr (57). Suite au séquençage de la petite sous-unité ribosomale (SSUrDNA), il est possible de comparer la séquence dans BLAST et d'identifier l'espèce. Pour la détection particulière de *Naegleria fowleri*, Réveiller *et al.* a mis au point en 2002 une méthode pour un PCR niché (nested PCR) à partir de la séquence d'ADN d'une protéine membranaire spécifique, Mp2Cl5 (168). Cette méthode a été utilisée à quelques reprises dans des échantillons d'amibes pures ou dans des échantillons environnementaux (120, 126, 168).

Lorsque les amibes sont sous forme trophozoïte, des méthodes d'extraction d'ADN simples suffisent pour les briser et isoler leur ADN (48, 199, 217). Cependant, lorsqu'elles sont enkystées, des méthodes d'extraction plus agressives sont nécessaires. Ceci s'applique surtout à *Acanthamoeba* spp. parce que leur kyste est particulièrement coriace, et résiste à la plupart des kits commerciaux d'extraction (4, 76). Les tampons de lyse UNSET (Urea, NaCl, SDS, EDTA and Tris) et LSB (lysis supporting buffer) sont les plus efficaces, et peuvent être jumelés à l'action de billes de zircon pour augmenter l'extraction (88, 142).

CHAPITRE 2

2.1 Buts et hypothèses

Le but principal de cette étude est de mettre en évidence la présence d'amibes à potentiel pathogène (*Acanthamoeba* sp. et *Naegleria fowleri*) dans les biofilms associés aux unités dentaires, en utilisant des outils de biologie moléculaire.

Pour ce faire, des méthodes de cultures adaptées aux types d'échantillons prélevés sont élaborées, ainsi que des amorces pour un PCR spécifique aux amibes recherchées.

De plus, la même investigation est faite dans des échantillons environnementaux pour fins de comparaison.

Il est supposé que des amibes des espèces *Acanthamoeba* et *Naegleria* seront retrouvées et identifiées par PCR dans les unités dentaires, ainsi que dans les échantillons environnementaux.

CHAPITRE 3

3.1 Article manuscrit

Cet article, intitulé « PCR Detection of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae in Dental Units » a été écrit suite aux expériences réalisées de avril 2008 à février 2009 par moi même. Toujours dans le but de produire le présent manuscrit, plusieurs méthodes ont été testées et améliorées de mai 2007 à avril 2008. L'article a été rédigé entièrement de ma main, et a été révisé par les professeurs Jean Barbeau, Stéphane Roy et Marc C. Lavoie. Il a été soumis le 28 avril 2009 au journal de l'American Society for Microbiology : Applied and Environmental Microbiology. La lettre de présentation de l'Article est mise en annexe du présent mémoire. Les auteurs de l'article sont Sabrina Gravel, Stéphane Roy et Jean Barbeau.

Afin de montrer par PCR la présence d'amibes à potentiel pathogène dans différentes parties des unités dentaires, 25 unités dentaires de la Faculté de Médecine dentaire de l'Université de Montréal ont été échantillonnées. Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans l'article, et les conclusions à en tirer y sont expliquées.

3.2 PCR Detection of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae in Dental Units

ABSTRACT

It has been previously shown that several genera of amoebae may be found in water from dental units and on the inner surface of the tubing. It is thought to be related to the presence of bacterial biofilm on these surfaces. Two major potentially pathogenic amoebae, *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria fowleri* may represent an infection risk and have been observed in water from dental units. Using polymerase chain reaction we detected and identified *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria fowleri* in water from dental units, suction lines and suction filters at the dental clinic of the Faculty of Dentistry at the University of Montreal. DNA was directly extracted from pelleted samples and from samples that had been cultivated on a live *E. coli* biofilm at 37°C for amoebae proliferation and identification. *Acanthamoebae* sp. was detected in 26.7% of our 75 samples and *Naegleria* sp. in 34.7%. No *Naegleria fowleri* was detected. The *Acanthamoebae* sp. genotype detected were T4 (56%) and T11 (44%). Interestingly, T4 genotype was found only in filter samples whereas T11 was in water and suction line samples. Our study confirms the presence of potentially pathogenic amoebae in dental units and implies that these devices should be considered as a possible infection source.

INTRODUCTION

Infections caused by free-living amoebae are rare events. Nonetheless, primary amoebic meningoencephalitis (PAM) and amoebic keratitis (AK) have been observed worldwide (6, 22, 35, 36, 47, 62, 82, 99). Recently, several cases of these diseases have been reported. During the summer of 2007, six cases of PAM occurred in the United States, and all had a fatal outcome (35). PAM is a severe and almost always lethal brain infection, caused by the amoeboflagellate *Naegleria fowleri* (180). This protozoon is mainly found in warm waters, such as industrial thermal discharges and stagnant ponds, but has also been isolated from chlorinated pools and ground water wells (21, 30, 53, 54). AK cases have shown an increase during the past few years (34). This severe infection of the cornea is caused by amoebae of the genus *Acanthamoeba*. More than 138 cases of AK have been reported in North America in the summer of 2007, and most of those have been related to the use of contact lenses (6, 34). *Acanthamoebae* are ubiquitous, and have been isolated from lakes, ponds, tap water and soil. Several *Acanthamoeba* r-DNA complexes have been identified (genotypes T1-T15), but only a few (mainly T4) were determined as potentially pathogenic (23). Interestingly, a case of AK in Montreal (Canada) was documented as possibly related to the use of a dental unit (9). The patient received a splash of water, coming out of the dental unit waterline (DUWL), directly on her cornea and suffered from a severe AK.

Dental unit waterlines are well known to house biofilms; the small lumen causes the water to be virtually stagnant inside the tubing for long periods of time at room temperature, which contribute to increase the biofilm thickness (196). Since most waterlines are irrigated by municipal water sources, biofilm accumulation arises from waterborne microorganisms. The biofilm represents a nutritive substrate for the amoebae, which thrive in the waterline and are continuously expelled in the water used during dental interventions (14). The concentration of amoebae in DUWLs can reach 300 fold the concentration found in tap water and many amoebae cysts are also found embedded in these biofilms (13). Based on culture and morphological characteristics researchers reported the presence of *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria* sp. in DUWLs, some of which are thermotolerant, a characteristic associated with potential virulence (13, 136, 138, 185). A second relevant part of a dental unit is the suction apparatus (saliva ejector and high volume suction line), where thick biofilm can form. Since these systems are in contact with water and patients' saliva, blood and mucosal cells, it was found that the microbial composition of the biofilm is different from those inside the waterlines (11, 12). Occasional back-flow is reported and is significant enough to expulse particles and pieces of biofilm out of the tube and back into the patient's mouth (14). At the distal extremity of the suction tube, a replaceable or washable filter collects debris from oral fluids and water; that filter is also covered with biofilm and represents a third important part of the dental unit for biofilm accumulation.

It is known that potentially pathogenic amoebae are found in water from dental units, but the identification of the genus has only been based on morphological features. Polymerase chain reaction has proven to be generally more reliable to obtain information on amoebae strains present in various samples (16, 120, 126, 217). The aim of this study was to investigate the presence of potentially pathogenic amoebae in dental units, using molecular biology. DNA has been extracted on every sample both pelleted and after enrichment by culture. PCR was performed to detect *Acanthamoebae* sp. and *Naegleria* sp. In addition, when we identified *Naegleria* sp., we screened for the presence of *Naegleria fowleri*. The Diagnostic Fragment 3 (DF3) (23) was sequenced in *Acanthamoeba* sp. positive samples to identify the predominant genotypes.

METHODS

Reference organisms

Acanthamoeba castellanii (Douglas) Page ATCC[®]30898 was grown in PYG medium ATCC[®]712 at 25°C. *Naegleria fowleri* Carter ATCC[®]30174 was grown on non-nutrient agar plates (1.5% agar with Page's saline) seeded with heat killed *E. coli* ATCC[®]25922. Other amoeba strains previously cultivated in our lab from various earth and water samples were cultivated on an *E. coli* biofilm. For our early works, we obtained *Naegleria fowleri* DNA from Dre Francine Marciano-Cabral of Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA.

Sampling

We sampled 25 randomly selected dental units at the dentistry clinic of the University of Montreal, from April to May 2008. From each unit, 20 ml of water was collected from the DUWLs (Figure 15, A) in 50 ml centrifuge tubes (Corning Inc. NY, USA), swabs were taken from the 10 proximal centimeters of suction lines (figure 15, B) and vortexed in 20 ml Page's Saline (126) and finally, the entire disposable suction filters (figure 15, C) were vortexed in 20 ml Page's Saline. We also sampled 3 cold water taps in the Faculty's clinic,

and one water fountain. The average temperature of the water coming out of a dental unit is 21°C, that of the tap water is 14°C and the water fountain is 8°C. All water samples were treated similarly.

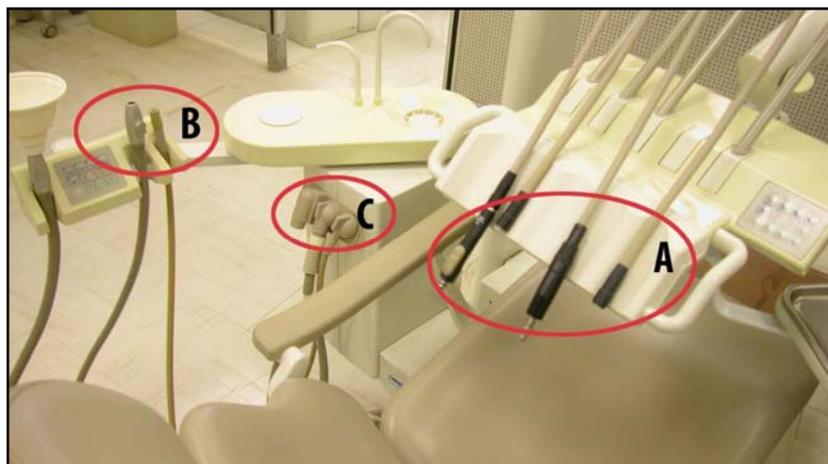


Figure 15 Typical dental unit
With waterlines (A), suction lines (B) and suction filters (C)(79)

Dental units (Systematica model 10601062, Catelbach and Voight, Biberac, Germany) at the clinic where we sampled have been in use for fifteen years. The water lines are made of polyurethane, the suction lines of polyurethane and vinyl and the polymer suction filters are from Pinnacle™. Sampling was done around lunch hour so that dental units had been in use all morning.

Production of *E. coli* biofilm

Inspired by a previous method we used to cultivate amoebae out of water samples involving biofilm formation, we elaborated a different and improved way to do so (13). *E. coli* ATCC®25922 was grown in 10 ml Luria-Bertani Lennox broth overnight at 37°C. The cultures were then adjusted to a density of 0.15 at 620 nm, and diluted to 10^{-6} in LB Lennox broth enriched with 0.1M glucose. Fifteen ml of the dilution was transferred into 25 cm² tissue culture flasks with aeration caps (Corning Inc. – Corning, NY, USA). Flasks were incubated at 37°C. After 6 hours, half of the culture supernatant was discarded and replaced by fresh medium. After 18 hours total incubation time, the biofilms were gently washed three times with 15 ml of Page's Saline (PS). Up to 20 ml of PS was then added in the flask and the biofilm formation was confirmed with an inverted microscope (Leica DL IM, Germany). Biofilms were used the same day or covered with PBS and kept at room temperature for a maximum of three days. For water samples, we simply discarded the PBS supernatant and deposited sample in the flask. When swabbing a surface or using a filter, we resuspended the item in Page's saline and deposited in the flask containing live *E. coli* biofilm.

Samples treatment

Each 20 ml sample was divided in two 10 ml aliquots, and called primary and secondary sample. The primary samples were centrifuged at 6 000 x g for 15 minutes, and the pellets transferred into a microtube for immediate DNA extraction; secondary samples were directly transferred into a flask containing live *E. coli* biofilm for amoebae cultivation. The flasks were incubated at 37°C and checked everyday for growth of amoebae using an inverted microscope. After two weeks, the biofilms were scraped and the material was collected and centrifuged for secondary samples DNA extraction. Morphological identification to the genus was performed using Page's Key, along with the flagellation test (placing trophozoites in distilled water for 120 minutes, waiting for trophozoite-to-biflagellate transformation) to confirm *Naegleriae* (146).

DNA extraction

To test if the method used to extract DNA from trophozoites was effective on cysts, we induced *A. castellanii* encystment by adding 8% glucose in RPMI 1640 medium (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) to a trophozoite monolayer and incubated at room temperature for three days (101). Using a haemocytometer, we determined the number of cells and set aliquots of 10^6 to 10 cysts per 100 μ l. The DNA extraction of these aliquots

was followed by a PCR detection of *Acanthamoebae* using our ACA primers. The ACA primers' sensitivity is 10 pg DNA. PCR detection was done as well on the same quantity of trophozoites for comparison. We added 200 µl of lysis supporting buffer (0.1M Tris-HCl, 0.1M EDTA, 0.1M NaCl, 2% SDS) (142), 200 µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Ultra Pure™ phenol:chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1 v/v, Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) along with 0.2 g of 0.7 mm zirconium beads (Biospec, Ontario, Canada) to the pelleted samples to extract DNA from cysts, by vortexing the microtubes twice for one minute with an interval of five minutes, followed by phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction (176).

PCR primers

Due to the false negatives and false positives we and others (218) encountered using previously described primers (Lai (111), Nelson (128), FLA (202)), we created new sets of primers to detect *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria* sp. with r-RNA gene sequences. All primers were synthesized by SIGMA Aldrich. We used Sequence Manager (DNASTar) and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI) (5) to make sure that the fragments amplified are common to the known species in each genus. These primers were also tested on five waterborne bacteria that we had isolated from DU water and amoebae strains from our laboratory for positive and negative controls:

Acanthamoeba sp.:

ACA-F (5'...3') TGG CAG CGC GAG GAC TAG GG

ACA-R (3'...5') ACC GCA CCG ATG GTG GTG TTT

Naegleria sp.:

NAE-F (5'...3') CTC TGT GCA ATG GAG CAC

NAE-R (3'...5') TGT GTT CAC CAA TTT GAT GAA

For detection of *Naegleria fowleri* we used a nested-PCR method shown to be highly specific and sensitive (1ng DNA)(126).

For genotypic identification of *Acanthamoebae* found in samples, we amplified DF3 fragment of SSU rRNA gene using primers JDP 1 and 2, as previously described (55, 119, 217). Sequencing was done using a 3730 DNA analysis automated system (Applied Biosystems –Foster City, CA, USA) with primer 892C, and the sequences obtained were compared in BLAST. When two overlapping sequences were seen on the chromatogram, meaning most probably more than one genotype, we performed cloning using TA Topo cloning kit (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA). Plasmids were then purified using MiniPrep Plasmid purification kit (SIGMA – St-Louis, MO, USA) and sequenced.

Polymerase chain reaction

DNA extracted was diluted 1:10 and 1 μ l was used in each PCR. Every reaction was performed in duplicate and redone if the results did not match. Amplicons were analysed on 1.5% agarose gel electrophoresis. The annealing temperatures were set at 63°C and 56°C for ACA and NAE respectively. The PCR programs and reagents used were the same as previously reported for other sets of primers (168, 176).

RESULTS

Detection by culture (secondary samples)

Of the 75 samples cultured on biofilms, 30 were positive for the presence of amoebae. Seventy seven percent of these amoebae positive samples were from water (W), 3% were suction sample (S) and 20% were filter samples (F). The majority of amoebae were classified as belonging to the *Vahlkamfiia* family, according to Page's key (146) (Figure 16). These amoebae failed to proliferate at 44°C but encysted and eventually died, meaning they were neither thermophilic nor thermotolerant. The flagellation test was performed on trophozoites but they did not transform into flagellates. Neither *Acanthamoeba* sp. nor *Naegleria* sp. have been clearly identified, on the basis of morphological features. In tap water, we saw amoebae in 2 samples out of 3, and found none in fountain water.

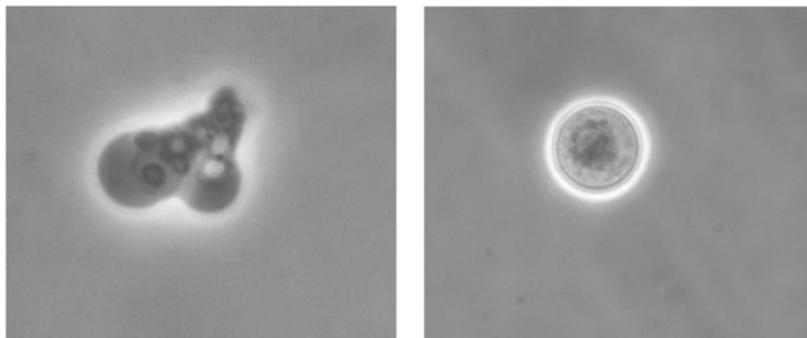


Figure 16 Trophozoite and cyst
of the *Vahlkamfiia* observed in 22 samples, phase contrast 1000X

Detection by PCR

With the ACA primers, we have been able to detect as few as 10 pg of DNA, which means approximately 5 to 10 amoebae (29). Extraction of DNA from 10 trophozoites or cysts yielded an amplicon after PCR amplification (Figure 17), indicating that our extraction method is effective.

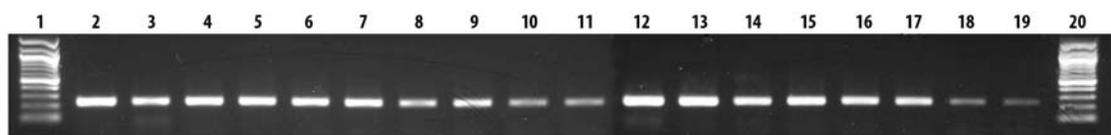


Figure 17 Gel electrophoresis of *Acanthamoeba Castellani*.

Detection on a 1% Agarose gel. Lanes: 1 and 20, 100 pb ladder; 2, 0,5 ng DNA template; 3, 50 pg DNA template; 4 and 5, 10^4 cysts; 6 and 7, 10^3 cysts; 8 and 9, 10^2 cysts; 10 and 11, 10 cysts; 12 and 13, 10^4 trophozoites; 14 and 15, 10^3 trophozoites; 16 and 17, 10^2 trophozoites; 18 and 19, 10 trophozoites.

Tableau 1 Number of samples where *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria* sp. were detected in water, suction and filter samples by PCR

	Water (n=25)		Suction (n=25)		Filter (n=25)	
	^a Prim	^b Sec	Prim	Sec	Prim	Sec
<i>Acanthamoeba</i> sp.	5	1	6	1	9	9
<i>Naegleria</i> sp.	10	0	12	0	4	0

^a PCR detection after DNA extraction of pelleted sample

^b PCR detection after DNA extraction of harvested biofilm-enriched sample

Detailed PCR results of all our samples are shown in Table 1. With raw DNA extraction from dental unit samples, *Naegleria* and/or *Acanthamoeba* were detected in 56% of water (14/25), in 68% of suction and

in 52% of filter. Our data clearly showed that the detection of *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria* sp. was better when using primary samples. *Naegleria* sp. were detected two times more frequently than *Acanthamoeba* sp. in water and suction lines samples, while the reverse was obtained with filter-extracted material. Tap and fountain controls also revealed the presence of both *Acanthamoebae* and *Naegleriae*. According to PCR analysis, out of the 28 *Naegleria* sp. positive samples, none were *Naegleria fowleri*. *Acanthamoebae* have been identified in 11 samples: 1 in water, 1 in suction and 9 in filter after PCR identification of secondary samples, even though none was seen by direct observation.

Sequencing

Amplicons obtained with ACA and NAE primers from 6 randomly chosen *Acanthamoeba* positive samples and 12 *Naegleria* positive samples were sequenced using the forward ACA primer and reverse NAE primer, respectively. All ACA sequences had a 100% match with *Acanthamoeba* sp. 18S rRNA gene and all the NAE sequences had a 100% match with *Naegleria* sp..

Tableau 2 PCR results for detection of *Acanthamoeba* (A) sp. and *Naegleria* (N) sp., and genotypes of *Acanthamoebae* (in brackets), for primary and secondary samples

DU#	Water		Suction		Filter	
	^a Prim	^b Sec	Prim	Sec	Prim	Sec
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	A	-	A
3	-	A	A(T11)	-	-	-
4	N	-	N	-	-	-
5	N	-	-	-	N	-
6	N	-	N	-	-	-
7	A(T11)/N	-	N	-	A(T4)/N	A(T4)
8	N	-	N	-	-	-
9	N	-	-	-	-	-
10	N	-	N	-	-	-
11	-	-	N	-	A(T4)/N	-
12	N	-	N	-	A(T4)	A(T4)
13	N	-	N	-	-	-
14	-	-	-	-	N	-
15	-	-	-	-	N	-
16	-	-	N	-	-	-
17	-	-	-	-	A	-
18	-	-	N	-	N	-
19	N	-	N	-	A(T4)	A(T4)
20	A(T11)	-	-	-	A(T4)	A(T4)
21	-	-	A(T11)	-	A(T4)	A(T4)
22	A(T11)	-	A(T11)	-	A(T4)	A
23	A(T11)	-	A(T11)/N	-	A(T4)	-
24	-	-	A(T11)	-	-	A
25	A(T11)	-	A(T11)	-	-	A(T4)
S1	A(T4, T11)/N	A/N				
S2	A(T4, T11)/N	A/N				
S3	A(T4)/N	A/N				
F1	A(T4)/N	A/N				

^a PCR detection after DNA extraction of pelleted sample

^b PCR detection after DNA extraction of harvested biofilm-enriched sample

-: Negative

S: Taps F: Fountain

DU: Dental Unit

Genotypes

The diagnostic fragment DF3 of the 30 positive samples for *Acanthamoeba* sp. was amplified using JDP1-2 primers and sequenced with the 892C primer. Samples 2S, 2F, 3W, 17F, 22F and 24F did not yield an amplicon with JDP1-2 primers, but they did with ACA primers. Hence sequencing for these *Acanthamoeba*-positive samples was done with ACA forward primer. The amplicon generated by ACA primers did not contain DF3, therefore it was not possible to determine the genotype of these *Acanthamoebae*, but comparisons in BLAST confirmed they belonged to *Acanthamoeba* genera. Of the 24 samples sequenced with 892C, 11 were genotype T11 and 13 were genotype T4. Interestingly, T11 was found only in water and filter samples, whereas T4 was found only in filters.

Genotyping was also done on amplicons from tap and fountain water samples. Cloning had to be done for these samples because on the sequencing chromatogram more than one genotype were present (data not shown). After sequencing the cloned DF3 fragments, we found that genotypes T4 and T11 were present.

DISCUSSION

Free-living amoebae are found basically in every humid environment, but the odds of infection are generally low. It has been observed that water in dental units contains a higher amount of amoebae than the usual tap water because of the biofilm that covers the inside of the water lines (13, 14). During dental interventions, aerosols are created with the high-speed drills and water is sometimes used to rinse wounds, two things that could eventually lead to infections (151). Therefore in order to better estimate the risk of infections from dental unit water aerosol, the presence of potentially pathogenic amoebae in dental units was investigated.

As stated by Frederick Page, “morphology [of amoebae] varies so greatly that uncertainty over species is probably inevitable” (148). Morphological identification of the amoebae genus encountered in DUWLs’ water have been done, but identification of genus and species is somewhat imprecise and linked to the ability of the observer to properly use the available identification keys (146, 164). Therefore an objective method, such as polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm the presence of some medically relevant genus and species of amoebae. Since most amoebae in dental unit-associated biofilms are encysted (13), we used an extraction method aggressive enough to break cysts but sufficiently gentle to avoid DNA damage. Damage was evaluated by analysis of genomic DNA

using 1% agarose gel electrophoresis. We also developed an improved method for the cultivation of amoebae in various samples using a pre-established *E. coli* biofilm in a tissue culture flask.

In dental units, the small lumen (2 mm diameter) of the water lines irrigated by tap water causes the water to be virtually stagnant on the tubing walls, thus promoting bacterial attachment, biofilm growth, and amoeba colonization. It is not unexpected to find amoebae in many water samples. Here, amoebae are less prevalent in the suction lines than in water lines. The high flow (3 inches Hg) (12) of liquid and air and the drier environment of the latter may be unfavourable for amoebae attachment and survival. The biofilm in waterlines is mainly constituted of gram-negative rods, whereas in suction lines there are also gram-positive cocci (12, 14). Since amoebae have a preference for gram-negative bacteria, it is possible that the biofilm in the suction lines is less suitable for amoebae proliferation, hence the low recovery of amoebae from these samples (139, 157).

With primary and secondary samples, we showed that 100% of the DUs were positive for amoebae, a result consistent with previous studies (13, 136, 138). This might not be surprising, considering the fact that amoebae are ubiquitous and that the DUs of the clinic are irrigated by tap water. The microbial biofilm greatly promotes the growth of free-living amoebae and the DU water is near room temperature, thus favouring mesophilic amoebae proliferation. In previous work (13) we observed that when culture

conditions permitted thermotolerant species growth, thermotolerant and thermophilic amoebae were present in DU water. However, identification of the genus has not yet been done, but would be feasible with our current assay. All our secondary samples were incubated at 37°C and 77% were positive for amoebae growth. Free-living amoebae such as *Hartmannella* sp. and *Vanella* sp., considered non-pathogenic, seen after incubation at room temperature in previous studies (13, 136, 138) were not cultured here. This bias on the recovery of amoebae of different genera was considered necessary since we wanted to highlight potentially pathogenic amoebae. It is known that pathogenic *Naegleria* sp. grow at 44°C and that it is one way to identify them, but not for *Acanthamoeba* (101, 146).

When using the most popular method, non-nutrient agar seeded with heat killed *E. coli* (NNE), one may encounter several problems. The fact that NNE enables the growth of moulds caused researchers to discard some samples, unable to isolate amoebae or because some fungi can show toxicity to amoebae (184, 202). DeJonckheere has also reported that sometimes there are so many amoebae growing on each other that subcultivation is impossible (52). In addition, the NNE solid substrate might not be suitable for all amoebae. By putting our liquid sample on an *E. coli* biofilm, we enable amoebae to proliferate. However, like any other cultivation method, we may select amoebae that are most likely to proliferate and takeover the culture, which could be problematic in some experiments. The biofilm method also permits the use of a greater quantity of sample, therefore increasing the

chance to recover amoebae. This method is appropriate for amplifying amoebae in any samples, under different temperature conditions.

The results we obtained with PCR on the samples enriched on biofilm compared to direct observation present major differences. To begin with, we have not seen by microscopy any *Acanthamoebae* sp. in our enriched samples, whereas they could be detected by PCR in 11 samples (14.7%). Since all of our enrichments were done at 37°C we cannot exclude the fact that we selected against *Acanthamoebae*, most of which proliferate between 25°C and 30°C (101, 164, 177). Also, the heavy proliferation of amoebae of other genera in some samples may reduce *Acanthamoebae*'s growth. Hence there was *Acanthamoeba* spp. in these samples in sufficient amounts for PCR detection, but not enough for microscopic observation.

Naegleria sp. was detected in 34.7% of our primary samples but in none of our secondary samples. This could mean that in the culture flask, they were disadvantaged against other genera, or that even though there are *Naegleria* species in the dental units, they are unable to proliferate at 37°C. This would indicate that they are probably less likely to be pathogenic.

We found genotypes T4 and T11 in tap water samples. It is presumably normal to find these genotypes in tap water, T4 being the most common in the environment (22). It was surprising to find that the predominant genotype in water and suction samples was T11 whereas T4

was only found in filters. It is known that 90% of pathogenic *Acanthamoebae* belong to the T4 genotype, probably because T4 amoebae show greater virulence or transmissibility (119). The suction filters, are covered by a biofilm composed of large particles, blood and epithelial cells, an environment presumably more suitable for potentially pathogenic amoebae. It can be hypothesised that T4 amoebae have a greater adhesion capacity to human cells. It is also known that potentially pathogenic *Acanthamoebae* are more osmotolerant (101). This might also explain why we found mainly T4 genotype in filters, where the biofilm content differs greatly from the one found in the two tubings. The amoebae found in any part of a dental unit are most likely coming from tap water, rather than from patients. Investigations also need to be done as to why only T11 is detected in water and suction tubings when both T4 and T11 are found in tap water. It is known that T4 *Acanthamoebae* have caused keratitis in Canada, but data on other genotypes is not yet available (140).

Due to the presence of *Acanthamoeba* of the T4 genotype in the dental unit's water, keratitis for both staff and patients is possible, given that aerosols are created with the air/water syringe. In 1994 a case of keratitis has been reported in Quebec, after a patient had received a splash of water onto her cornea (9). Moreover, the intravascular dissemination of *Acanthamoebae*, when entering through a wound in immunocompromised patients, is documented (100). Dental procedures lead sometimes to small lesions of the gum, and water containing amoebae can enter in contact with

these lesions. With most patients, no amoebae would penetrate in the blood and evade the immune system, but diabetic and HIV patients are reported to be susceptible to infection by *Acanthamoeba*, which may seldom lead to granulomatous encephalitis (GAE) (205). This might have been the case for a patient in Québec who suffered from an unidentified amoebic meningoencephalitis following a dental intervention in 2003. Due to a lack of evidence, no further investigations had been done to find out the origin of the infection, but the link with dental units was possible. Above it all, the presence of amoebae is often associated with amoebae-laden bacteria, such as *Legionellae*, *Mycobacterium* or *Pseudomonacae* (86). Dental units need to be considered as a medical tool with multiple sources of pathogens. Therefore, according to our results, basic prevention actions should be taken, such as flushing the water lines two minutes every morning and incite the patients to wear protective glasses during interventions (10).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Professor Marc C. Lavoie for editorial assistance and the Dentistry clinic staff. This work is supported by the sterilizer monitoring service of our laboratory, therefore we thank all of the dentists we work with.

CHAPITRE 4

Discussion

Les amibes libres sont ubiquitaires, on les retrouve dans tout environnement aquatique ou légèrement humide (159, 170, 175, 179, 204). Malgré un contact fréquent avec ce protozoaire, les infections amibiennes sont de rares événements. Leur présence en grand nombre dans les unités dentaires, dû au contexte particulier de celles-ci, a cependant donné lieu à deux cas connus d'infections graves (1, 8, 9). Lors des interventions dentaires, l'eau des unités, en plus d'être utilisée pour irriguer des plaies, se pulvérise en fines gouttelettes qui peuvent être inhalées par le patient ou les praticiens (13, 14, 68). Le contact avec une grande quantité d'amibes à potentiel pathogène menant à une infection, peut se faire à ce moment. En évaluant la présence réelle d'amibes à potentiel pathogène par PCR, nous sommes en mesure d'évaluer le risque inhérent à l'utilisation d'une eau fortement contaminée en amibes dans la pratique dentaire.

Jusqu'à maintenant, seule une identification morphologique des genres et espèces rencontrées a été faite sur les amibes des unités dentaires (13, 136, 138). L'identification d'amibes sur des bases morphologiques requiert un important investissement de temps et la capacité d'utiliser adéquatement les clés d'identification. Les différentes espèces du genre *Acanthamoeba* sont, comme stipulé dans la littérature, très semblables les unes aux autres. Par exemple, les trophozoïtes d'une acanthamibe isolée d'un réservoir d'eau potable nommée TR7 (voir figure 14) est identique avec *Acanthamoeba castellanii* (voir figures 7 et 19). Pourtant, TR7 est une acanthamibe du génotype T4 et du morphotype III alors que *A. castellanii* ATCC 30898 appartient au génotype T11 et au morphotype II. D'ailleurs, même en utilisant la clé d'identification de Page, il est possible d'observer des amibes qui ne correspondent à aucune morphologie décrite jusqu'à maintenant (voir figure 3B), ce qui rend encore plus difficile la distinction des espèces. Sachant que l'identification morphologique est plus ou moins fiable dû aux grandes variations d'apparence des amibes, la PCR de détection s'avère nécessaire (146, 164, 168, 176). La PCR est un outil qui nous permet d'identifier de façon objective les amibes présentes dans un échantillon, nonobstant les difficultés de culture ou d'identification de celle-ci.

Comme les amibes sont surtout retrouvées enchâssées sous forme de kyste dans les biofilms des unités dentaires, il nous a fallu déterminer une méthode d'extraction d'ADN adéquate (11, 14). Notre méthode, jumelant l'utilisation d'un tampon de lyse hautement dénaturant et une agitation avec

des billes de zircon, s'est montrée efficace pour briser les kystes d'amibes, tout en conservant l'intégrité de l'ADN.

Dans la majorité des études traitant des amibes environnementales, les analyses par PCR se font après isolement et croissance d'une culture pure d'amibes isolées d'un échantillon (28, 109, 182, 208). L'extraction se fait donc sur des trophozoïtes, et les amorces pour le PCR n'ont pas besoin d'être testées pour les réactions croisées avec des organismes autres que les amibes. Dans notre cas, après avoir élaboré une méthode d'extraction d'ADN efficace sur les kystes et les trophozoïtes, le défi a été de créer des amorces sensibles pour une faible quantité d'amibes, tout en étant hautement spécifiques. Comme l'extraction d'ADN et la PCR ont été effectués en premier lieu sur les échantillons complets et non amplifiés, la possibilité de réactions de PCR croisées avec d'autres organismes était probable. Les amorces ACA et NAE n'ont pas montré d'affinités pour l'ADN de 5 bactéries et de diverses amibes isolées de l'eau des unités dentaires, outre les genres désirés (voir figure 18, Annexe 1). Il a été observé à plusieurs reprises que certaines amorces ne donnaient pas un résultat de PCR fiable et qu'il pouvait y avoir des réactions croisées avec d'autres microorganismes. C'est le cas par exemple de l'amorce ACARNA de Vodkin *et al.* spécifique à *Acanthamoeba*, mais qui donne un résultat faux-positif avec *Hartmannella* sp. et qui donne des amplimères avec *Balamuthia* sp. (208, 218, 220). Des amplimères non spécifiques de *Balamuthia* sp. et *Hartmannella* sp. sont aussi obtenus avec l'amorce Nelson de Mathers *et al.*, qui devrait être spécifique à

Acanthamoeba (128, 218, 220). Nous avons-nous même expérimenté des faux-positifs et des amplimères non spécifiques avec des bactéries de l'eau avec l'amorce de Lai *et al.* pour les acanthamibes (111). Il semble que les amorces doivent être choisies ou élaborées en fonction du type d'échantillon à analyser et des microorganismes susceptibles de s'y retrouver.

La mise en culture des amibes présentes dans divers échantillons se fait principalement avec la technique de la gélose non nutritive ensemencée avec *E. coli* (52, 53, 55, 109). Cependant, plusieurs chercheurs ont rencontré des difficultés avec cette méthode. L'inoculum doit premièrement être de petit volume, ou encore avoir été concentré par filtration ou centrifugation. La croissance des moisissures sur le pétri peut également être limitante pour la croissance ou l'isolement d'amibes (52, 184, 202). Finalement, nous avons observé une amibe *Vahlkampfi* (figure 14) isolée sur biofilm de *E. coli* qui était incapable de croître sur gélose, ce qui peut indiquer que certaines amibes ne sont peut être pas aptes à la locomotion et à la prolifération en milieu solide, comparativement à une phase complètement liquide. Il a été démontré que les amibes croissent mieux en ayant des bactéries vivantes comme source de nourriture (158). C'est ce que la méthode de Barbeau *et al.* offre, avec la nuance que parfois des bactéries non comestibles pour les amibes (comme *Pseudomonas*) peuvent constituer le biofilm et ainsi empêcher la croissance des amibes (13). Avec la méthode de culture sur biofilm de *E. coli*, nous évitons la croissance de bactéries inhibitrices pour les amibes, en leur fournissant d'emblée une bactérie favorable. Néanmoins,

avec l'une ou l'autre de ces trois méthodes, il est inévitable qu'il y ait une sélection par rapport aux genres d'amibes isolées. La croissance d'amibes à division plus rapide ou d'amibes amoebivores peut se faire au détriment des autres, empêchant ainsi la croissance et la survie de toutes les amibes d'un même échantillon.

Les espèces d'amibes retrouvées dans l'environnement du Québec et de la Barbade sont plutôt semblables. Il y a une tendance à l'effet que plus d'échantillons de la Barbade ont des amibes poussant à 44°C (données non montrées) qu'au Québec, mais un plus grand nombre d'échantillons serait nécessaire pour établir une corrélation. Quoi qu'il en soit, les résultats nous montrent qu'il y a effectivement des amibes à potentiel pathogène au Québec, même si peu de cas d'infections amibiennes ont été rapportés.

Que ce soit par observation des cultures, par PCR direct ou PCR après culture, tous les échantillons provenant des unités dentaires testés à cet effet contiennent des amibes. Les amibes d'eau douce représentent presque toutes un potentiel infectieux dû à leur rôle protecteur pour certaines bactéries endosymbiotes opportunistes. Qui plus est, les acanthamibes que nous avons identifiées appartiennent aux génotypes T4 et T11, qui sont en cause dans la majorité des cas de kératites amibiennes (6, 62). Il y a une différence intéressante entre les amibes retrouvées dans l'eau par rapport à celles retrouvées dans les appareils de succion des unités dentaires. L'eau véhicule principalement des acanthamibes du génotype T11, alors qu'au

niveau des filtres des unités dentaires nous identifions les acanthamibes du génotype T4 comme étant prédominantes (voir tableau 2). Aussi, il y a plus de *Naegleria* spp. dans l'eau et la tubulure de succion que dans le filtre, où les acanthamibes sont prédominantes. Cette différence flagrante entre les amibes retrouvées dans les trois endroits a probablement un lien avec la différence entre les biofilms qui y sont retrouvés. Les acanthamibes du génotype T4 ont peut être une meilleure adhérence dans un milieu soumis à de grandes perturbations (le filtre). Elles sont peut être aussi plus sujettes à proliférer dans un milieu riche en matière organique (succion et filtre), au détriment des autres amibes comme les *Naegleriae*.

Les amibes retrouvées dans les unités dentaires sont sensiblement les mêmes que dans l'eau du robinet, mais elles sont en plus grande concentration dans les unités dentaires, et le contexte d'utilisation de cette eau est différent (13). Les turbines créent des aérosols (14, 40, 42, 68, 192) et l'eau est parfois utilisée pendant des chirurgies, ce qui peut faire entrer les amibes potentiellement pathogènes dans les voies respiratoires ou dans le système sanguin du patient.

Il est possible que l'eau des unités dentaires ait été la cause d'infections post-opératoires ou opportunistes non publiées chez des patients prédisposés à ce genre d'infection. Avec l'augmentation constante des cas de maladies immunosuppressives, les amibes à potentiel pathogène dans les unités dentaires peuvent représenter un danger pour certains patients.

REFERENCES

1. Weissman-Fickler c. Bouzaglo, 2004, CanLII (QC C.S.), vol. 646. Cour Supérieure du Canada, URL: www.canlii.org/qc/jug/qccs/2004/2004qccs13261.html
2. **Abd, H., B. Wretlind, A. Saeed, E. Idsund, K. Hultenby, and G. Sandström.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* utilises its type III secretion system to kill the free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. J. Eukaryot. Microbiol. **55**:235-243.
3. **Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel, and M. F. Taylor.** 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J Eukaryot Microbiol **52**:399-451.
4. **Aksozek, A., K. McClellan, K. Howard, J. Y. Niederkorn, and H. Alizadeh.** 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. J. Parasitol. **88**:621-623.
5. **Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers, and D. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool [online] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. J Mol Biol **215**:403-410.
6. **Anger, C. M. S., 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.
7. **Atlas, R. M., J. F. Williams, and M. K. Huntington.** 1995. *Legionella* contamination of dental-unit waters. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1208-1213.
8. **Barbeau, J.** 2003. Case report of a meningoencephalitis related to dental procedures. Personal communication, Montreal, Qc.
9. **Barbeau, J.** 2007. Lawsuit against a dentist related to serious ocular infection possibly linked to water from a dental handpiece. J. Can. Dent. Assoc. **73**:618-622.
10. **Barbeau, J.** 2000. Waterborne Biofilms and Dentistry: The Changing Face of Infection Control J. Can. Dent. Assoc. **66**:539-541.
11. **Barbeau, J., C. Avezard, E. Faucher, S. Francis-Zalzal, and A. P. Prevost.** 1997. Biofilm in dental unit waterlines: Ultrastructural and cytochemical analysis. Cells Materials **7**:145-146.
12. **Barbeau, J., L. T. Bokum, C. Gauthier, and A. P. Prévost.** 1998. Cross-contamination potential of saliva ejectors used in dentistry. J. Hosp. Infect. **40**:303-311.
13. **Barbeau, J., and T. Buhler.** 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. Res. Microbiol. **152**:753-760.

14. **Barbeau, J., R. Tanguay, E. Faucher, C. Avezard, L. Trudel, L. Côté, and A. P. Prévost.** 1996. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3954-3959.
15. **Barete, S., A. Combes, J. F. de Jonckheere, A. Datry, S. Varnous, V. Martinez, S. G. Ptacek, E. Caumes, F. Capron, C. Francès, C. Gilbert, and O. Chosidow.** 2007. Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:736-738.
16. **Behets, J., P. Declerck, Y. Delaedt, L. Verelst, and F. Ollevier.** 2007. A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Res.* **41**:118-126.
17. **Behets, J., P. Declerck, Y. Delaedt, L. Verelst, and F. Ollevier.** 2007. Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol. Res.* **100**:1249-1256.
18. **Berk, S. G., R. S. Ting, G. W. Turner, and R. J. Ashburn.** 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. . *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:279-286.
19. **Bharathi, J. M., M. Srinivasan, R. Ramakrishnan, R. Meenakshi, S. Padmavathy, and P. N. Lalitha.** 2007. A study of the spectrum of *Acanthamoeba* keratitis: A three-year study at a tertiary eye care referral center in South India. *Indian J. Ophthalmol.* **55**:37-42.
20. **Bichai, F., P. Payment, and B. Barbeau.** 2008. Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. *Can. J. Microbiol.* **54**:509-524.
21. **Blair, B., P. Sarkar, K. R. Bright, F. Marciano-Cabral, and C. P. Gerbra.** 2008. *Naegleria fowleri* in well water. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:1499-1501.
22. **Booton, G. C., D. J. Kelly, Y.-W. Chu, D. V. Seal, E. Houang, D. S. C. 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.
23. **Booton, G. C., A. Rogerson, T. D. Bonilla, D. V. Seal, D. J. Kelly, T. K. Beattie, A. Tomlinson, F. Lares-Villa, P. A. Fuerst, and T. J. Byers.** 2004. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**:192-200.
24. **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.
25. **Bottone, E. J., R. M. Madayag, and M. N. Qureshi.** 1992. *Acanthamoeba* keratitis: Synergy between amebic and bacterial concomitants in contact lens care systems as a prelude to infection. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2447-2450.
26. **Bouyer, S., C. Imbert, M.-H. Rodier, and Y. Héchard.** 2007. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ. Microbiol.* **9**:1341-1344.

27. **Brinkley, C., and F. Marciano-Cabral.** 1992. A method for assessing the migratory response of *Naegleria fowleri* utilizing [³H]uridine-labeled amoebae. *J. Protozool.* **39**:297-303.
28. **Brown, T. J., R. T. M. Cursons, and E. A. Keys.** 1982. Amoebae from Antarctic soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:491-493.
29. **Byers, T. J., E. R. Hugo, and V. J. Stewart.** 1990. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (A review). *J. Protozool.* **37**:17S-25S.
30. **Cabanes, P.-A., F. Wallet, E. Pringuez, and P. Pernin.** 2001. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2927-2931.
31. **Cao, Z., D. M. Jefferson, and N. Panjwani.** 1998. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *J. Biol. Chem.* **273**:15838-15845.
32. **Carter, R. F.** 1970. Description of *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* **100**:217-244.
33. **Caruzo, G., and J. Cardozo.** 2008. Primary amoebic meningoencephalitis: a new case from Venezuela. *Tropic. Doc.* **38**:256-257.
34. **Center for Disease Control (CDC).** 2007. *Acanthamoeba* keratitis multiple states, 2005-2007. *MMWR* **56**:532-534.
35. **Center for Disease Control (CDC).** 2008. Primary Amebic Meningoencephalitis --- Arizona, Florida, and Texas, 2007. *MMWR* **57**:573-577.
36. **Cermeno, J. R., I. Hernandez, H. El Yasin, R. Tinedo, R. Sanchez, G. Perez, R. Gravano, and A. Ruiz.** 2006. Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: epidemiological study in Anzoategui state, Venezuela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**:264-8.
37. **Cha, J.-H. J., K. Furie, J. Kay, R. P. Walenski, M. E. Mullins, and E. T. Hedley-Whyte.** 2006. Case 29-2006: a 24-year-old woman with systemic lupus erythematosus, seizures and right arm weakness. *New Eng. J. Med.* **355**:2678-2689.
38. **Chi, L., J. E. Vogel, and A. Shelokov.** 1959. Selective phagocytosis of nucleated erythrocytes by cytotoxic amoebae in cell culture. *Science* **130**:1763-1764.
39. **Chong, E.-M., and M. R. Dana.** 2007. *Acanthamoeba* keratitis. *Int. Ophtalmol. Clin.* **47**:33-46.
40. **Cobb, C. M., C. R. Martel, S. A. M. III, C. Pasley-Mowry, B. L. Ferguson, and K. Williams.** 2002. How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? *J. Dent. Educ.* **66**:549-555.
41. **Cogo, P. E., M. Scaglia, S. Gatti, F. Rossetti, R. Alaggio, A. M. Laverda, L. Zhou, L. Xiao, and G. S. Visvesvara.** 2004. Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1835-1837.

42. **Coleman, D. C., M. J. O'Donnell, A. C. Shore, and R. J. Russel.** 2009. Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. J. Appl. Microbiol. **Epub Ahead of print.**
43. **Cordingley, J. S., R. A. Wills, and C. L. Villemez.** 1996. Osmolarity is an independant trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. J. Cell. Biochem. **61:167-171.**
44. **Coulson, P. B., and R. Tyndall.** 1978. Quantitation by flow microfluorometry of total cellular DNA in *Acanthamoeba*. J. Histochem. Cytochem. **26:713-718.**
45. **Declerck, P., J. Behets, B. De Keersmaecker, and F. Ollevier.** 2007. Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. J. Appl. Microbiol. **103.**
46. **Deetz, T. R., M. H. Sawyer, G. Bilman, F. L. Schuster, and G. S. Visvesvara.** 2003. Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic meningoencephalitis: Presentation of 2 cases. Clin. Infect. Dis. **37:1304-1312.**
47. **DeJonckheere, J. F.** 2002. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. Acta Protozool. **41:309-342.**
48. **DeJonckheere, J. F.** 1987. Characterization of *Naegleria* species by restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. Mol. Biochem. Parasitol. **24:55-66.**
49. **DeJonckheere, J. F.** 1994. Comparison of partial SSUrDNA sequences suggests revision of species names in the genus *Naegleria*. Eur. J. Protistol. **30:333-341.**
50. **DeJonckheere, J. F.** 1993. A group 1 intron in the SSUrDNA of some *Naegleria* spp. demonstrated by polymerase chain reaction amplification. J. Eukaryot. Microbiol. **40:179-187.**
51. **DeJonckheere, J. F.** 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture and virulence in mice of 36 strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. Appl. Environ. Microbiol. **39:681-685.**
52. **DeJonckheere, J. F.** 2006. Isolation and molecular identification of Vahlkampfiid amoeba from an Island (Tenerife, Spain). Acta Protozool. **45:91-96.**
53. **DeJonckheere, J. F.** 2005. The isolation of *Naegleria fowleri italica* from Peru indicates that this potentially pathogenic species occurs worldwide. Parasitol. Int. **54:173-175.**
54. **DeJonckheere, J. F.** 2004. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. Protist **155:89-103.**
55. **DeJonckheere, J. F.** 2007. Molecular identification of free-living amoebae of the *Vahlkampfiidae* and *Acanthamoebidae* isolated in Arizona (USA). Eur. J. Protistol. **43:9-15.**
56. **DeJonckheere, J. F.** 1994. Riboprinting of *Naegleria* spp.: small sub-unit versus large-subunit rDNA. Parasitol. Res. **80:230-234.**
57. **DeJonckheere, J. F.** 1998. Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacers, including the 5.8S rDNA, of *Naegleria* spp. Protist **149:221-228.**

58. **DeJonckheere, J. F., P. Pernin, M. Scaglia, and R. Michel.** 1984. A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* N. spp. *J. Protozool.* **31**:324-331.
59. **Deluol, A.-M., M.-F. Teilhac, J.-L. Poirot, C. Maslo, J. Luboinski, and F.-P. Chantelet.** 1996. Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* sp. in a patient with AIDS. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**:130-131.
60. **Dempe, S., A. J. Martinez, and K. Janitschke.** 1982. Subacute and chronic meningoencephalitis in mice after experimental infection with a strain of *Naegleria fowleri* originally isolated from a patient. *Infection* **10**:5-8.
61. **Depaola, L. G., D. Mangan, S. E. Mills, J. W. Costerton, J. Barbeau, B. Shearer, and J. Bartlett.** 2002. A review of the science regarding dental unit waterlines. *J. Am. Dent. Ass.* **133**:1199-1206.
62. **Di Cave, D., R. Monno, P. Bottalico, S. Guerriero, S. D'Amelio, C. D'Orazi, and F. Berrilli.** 2008. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
63. **Donlan, R. M., and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193.
64. **Duarte, A. G., F. Sattar, B. Granwehr, J. F. Aronson, Z. Wang, and S. Lick.** 2006. Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **25**:237-240.
65. **Dudley, R., A. Matin, S. Alsam, J. Sissons, A. H. Maghsood, and N. A. Khan.** 2005. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bond to human corneal epithelial cells. *ACTA Trop.* **95**:100-108.
66. **Dunnebacke, T. H., F. L. Schuster, S. Yagi, and G. Booton.** 2004. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiol.* **150**:2837-2847.
67. **Dutil, S., A. Mériaux, M.-C. deLatrémouille, L. Lazure, J. Barbeau, and C. Duchaine.** 2009. Measurement of airborne bacteria and endotoxin generated during dental cleaning. *J. Occup. Environ. Med.* **6**:121-130.
68. **Dutil, S., M. Veillette, A. Mériaux, L. Lazure, J. Barbeau, and C. Duchaine.** 2007. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ. Microbiol.* **9**:2836-2843.
69. **Ertabaklar, H., M. Türk, V. Dayanir, S. Ertug, and J. Walochnik.** 2007. *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* Genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol. Res.* **100**:241-246.
70. **Ettinger, M. R., S. R. Webb, S. A. Harris, S. P. McIninch, G. C. Garman, and B. L. Brown.** 2003. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol. Res.* **89**:6-15.
71. **Franco, F. F. S., D. Spratt, J. C. Leao, and S. R. Porter.** 2005. Biofilm formation and control in dental unit waterlines. *Biofilms* **2**:9-17.

72. **Fung, K. T.-T., A. P. Dhillon, J. E. McLaughlin, S. B. Lucas, B. Davidson, K. Rolles, and A. Burroughs.** 2008. Cure of *Acanthamoeba* cerebral abscess in a liver transplant patient. *Liver Transpl.* **14**:308-312.
73. **Galarza, M., V. Cuccia, F. P. Sosa, and J. A. Monges.** 2002. Pediatric granulomatous cerebral amebiasis: A delayed diagnosis. *Pediatr. Neurol.* **26**:153-156.
74. **García, M. T., S. Jones, C. Pelaz, R. D. Millar, and Y. A. Kwaik.** 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol.* **9**:1267-1277.
75. **Gelman, B. B., S. J. Rauf, R. Nader, V. Popov, J. Bokowski, G. Chaljub, H. W. Nauta, and G. S. Visvesvara.** 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *J. Am. Med. Assoc.* **285**:2450-2451.
76. **Goldschmidt, P., S. Degorge, C. St-Jean, H. Year, F. Zekhnini, L. Batellier, L. Laroche, and C. Chaumeil.** 2008. Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. *Br. J. Ophthalmol.* **92**:112-115.
77. **Gómez-Couso, H., E. Paniagua-Crespo, and E. Ares-Mazás.** 2007. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitology research* **100**:1151-1154.
78. **Grate, I., Jr.** . 2006. Primary amebic meningoencephalitis: a silent killer. *Can. J. Emerg. Med.* **8**:365-369.
79. **Gravel, S., and J. Barbeau.** 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.
80. **Guarner, J., J. Bartlett, W.-J. Shieh, C. D. Paddock, G. S. Visvesvara, and S. R. Zaki.** 2007. Histopathologic spectrum and immunohistochemical diagnosis of amebic meningoencephalitis. *Mod. Pathol.* **20**:1230-1237.
81. **Gupta, D., S. Bakhshi, and G. S. Panda.** 2008. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningoencephalitis during induction therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **50**:1292-1293.
82. **Hara, T., and T. Fukuma.** 2005. Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Int.* **54**:219-21.
83. **Hegley, J.** 2009, posting date. John Hegley's World Wild Web Site <http://www.johnhegley.co.uk>. [Online.]
84. **Heinz, E., I. Kolarov, C. Kästner, E. R. Toenshoff, M. Wagner, and M. Horn.** 2007. An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts. *Environ. Microbiol.* **9**:1604-1609.
85. **Herbst, R., C. Ott, T. Jacobs, T. Marti, F. Marciano-Cabral, and M. Liewpe.** 2002. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* **277**:22353-22360.
86. **Horn, M., and M. Wagner.** 2004. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**:509-514.

87. **Hughes, R., W. Heaselgrave, and S. Kilvington.** 2003. *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents of contact lens disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3080-3084.
88. **Hugo, E. R., V. J. Stewart, R. J. Gast, and T. J. Byers.** 1992. Purification of amoeba mtDNA using the UNSET procedure. *In* A. T. Soldo and J. J. Lee (ed.), *Protocols in protozoology*. Allen Press Lawrence, Kans.
89. **Huntington, M. K., J. F. Williams, and C. D. Mackenzie.** 2007. Endotoxin contamination on the dental surgery. *J. Med. Microbiol.* **56**:1230-1234.
90. **Huws, S. A., A. J. McBain, and P. Gilbert.** 2005. Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J. Appl. Microbiol.* **98**:238-244.
91. **Hwang, M. G., H. Katayama, and S. Ohgaki.** 2006. Effect of intracellular resuscitation of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba polyphaga* cells on the antimicrobial properties of silver and copper. *Environ. Sci. Technol* **40**:7434-7439.
92. **Jamerson, M., K. Remmers, G. Cabral, and F. Marciano-Cabral.** 2008. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amoebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitology research* **104**:969-978.
93. **Jayasekera, S., J. Sissons, J. Tucker, C. Rogers, D. Nolder, D. Warhurst, S. Alsam, J. M. L. White, E. M. Higgins, and N. A. Khan.** 2004. Post-mortem culture of *Balamuthia mandrillaris* from the brain and cerebrospinal fluid of a case of granulomatous amoebic meningoencephalitis, using human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.* **53**:1007-1012.
94. **Jeong, H. J., S. J. Lee, J. H. Kim, Y. H. Xuan, K. H. Lee, S. K. Park, S. H. Choi, D. I. Chung, H. H. Kong, M. S. Ock, and H. S. Yu.** 2007. *Acanthamoeba*: Keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. *Exp. Parasitol.* **117**:357-367.
95. **Joslin, C. E., E. Y. Tu, T. T. McMahon, D. J. Passaro, L. T. Stayner, and J. Sugar.** 2006. Epidemiological characteristics of a Chicago-area *Acanthamoeba* keratitis outbreak. *Am. J. Ophthalmol.* **142**:212-217.
96. **Jung, S.-Y., J.-H. Kim, Y.-J. Lee, K.-J. Song, K. Kim, S. Park, K.-I. Im, and H.-J. Shin.** 2008. *Naegleria fowleri*: *nfa1* gene knock-down by double-stranded RNAs. *Exp. Parasitol.* **118**:208-213.
97. **Jung, S., R. L. Schelper, G. S. Visvesvara, and H. T. Chang.** 2004. *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis in an immunocompetent patient. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **128**:466-468.
98. **Kaur, H., L. J. Maguire, D. R. Salomao, and J. D. Cameron.** 2007. Rapid progression of amoebic keratitis 1 week after corneal trauma and 1 year after LASIK. *Cornea* **26**:212-214.
99. **Kaushal, V., D. K. Chhina, S. Ram, G. Singh, R. K. Kaushal, and R. Kumar.** 2008. Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *J. Assoc. Physicians India* **56**:459-62.

100. **Khan, N. A.** 2008. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *J. Med. Microbiol.* **57**:1051-1057.
101. **Khan, N. A.** 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:564-595.
102. **Khan, N. A.** 2001. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr. Microbiol.* **43**:391-395.
103. **Khan, N. A., E. L. Jarroll, N. Panjwani, Z. Cao, and T. A. Paget.** 2000. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2858-2861.
104. **Khan, N. A., and N. K. Tareen.** 2003. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogeny-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol.* **50**:97-107.
105. **Kiderlen, A. F., and U. Laube.** 2004. *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amoebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway. *Parasitol. Res.* **94**:49-52.
106. **Kim, J.-H., S.-Y. Jung, Y.-J. Lee, K.-J. Song, D. Kwon, K. Kim, S. Park, K.-I. Im, and H.-J. Shin.** 2008. Effect of therapeutic chemical agents *in vitro* and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4010-4016.
107. **Kim, J.-H., Y.-J. Lee, H.-J. Sohn, K.-J. Song, D. Kwon, M.-H. Kwon, K.-I. Im, and H.-J. Shin.** 2008. Therapeutic effect of rokitamycin *in vitro* on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **32**:411-417.
108. **Kim, W.-T., H.-H. Kong, Y.-R. Ha, Y.-C. Hong, H. J. Jeong, H. S. Yu, and D. I. Chung.** 2006. Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. *Korean J. Parazitol.* **44**:321-330.
109. **Kingston, D., and D. C. Warhurst.** 1969. Isolation of amoebae from the air. *J. Med. Microbiol.* **2**:27-36.
110. **Kinrear, F. B.** 2003. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmanella*: Quantitative & qualitative *in vitro* studies on keratocytes. *J. Infect.* **46**:228-237.
111. **Lai, S., M. Asgari, and H. R. H. Jr.** 1993. Non-radioactive probe and polymerase chain reaction procedures for the specific detection of *Acanthamoeba*. *Mol. Cell. Probes.* **8**:81-89.
112. **Lawande, R. V., S. N. Abraham, I. John, and L. J. Egler.** 1978. Recovery of soil amoebae from the nasal passages of children during the dusty Harmattan period in Zaira. *Am. J. Clin. Pathol.* **71**:201-203.
113. **Lawande, R. V., M. B. Duggan, M. Constantinidou, and D. B. Tubbs.** 1979. Primary amoebic meningoencephalitis in Nigeria (report of two cases in children). *J. Trop. Med. Hyg* **82**:84-88.

114. **Lawande, R. V., I. John, R. H. Dobbs, and L. J. Egler.** 1979. A case of primary amoebic meningoencephalitis on Zaira, Nigeria. *Am. J. Clin. Pathol.* **71**:591-594.
115. **Lawande, R. V., J. T. MacFarlane, W. R. C. Weir, and C. Awunor-Renner.** 1980. A case of primary amoebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**:21-25.
116. **Levine, S., A. E. Golstein, M. Dahdouh, P. Blank, C. Hoffman, and C. A. Gropper.** 2001. Cutaneous *Acanthamoeba* in a patient with AIDS: A case study with a review of new therapy. *Cutis* **67**:377-380.
117. **Lloyd, D., N. A. Turner, W. Khunkitti, A. C. Hann, J. R. Furr, and A. D. Russel.** 2001. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: Development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**:11-16.
118. **Lorenzo-Morales, J., C. A. Monteverde-Miranda, C. Jiménez, M. L. Tejedor, B. Valladares, and A. Ortega-Rivas.** 2005. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**:233-236.
119. **Lorenzo-Morales, J., A. Ortega-Rivas, E. Martínez, M. Khoubbane, P. Artigas, M. V. Periago, P. Foronda, N. Abreu-Acosta, B. Valladares, and S. Mas-Coma.** 2006. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *ACTA Trop.* **100**:63-69.
120. **Maclean, R. C., D. J. Richardson, R. LePardo, and F. Marciano-Cabral.** 2004. The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitol. Res.* **93**:211-217.
121. **Marciano-Cabral, F.** 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol. Rev.* **52**:114-133.
122. **Marciano-Cabral, F.** 2004. Introductory remarks: Bacterial endosymbionts or pathogens of free-living amoebae. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**:497-501.
123. **Marciano-Cabral, F., and G. Cabral.** 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:273-307.
124. **Marciano-Cabral, F., and G. Cabral.** 2007. The immune response to *Naegleria fowleri* amoebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol. Microbiol.* **51**:243-259.
125. **Marciano-Cabral, F., M. L. Cline, and S. G. Bradley.** 1987. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:692-697.
126. **Marciano-Cabral, F., R. MacLean, A. Mensah, and L. LaPat-Polasko.** 2003. Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5864-5869.
127. **Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega, and C. R. Sterling.** 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:67-85.
128. **Mathers, W. D., S. E. Nelson, J. L. Lane, M. E. Wilson, R. C. Allen, and R. Forberg.** 2000. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch. Ophthalmol.* **118**:178-183.

129. **Matin, A., S. R. Jeong, J. Faull, A. O. Rivas, and N. A. Khan.** 2006. Evaluation of prokaryotic and eukaryotic cells as food source for *Balamuthia mandrillaris*. Arch. Microbiol. **186**:261-271.
130. **Mattana, A., V. Cappai, L. Alberti, C. Serra, P. L. Fiori, and P. Cappuccinelli.** 2002. ADP and other metabolites released from *Acanthamoeba castellanii* lead to human monocytic cell death through apoptosis and stimulate the secretion of proinflammatory cytokines. Infect. Immun. **70**:4424-4432.
131. **Matz, C., A. M. Moreno, M. Alhede, M. Manefield, A. R. Hausser, M. Givskov, and S. Kjelleberg.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. ISME J. **2**:843-852.
132. **Mazur, T., and E. Hadas.** 1994. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. Parasitol. Res. **80**:431-434.
133. **McAllum, P., I. Bahar, I. Kaiserman, S. Srinivasan, A. Slomovic, and D. Rootman.** 2009. Temporal and seasonal trends in *Acanthamoeba* keratitis. Cornea **28**:7-10.
134. **Meersseman, W., K. Lagrou, R. Sciot, J. F. DeJonckheere, C. Haberler, J. Walochnik, W. E. Peetermans, and E. v. Wijngaerden.** 2007. Rapidly fatal *Acanthamoeba* encephalitis and treatment of cryoglobulinemia. Emerg. Infect. Dis. **13**:469-471.
135. **Meier, P. A., W. D. Mathers, J. E. Sutphin, R. Folberg, T. Hwang, and R. O. Wenzel.** 1998. An epidemic of presumed *Acanthamoeba* keratitis that followed regional flooding. Arch. Ophthalmol. **116**:1090-1094.
136. **Michel, R., and M. Borneff.** 1989. Über die bedeutung von Amöben und anderen Protozoen in wasserführenden systemen von dentaleinheiten. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. **187**:312-323.
137. **Michel, R., B. Hauröder, K.-D. Müller, and L. Zöller.** 1999. An environmental *Naegleria* strain, unable to form cysts -- Turned out to harbour two different species of endosymbionts. Endocytobios. Cell Res. **13**:115-118.
138. **Michel, R., and H.-M. Just.** 1984. Acanthamoeben, Naeglerien und andere freilebende Amöben in kühl- und spülwasser von zahnbehandlungseinheiten. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. **179**:56-72.
139. **Moraes, J. D., and S. C. Alfieri.** 2008. Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. **66**:221-229.
140. **Mubareka, S., M. Alfa, G. K. Harding, G. Booton, M. Ekins, and P. VanCaeseele.** 2006. *Acanthamoeba* species keratitis in a soft contact lens wearer molecularly linked to well water. Can. J. Dis. Med. Microbiol. **17**:120-122.
141. **Neafie, R. C., and A. M. Marty.** 1993. Unusual infections in humans. Clin. Microbiol. Rev. **6**:34-56.
142. **Núñez, Y. O., M. A. Fernández, D. Torres-Núñez, J. A. Silva, I. Montano, J. L. Maestre, and L. Fonte.** 2001. Multiplex polymerase chain reaction amplification and

- differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**:293-397.
143. **Olivia, S., M. Jantz, R. Tiernan, D. L. Cook, and M. A. Jurdson.** 1999. Successful treatment of widely disseminated acanthamoebiasis. *Southern Med. J.* **92**:55-57.
 144. **Oppenheim, B. A., A. M. Sefton, O. N. Gill, J. E. Tyler, M. C. O'Mahony, J. M. Richards, P. J. L. Dennis, and T. G. Harrison.** 1987. Widespread *Legionella pneumophila* contamination of dental stations in a dental school without apparent human infection. *Epidem. Inf.* **99**:159-166.
 145. **Ozkoc, S., S. Tuncay, S. B. Delibas, C. Akisu, Z. Ozbek, I. Durak, and J. Walochnik.** 2008. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. *J. Med. Microbiol.* **57**:392-396.
 146. **Page, F. C.** 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae, Culture collection of algae and protozoa (CCAP) ed. Freshwater biological association.
 147. **Page, F. C.** 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.* **14**:709-724.
 148. **Page, F. C.** 1970. Taxonomic and ecological distribution of potentially pathogenic free-living amoebae, Second international congress of parasitology (Abstracts), Washington, DC USA.
 149. **Paltiel, M., E. Powell, J. Lynch, B. Baranowski, and C. Martins.** 2004. Disseminated cutaneous acanthamebiasis: A case report and review of the literature. *Cutis* **73**:241-248.
 150. **Pankhurst, C. L.** 2003. Risk assessment of dental unit waterline contamination. *Prim. Dent. Care* **10**:5-10.
 151. **Pankhurst, C. L., and W. A. Coulter.** 2007. Do contaminated dental unit waterlines pose a risk of infection? *J. Dent.* **35**:712-720.
 152. **Parry, J. D.** 2004. Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**:167-196.
 153. **Pélandakis, M., S. Serre, and P. Pernin.** 2000. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *Naegleria fowleri*. *Journal of eukaryotic microbiology* **47**:116-121.
 154. **Pens, C. J., M. daCosta, C. Fadanelli, K. Caumo, and M. B. Rott.** 2008. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. *Parasitol. Res.* **103**:1241-1245.
 155. **Pérez-Santonja, J. J., S. Kilvington, R. Hughes, A. Tufail, M. Matheson, and J. K. G. Dart.** 2003. Persistently culture positive *Acanthamoeba* keratits. *Ophthalmol.* **110**:1593-1600.
 156. **Pickup, Z. L., R. Pickup, and J. D. Parry.** 2007. A comparison of the growth and starvation responses of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmanella vermiformis* in the presence of suspended and attached *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**:556-563.

157. **Pickup, Z. L., R. Pickup, and J. D. Parry.** 2007. Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2631-2634.
158. **Pickup, Z. L., R. Pickup, and J. D. Parry.** 2007. Growth of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**:264-272.
159. **Preston, T. M.** 2003. The air-water interface: a microhabitat for amoebae. *Euro. J. Protistol.* **39**:385-389.
160. **Preston, T. M., H. Richards, and R. S. Wotton.** 2001. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiol. Letters* **194**:143-147.
161. **Pritzker, A. S., B. K. Kim, D. Agrawal, P. M. Southern, and A. G. Pandya.** 2004. Fatal granulomatous amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* presenting as a skin lesion. *J. Am. Acad. Dermatol.* **50**:S38-41.
162. **Public Health Agency of Canada** 2001 May 15th 2001, posting date. *Naegleria fowleri*: material safety data sheets (MSDS) Accessed October 12, 2007. [Online.]
163. **Puschkarew, B.** 1913. Über die verbreitung der Susswasserprotozoen durch die luft. *Arch. Protistenkd.* **31**:163-172.
164. **Pussard, M., and R. Pons.** 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (protozoa, amoebida). *Protistologica* **XIII**:557-598.
165. **Putnins, E. E., D. DiGiovanni, and A. S. Bhullar.** 2001. Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. *J. Periodontol.* **72**:393-400.
166. **Qvarnstrom, Y., A. J. daSilva, F. L. Schuster, B. B. Gelman, and G. S. Visvesvara.** 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J. Infect. Dis.* **199**:1139-1142.
167. **Rai, R., D. K. Singh, A. K. Srivastava, and A. Bhargava.** 2008. Primary amebic meningoencephalitis. *Ind. Pediatr.* **45**:1004-1005.
168. **Réveiller, F. L., P.-A. Cabanes, and F. Marciano-Cabral.** 2002. Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoebae *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.* **88**:443-450.
169. **Rivera, V., D. Hernández, S. Rojas, G. Oliver, J. Serrano, M. Shibayama, V. Tsutsumi, and R. Campos-Rodríguez.** 2001. IgA and IgM anti-*Naegleria fowleri* antibodies in human serum and saliva. *Can. J. Microbiol.* **47**:464-466.
170. **Rodríguez-Zaragoza, S.** 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Rev. Microbiol.* **20**:225-241.
171. **Rogerson, A., O. R. Anderson, and C. Vogel.** 2003. Are planktonic naked amoebae predominately floc associated of free in the water column? *J. Plankton Res.* **25**:1359-1365.

172. **Rojas-Hernández, S., M. A. Rodríguez-Monroy, L. Moreno-Fierros, A. Jarillo-Luna, M. Carrasco-Yepez, A. Miliar-García, and R. Campos-Rodríguez.** 2007. Nitric oxide production and nitric oxide synthase immunoreactivity in *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.* **101**:269-274.
173. **Scheid, P.** 2007. Mechanism of intrusion of a microsporidian-like organism into the nucleus of host amoeba (*Vanella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitol. Res.* **101**:1097-1102.
174. **Schild, M., C. Gianinazzi, B. Gottstein, and N. Müller.** 2007. PCR-based diagnosis of *Naegleria* sp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J. Clin. Microbiol.* **45**:564-567.
175. **Scholten, T.** 1979. Soil amoebae in Canada. *Can. Microbiol. Assoc. J.* **120**:264-268.
176. **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 subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1903-1911.
177. **Schuster, F. L.** 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:342-354.
178. **Schuster, F. L., and G. S. Visvesvara.** 1996. Axenic growth and drug sensitivity studies of *Balamuthia mandrillaris*, an agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Clin. Microbiol.* **34**:385-388.
179. **Schuster, F. L., and G. S. Visvesvara.** 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* **34**:1001-1027.
180. **Schuster, F. L., and G. S. Visvesvara.** 2004. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug. Resist. Updat.* **7**:41-51.
181. **Serrano-Luna, J., I. Cervantes-Sandoval, V. Tsutsumi, and M. Shibayama.** 2007. A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **54**:411-417.
182. **Sheehan, K. B., J. A. Fagg, M. J. Ferris, and J. M. Henson.** 2003. PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton national parks. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5814-5918.
183. **Sherr, E. B., and B. F. Sherr.** 2002. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie von Leeuwenhoek* **81**:293-308.
184. **Singh, B. N.** 1945. A method of estimating the numbers of soil Protozoa, especially amoebae, based on their differential feeding on bacteria. *Ann. Appl. Biol.* **33**:112-119.
185. **Singh, T., and M. M. Coogan.** 2005. Isolation of pathogenic *Legionella* species and legionella-laden amoebae in dental unit waterlines. *J. Hosp. Infect.* **61**:257-262.
186. **Singhal, T., A. Bajpai, V. Kalra, S. K. Kabra, J. C. Samantaray, G. Satpathy, and A. K. Gupta.** 2001. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**:623-627.

187. **Sissons, J., S. Alsam, G. Goldsworthy, M. Lightfoot, E. L. Jaroll, and N. A. Khan.** 2006. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiol.* **6**:42 (1-8).
188. **Slater, C. A., J. Z. Sickel, G. S. Visvesvara, R. C. Pabico, and A. A. Gaspari.** 1994. Brief report: Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* **331**:85-87.
189. **Snelling, W. J., N. J. Stern, C. J. Lowery, J. E. Moore, E. Gibbons, C. Baker, and J. S. G. Dolley.** 2008. Colonization of broilers by *Campylobacter jejuni* internalized within *Acanthamoeba castellanii*. *Arch. Microbiol.* **189**:175-179.
190. **Sriram, R., M. Shoff, G. C. Booton, P. A. Fuerst, and G. S. Visvesvara.** 2008. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *J. Clin. Microbiol.* **46**:4045-4048.
191. **Stothard, D. R., J. M. Schroeder-diedrich, M. H. Awwad, R. J. Gast, D. R. Ledee, S. Rodriguez-Zaragoza, C. L. Dean, P. A. Fuerst, and T. J. Byers.** 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new rRNA gene sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**:45-54.
192. **Szymanska, J.** 2003. Biofilms and dental unit waterlines. *Ann. Agric. Environ. Med.* **10**:151-157.
193. **Szymanska, J.** 2005. Electron microscopic examination of dental unit waterlines biofilm. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**:295-298.
194. **Szymanska, J.** 2005. Evaluation of mycological contamination of dental unit waterlines. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**:153-155.
195. **Szymanska, J., and J. Dutkiewicz.** 2008. Concentration and species composition of aerobic and facultatively anaerobic bacteria released to the air of a dental operation area before and after disinfection of dental unit waterlines. *Ann. Agric. Environ. Med.* **15**:301-307.
196. **Szymanska, J., J. Sitkowska, and J. Dutkiewicz.** 2008. Microbiological contamination of dental unit waterlines: characteristic. *Ann. Agric. Environ. Med.* **15**:173-179.
197. **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.
198. **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.*
199. **Thompson, P. P., R. P. Kowalski, R. M. Q. Shanks, and Y. G. Gordon.** 2008. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3232-3236.
200. **Toney, D. M., and F. Marciano-Cabral.** 1994. Membrane vesiculation of *Naegleria fowleri* amoebae as a mechanism for resisting complement damage. *J. Immunol.* **152**:2952-2959.

201. **Torno, M. S. J., R. Babapour, A. Gurevitch, and M. D. Witt.** 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**:351-354.
202. **Tsvetkova, N., M. Schild, S. Panaiotov, R. Kurdova-Mintcheva, B. Gottstein, J. Walochnik, H. Aspöck, M. S. Lucas, and N. Müller.** 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* **92**:405-413.
203. **Visvesvara, G. S., A. J. Martinez, F. L. Schuster, G. J. Leitch, S. V. Wallace, T. K. Sawyer, and M. Anderson.** 1990. Leptomyxid amoeba, a new agent of amoebic meningoencephalitis in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2750-2756.
204. **Visvesvara, G. S., H. Moura, and F. L. Schuster.** 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Microbiol.* **50**:1-26.
205. **Visvesvara, G. S., and F. L. Schuster.** 2008. Opportunistic free-living amoebae, Part I. *Clin. Microbiol. News.* **30**:151-158.
206. **Visvesvara, G. S., and F. L. Schuster.** 2008. Opportunistic free-living amoebae, Part II. *Clin. Microbiol. News.* **30**:159-166.
207. **Visvesvara, G. S., F. L. Schuster, and A. J. Martinez.** 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N.Sp., agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**:504-514.
208. **Vodkin, M. H., D. K. Howe, G. S. Visvesvara, and G. L. McLaughlin.** 1992. Identification of *Acanthamoeba* at the genetic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J. Protozool.* **39**:378-385.
209. **Walker, J. T., D. J. Bradshaw, A. M. Bennett, M. R. Fulford, M. V. Martin, and P. D. March.** 2000. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general practice. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3363-3367.
210. **Walochnik, J., K.-D. Müller, H. Aspöck, and R. Michel.** 2005. An endosymbiont harbouring *Naegleria* strain identified as *N. clarki* De Jonckheere, 1994. *Acta Protozool.* **44**:301-310.
211. **Walochnik, J., A. Obwaller, and H. Aspöck.** 2000. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4408-4413.
212. **Wellings, F. M.** 1977. Amoebic meningoencephalitis (Editorial). *J. Florida Med.* **64**:327-328.
213. **Werth, J. M., and A. J. Kahn.** 1967. Isolation and preliminary chemical analysis of the cyst wall of the amoeba-flagellate *Naegleria grüberi*. *J. Bacteriol.* **94**:1272-1274.
214. **Whiteman, L. Y., and F. Marciano-Cabral.** 1987. Susceptibility of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. to complement-mediated lysis. *Infect. Immun.* **55**:2442-2447.
215. **Wong, M. M., S. L. Karr, and C. K. Chow.** 1977. Changes in the virulence of *Naegleria fowleri* maintained *in vitro*. *J. Parasitol.* **63**:872-878.

216. **Yagi, S., F. L. Schuster, and G. S. Visvesvara.** 2008. Demonstration of *Balamuthia* and *Acanthamoeba* mitochondrial DNA in sectioned archival brain and other tissues by the polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* **102**:211-217.
217. **Yera, H., O. Zamfir, T. Boursier, T. Ancelle, L. Batellier, J. Dupouy-Camet, and C. Chaumeil.** 2006. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur. J. Infect. Dis.* **26**:221-224.
218. **Yera, H., O. Zamfir, T. Boursier, E. Viscoglos, C. Noël, J. Dupouy-Camet, and C. Chaumeil.** 2008. The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. *BMJ Microbiol.* **92**:1139-1141.
219. **Yu, H. S., H. J. Jeong, Y.-C. Hong, S.-Y. Seol, D.-I. Chung, and H.-H. Kong.** 2007. Natural occurrence of *Mycobacterium* as endosymbiont of *Acanthamoeba* isolated from a contact lens storage case. *Korean J. Parazitol.* **45**:11-18.
220. **Zamfir, O., H. Yera, T. Boursier, L. Batellier, J. Dupouy-Camet, C. Tourte-Schaeffer, and C. Chaumeil.** 2006. Diagnostic par PCR des kératites   *Acanthamoeba* spp. *Journal Français de l'Ophtalmologie* **29**:1034-1040.
221. **Zhang, Y., X. Sun, Z. Wang, R. Li, S. Luo, X. Jin, S. Deng, and W. Chen.** 2004. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in north china. *Invest. Ophtalmol. Visual Sci.* **45**:1904-1907.

ANNEXE I

L'étude des amibes du point de vue morphologique demande beaucoup d'observation et de minutie. Plusieurs heures derrière la lunette du microscope sont nécessaires afin d'identifier les différents genres d'amibes ; leur morphologie changeante et leur déplacement très lent exige de la patience et de la persévérance. De plus, les publications traitant des amibes ne sont pas suffisamment abondantes pour que l'on y trouve toujours réponses à ses questions. Plusieurs expérimentations sont parfois nécessaires pour remédier à un problème.

Au cours de mes deux années de maîtrise, nous avons expérimenté plusieurs méthodes, testés différents types d'échantillons et obtenus de nombreux résultats qui n'ont pas fait l'objet d'une publication scientifique. Ces diverses expériences non publiées nous ont tout de même permis d'acquérir une certaine expertise dans le domaine de la protozoologie, expertise qui est nécessaire pour la rédaction d'un article scientifique.

L'annexe 1 comprend quelques méthodes expérimentées mais non publiées, ainsi que les résultats de ces méthodes.

Méthodes non publiées

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Afin de prendre des photographies en microscopie électronique à balayage, une méthode simple a été élaborée.

Six lamelles Thermanox Nunc de 13 mm de diamètre sont déposées dans le fond des puits d'une plaque à 24 puits (Costar/Corning Inc. – Corning, NY, USA). Deux ml d'une suspension de trophozoïtes à $10^3 \phi/ml$ sont déposés dans chaque puits contenant un disque, et la plaque est incubée à la température ambiante pendant 45 minutes, à l'obscurité. Cette étape a pour but de laisser les trophozoïtes adhérer aux disques. Par la suite, trois lavages avec de la saline de Page sont effectués, soigneusement, à l'aide d'une pipette Pasteur, puis le surnageant du dernier lavage est retiré. Un ml de glutaraldéhyde 2% est déposé sur les disques, et la plaque est incubée à la température ambiante toute la nuit, à l'obscurité. Après incubation avec le glutaraldéhyde, trois lavages sont effectués de la même façon que les précédents, avec de la saline de Page. Le surnageant du dernier lavage est retiré et un ml d'osmium 1% est déposé dans les puits pour une incubation de 90 minutes. Trois lavages sont faits pour retirer l'osmium, et une déshydratation progressive est ensuite faite avec de l'éthanol à 30%, 50%, 70%, 90% et finalement 100% ; les solutions d'éthanol à différentes concentrations sont mises successivement dans les puits par

incubations de 15 minutes chacune. Suite à l'éthanol 100%, trois lavages avec la saline de Page sont effectués. Les disques sont ensuite retirés des puits et peuvent être observés en MEB avec ou sans séchage préalable.

Le microscope utilisé pour l'observation est un microscope électronique à balayage JEOL JSM-7400F, High Resolution Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM), situé au laboratoire du Dr Nanci de la faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal.

Prélèvements environnementaux

Pour les échantillons de terre, des tubes de 50 ml de type Falcon (Corning Inc. – Corning, NY, USA) sont utilisés. Pour l'eau et la boue, des tubes de 50 ml de type Falcon (Corning Inc. – Corning, NY, USA) et des contenants en plastique stériles de 500 ml et de 1 L (Fisher – Fair Lawn, NY, USA) sont utilisés. Dix échantillons d'eau et dix échantillons de terre ont été prélevés à la Barbade par notre collaborateur, Professeur Marc C. Lavoie, ainsi que divers endroits au Québec par Sabrina Gravel, résumés dans le tableau 3. Les échantillons ont été traités de différentes façons, mais sommairement les amibes y ont été identifiées en morphologie en utilisant la clé de Page. Certains échantillons ont été déposés sur pétri non-nutritif avec *E. coli* et d'autres ont étéensemencés sur biofilm.

Tableau 3 Échantillons du Québec

Terre		T° (°C)	Eau		T° (°C)
HQ1*	Eau entrée	16,0	A1 [□]	Filtre buvette centre de coulée 1	19,0
HQ2	Canal de rejet	25,8	A2	Filtre buvette centre de coulée 2	24,0
HQ3	Filtre du canal de rejet	26,0	A3	Emissaire B St-Maurice	19,5
HQ4	Rejet du fleuve	25,0	A4	Filtre buvette salle de cuve	16,0
HQ5	Étang aéré	19,0	A5	Filtre buvette salle de repos	22,0
HQ6	Cailloux du fleuve	25,0	TR1 [‡]	Eau brute usine de filtration	22,0
HQ7	Filtre du canal de rejet (2)	38,0	TR2	Filtre + eau usine de filtration	20,0
HQ8	Rejet du fleuve (2)	37,5	TR3	Sortie usine de filtration	21,0
HQ9	Fleuve proche du rejet	33,0	TR4	Bassin St-Louis 1	21,0
HQ10	Fleuve plus loin	27,0	TR5	Bassin Ste-Marthe	9,0
CA1 [†]	Carrière 1	18,0	TR6	Bassin Cap	9,5
CA2	Carrière 1, cailloux	18,0	TR7	Compteur puits 16 Cap	10,0
CA3	Carrière 2	20,0	TR8	Bassin Île St-Quentin	17,0
CA4	Carrière 1 (2)	25,5	TR9	Bassin St-Louis 2	9,0
CA5	Carrière 2 (2)	28,0			

* Les échantillons HQ proviennent de la centrale nucléaire Gentilly II de Hydro Québec, à Bécancour, Qc.

† Les échantillons CA proviennent de carrières rocheuses désaffectées et remplies d'eau, à St-Louis-De-France, Qc.

□ Les échantillons A proviennent de l'usine d'aluminium Alcan de Shawinigan, Qc.

‡ Les échantillons TR proviennent du réseau d'eau potable de Trois-Rivières et du Cap-De-La-Madeleine, Qc.

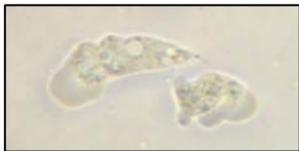
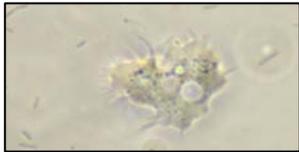
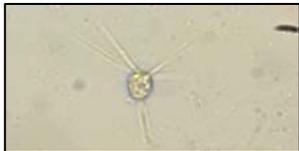
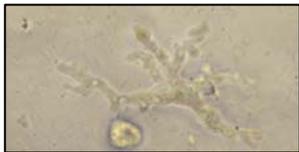
Méthode de culture pour *Naegleria fowleri*

Suite à des difficultés pour faire croître *Naegleria fowleri* dans des flasques en milieu axénique dans du PYNFH additionné de sérum bovin, nous avons dû trouver un substrat plus riche. Du sang humain a été prélevé, et 100 µl de sang entier a été ajouté aux 15 ml de milieu. Les flasques sont incubées à 37°C et le milieu PYNFH-Sang est remplacé à toutes les semaines.

Résultats non publiés

Certains résultats ont été obtenus tout au long de ma maîtrise, mais n'ont pas fait l'objet d'un article. Les différentes espèces d'amibes identifiées dans les échantillons environnementaux sont répertoriées dans le tableau 4, accompagnées des photos correspondantes à ces espèces. Certaines amibes ont été amplifiées en culture pure, puis congelées, ou encore leur ADN a été isolé et congelé. La liste de ces amibes se retrouve à l'annexe I.

Tableau 4 Échantillons environnementaux suspectés pour certains genres d'amibes

Genres d'amibes		Barbade n = 16	Québec n = 29
	<i>Vahlkampfiia</i> Spp.	3	4
	<i>Acanthamoeba</i> Spp.	4	5
	<i>Vanella</i> Spp.	0	1
	<i>Amoeba</i> Spp.	1	6
	<i>Hartmanella</i> Spp.	1	1

(Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal | Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

Pour le développement des amorces pour la détection par PCR des amibes des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba*, des tests de sensibilité et de spécificité sont faits. Les amorces sont testées pour leur spécificité avec des amibes de différentes espèces que celles recherchées, ainsi qu'avec des bactéries isolées de l'eau des unités dentaires (figure 18).

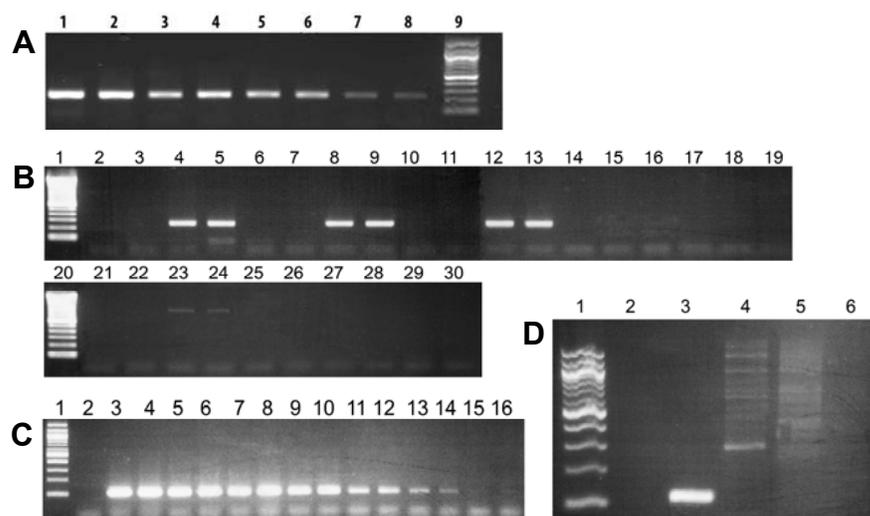


Figure 18 Gels d'électrophorèse des PCR de sensibilité et spécificité pour les amorces ACA et NAE

A : Gel de sensibilité pour l'amorce ACA. Puits 1 et 2 : 10^4 trophozoïtes de *Acanthamoeba Castellanii* ; 2 et 4 : 10^3 trophozoïtes ; 5 et 6 : 10^2 trophozoïtes ; 7 et 8 : 10 trophozoïtes ; 9 : échelle de 100pb.

B : Gel de spécificité pour l'amorce ACA. Puits 1 : échelle de 100pb ; Puits 2 et 3 : blanc H₂O ; 4 et 5 : *A. castellanii* ; 6 et 7 : amibe *N. fowleri* ; 8 et 9 : Amibe B5 ; 10 et 11 : Amibe B12s ; 12 et 13 : Amibe CA2 ; 14 et 15 : Amibe E6 ; 16 et 17 : Amibe A1 ; 18 et 19 : Amibe 153e ; 20 : échelle de 100pb ; 21 et 22 : bactérie de l'eau 1 ; 23 et 24 : bactérie 2 ; 25 et 26 : bactérie 3 ; 27 et 28 : bactérie 4 ; 29 et 30 : bactérie 5

C : Gel de sensibilité pour l'amorce NAE. Puits 1 : échelle de 100pb ; 2 : blanc H₂O ; 3 et 4 : 100 ng d'ADN de *Naegleria fowleri* ; 5 et 6 : 10 ng ; 7 et 8 : 1 ng 9 et 10 : 100 pg ; 11 et 12 : 10 pg ; 13 et 14 : 1 pg ; 15 et 16 : 0,1 pg

D : Gel de spécificité pour l'amorce NAE. Puits 1 : échelle de 100pb ; 2 : blanc H₂O ; 3 : ADN de *Naegleria fowleri* ; 4 : ADN de *A. castellanii* ; 5 : ADN de B12s ; 6 : ADN de CA2

Des photographies ont été prises en microscopie électronique à balayage, afin d'avoir une perspective tridimensionnelle de la surface des amibes (figure 19). L'amibe photographiée est *Acanthamoeba castellanii* ATCC30898.

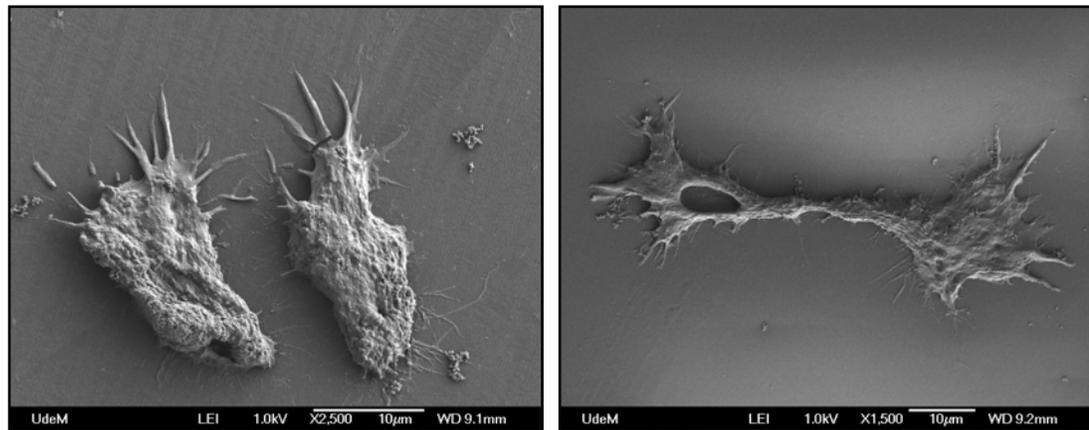


Figure 19 *Acanthamoeba castellanii* en microscopie électronique à balayage (Gravel, S., and J. Barbeau. 2007 - 2008. Photographie. Université de Montréal, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Dentaire, Montréal.)

ANNEXE II

Amibes isolées, amplifiées et congelées, et ADN d'amibes isolées et amplifiées, congelé.

- 1) Amibes isolées et congelées en culture pure
 - a) TR7 : *Acanthamibe* génotype T4, morphotype III, provenant d'un bassin d'eau potable, capable de croître à 37°C
 - b) CA2 : *Acanthamibe*, ne pousse pas à 37°C, Isolée d'une carrière

- 2) ADN d'amibes
 - a) CA2 : *Acanthamibe*, isolée d'une carrière
 - b) A1 : Pas *Acanthamoeba* ni *Naegleria*., Isolée d'un filtre de buvette de l'Alcan, peut être *Hartmanella*, kystes ronds, 10 µm de diamètre avec double paroi contiguë
 - c) 148D : *Acanthamoeba*, kystes polygonaux à double paroi, membrane externe très plissée, isolée d'un filtre d'UD
 - d) B5 : Kystes double couche, paroi interne lisse, externe plissée. 15 µm de diamètre. Trophozoïtes *Acanthamoeba*. Isolée de l'échantillon B5 de la Barbade
 - e) B12s : Kyste de 12 µm de diamètre, bicouche contiguë, paroi lisse, presque rond. Tropho de type *Acanthamoeba* : *Protacanthamoeba* sp. Isolée de l'échantillon B12 de la Barbade

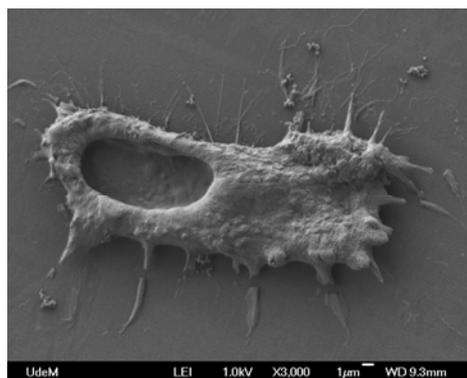
- f) 153e: Kyste parfaitement rond, 10 μm , trophozoïte allongé mais ressemblant à *Acanthamoeba* (non *Acanthamoeba*). Échantillon d'eau d'unité dentaire. Probablement *Protacanthamoeba* sp..

ANNEXE III

Concours de vulgarisation de la science de la fédération des études supérieures de l'Université de Montréal, fonds de la famille Bergeron : Premier prix.

Une ami(b)e aquatique à éviter...

Le diagnostic tombe : « méningite ». Le patient se présente à l'urgence avec une raideur dans le cou, de la fièvre, des maux de tête intenses, des nausées et des étourdissements. Il est jeune, de sexe masculin et en très bonne santé générale. La ponction du liquide céphalo-rachidien ne présente pas l'opacité caractéristique d'une infection bactérienne; l'infection virale est



Amibe du genre *Acanthamoeba*, la plus commune en milieu aquatique

donc présumée. Comme les symptômes d'une méningite virale disparaissent normalement en 8 jours, on attend simplement que le malaise se dissipe. Étonnamment dans ce cas-ci, l'état du patient se détériore davantage, il est en état de choc, a des convulsions, des hallucinations, tombe dans un état comateux et il succombe à la méningite au bout d'un maximum de 10 jours. L'étude des tissus cérébraux lors de l'autopsie révèle une sévère nécrose de la matière grise et blanche; en somme, une partie du cerveau est digérée. La bête en cause dans cette brusque et fatale infection est une amibe, protozoaire microscopique, portant élégamment le nom de *Naegleria fowleri*.

Si une anamnèse plus exhaustive avait été faite, on aurait appris que le patient s'est baigné la veille dans une source d'eau particulièrement chaude, soit une rivière où se rejette l'eau de refroidissement d'une usine. Cette malheureuse histoire est répertoriée plus de 300 fois dans la littérature scientifique, et six américains en sont morts cet été seulement (La Presse, 30 sept 2007). Cependant, le chiffre total des cas mondiaux est sous-estimé. On peut effectivement supposer que plusieurs des méningoencéphalites amibiennes sont prises à tort pour des méningites virales non résolues. De plus, lors de l'observation microscopique, les amibes sont étonnamment très semblables aux cellules du cerveau, quant à leur taille et morphologie. On rapporte qu'il n'est pas rare que des pathologistes n'identifient pas l'amibe en cause, parce qu'elle ne se distingue tout simplement pas des cellules. De plus, les endroits du monde où l'eau de baignade est plus chaude, et donc plus sujette à la présence d'amibes pathogènes, sont souvent ceux qui n'ont pas accès à des soins de santé permettant la détection de l'amibe.

L'amibe est très différente des bactéries ou des virus. Il s'agit en fait d'un micro-organisme unicellulaire, qui se déplace en rampant comme une limace et qui se nourrit de bactéries. La majorité des espèces d'amibes sont inoffensives, et heureusement qu'il en est ainsi puisqu'elles sont ubiquitaires, donc retrouvées partout. Elles vivent dans la terre et dans l'eau, même dans celle de votre robinet. Très peu d'entre elles peuvent causer des maladies, du moins dans les pays industrialisés.

Ainsi donc, *Naegleria fowleri* aime l'eau chaude. Elle prolifère dans l'eau dont la température varie entre 30 et 45°C, parfois même dans les piscines chlorées. Bien que cette infection soit rare, chaque année quelques événements sont rapportés. Cette amibe a une façon très astucieuse de gagner le système nerveux central de l'homme. Lorsque ce dernier plonge la tête dans l'eau et en aspire par le nez, les amibes en profitent pour s'accrocher à la muqueuse nasale. La minuscule bestiole réussit alors un

curieux tour de passe-passe pour accéder à l'encéphale. Elle s'introduit dans la paroi nasale, migre et traverse la muqueuse jusqu'à l'os ethmoïde. Elle passe ensuite au travers du crâne par de petites perforations que l'on appelle la zone criblée. C'est à cet endroit que passe le nerf olfactif, en direction du cerveau. L'amibe se sert donc du nerf olfactif comme d'une autoroute qui la mène tout droit dans la boîte crânienne de son hôte, tout en évitant avec adresse les assauts du système immunitaire. Une fois dans le cerveau, l'amibe se sert comme dans un buffet à volonté. Elle prolifère très rapidement et les premiers effets de sa présence se manifestent seulement quelques heures après la baignade fatale. La plupart des cas de méningoencéphalite amibienne surviennent chez des enfants, pour une raison toute simple : Les enfants ont, en général, moins de scrupules à plonger tête première dans des étangs aux eaux troubles.

Il existe un traitement pour cette grave infection, un cocktail d'antibiotiques composé essentiellement d'amphotéricine B. Encore faut-il diagnostiquer rapidement la méningite, grâce à l'anamnèse détaillée du patient. Dû au court laps de temps entre l'apparition des premiers symptômes et la fatalité de l'infection, il n'y a à ce jour que trois cas documentés de guérison. Ces personnes épargnées ne s'en sont pas sorties indemnes pour autant et vivent avec de lourdes séquelles. Cependant, le simple fait de porter un masque ou un pince-nez lors de la baignade suffit à empêcher *Naegleria fowleri* de trouver sa porte d'entrée.

Cet été les États-unis ont connu trois fois plus de décès dus à *Naegleria fowleri* que d'habitude. Il est d'ailleurs noté que la température des lacs est en constante augmentation, comme en fait état l'épidémie d'algues bleues que nous connaissons au Québec. Ce qui était une affection rare et épisodique pourrait bien devenir un sérieux problème si la population n'est pas sensibilisée aux risques que représente une nappe d'eau réchauffée. Également, plus la température de l'eau s'approche de celle de l'homme, soit

37°C, plus il y a de chances que l'on y retrouve des micro-organismes à potentiel pathogène. Sachez qu'une équipe de chercheurs à l'Université de Montréal a pour projet d'évaluer et de répertorier la présence des amibes à potentiel pathogène au Québec. Toutefois, il n'y a pas lieu de s'alarmer puisque la probabilité d'être contaminé par *Naegleria fowleri* est plus faible que les chances de gagner à la loterie. Par un beau jour de juillet ensoleillé, rien ne vaut une revigorante baignade en eau FRAÎCHE!

Sabrina Gravel

ANNEXE IV

Concours de vulgarisation de la recherche de l'ACFAS, verdict rendu en juin 2009

Aventureuse, indépendante et captivante

À la voir aller, on jurerait qu'elle n'a pas de destination. Une patte lui pousse à droite, une autre à gauche, elle tourne en rond, un véritable chaos. Pourtant, elle n'a qu'un objectif : se nourrir. Et se multiplier, si elle en a envie. Elle prend par contre bien soin de tout faire l-e-n-t-e-m-e-n-t... pas de presse avec madame l'amibe.

C'est un microorganisme unicellulaire mesurant le quart de l'épaisseur d'un cheveu. Elle est plutôt informe car elle se déplace à l'aide de pseudopodes; des prolongements de son petit organisme qui font éruption çà et là et lui permettent d'avancer ou encore d'agripper des bactéries pour s'en nourrir. L'apparition des pseudopodes à la partie antérieure de l'amibe est fascinante à observer, car ceux-ci nécessitent un constant remaniement du cytosquelette et confèrent à l'amibe un mouvement des plus gracieux. Parfois, on la voit se séparer en deux, comme si chaque pied prenait une direction différente, et elle finit par réellement se diviser. C'est la fission binaire, où chacune des deux amibes produites est identique. Elle se reproduit donc de manière asexuée, dans toute sa splendeur et son indépendance.

L'amibe se nourrit par phagocytose en capturant et avalant surtout des bactéries, mais aussi parfois des algues microscopiques, des moisissures, et même quelquefois d'autres amibes, en autant que ces dernières ne soient

pas de la même espèce. Telle une d'éboueuse, elle consomme tout ce qui se trouve sur son passage. Par chance, il existe un paradis pour une telle gloutonne : le biofilm. Lorsque des bactéries se déposent sur une surface à coloniser, le biofilm qu'elles échafaudent leur sert de gîte et leur permet de proliférer en toute sécurité. Elles produisent alors de longs polymères de sucre qui, faisant office de colle, leur offre une cuirasse d'une grande résistance. Mais l'amibe sait y faire; devant un tel buffet elle peut à loisir s'en régaler! Dans l'environnement, c'est-à-dire dans la terre et dans l'eau, partout où l'on retrouve du biofilm bactérien, on retrouve aussi des amibes pour s'en repaître.

Étonnamment, même si elle ne semble pas le moins du monde sélective avec sa pitance, l'amibe ne mange jamais ses semblables. Il semblerait qu'elle soit capable de reconnaître une autre amibe de la même espèce et de lui faire grâce, ce qui laisse croire qu'elle est capable d'une certaine forme de communication. À cause de sa qualité de nettoyeuse, et parce qu'elle reconnaît ses pairs, les chercheurs sont portés à croire qu'elle serait l'ancêtre du système immunitaire du mammifère. Il est vrai que lorsque l'on compare morphologiquement les cellules éboueuses du système immunitaire, les macrophages, avec les amibes, les ressemblances sont frappantes. Tous deux phagocytent ce qui se trouve sur leur chemin, en évitant leurs congénères, et se déplacent à l'aide de pseudopodes.

À l'instar des bactéries qui se protègent dans leur biofilm, l'amibe aussi a sa propre protection. En conditions adverses, par exemple lorsque la concentration en sels devient trop élevée dans le milieu, ou lorsque la température ne lui est pas favorable, l'amibe peut se recouvrir d'une solide armure. Elle fabrique alors sa propre membrane coriace et se recroqueville à l'intérieur pour prendre la forme dite kystique. À l'état de kyste, l'amibe peut tolérer la sécheresse, les antibiotiques et même une faible concentration en eau de javel.

Malgré sa résistance extrême, l'amibe peut elle aussi se faire jouer des tours. Certaines bactéries sont capables de proliférer à l'intérieur même de du cytoplasme de l'amibe. C'est le cas par exemple de la bactérie intracellulaire qui cause la maladie du Légionnaire, *Legionella pneumophila*. Celle-ci cause une infection pulmonaire grave en entrant subrepticement dans les cellules mêmes des poumons. En guise de mise en forme, dans l'environnement, cette bactérie entre dans les amibes lorsque ces dernières les phagocytent, mais elles échappent à la digestion. Elles ont ainsi tout loisir de se multiplier à l'intérieur de la bête microscopique. Deux choses peuvent alors se produire : soit l'amibe éclate en libérant des centaines de bactéries dans l'environnement, soit elle produit des vésicules; des petits sacs contenant des bactéries. La présence d'amibes pourrait hypothétiquement contribuer à l'augmentation de la présence de d'autres bactéries intracellulaires, comme *Listeria monocytogenes* ou encore *Salmonella typhi*, agents causals de la Listériose, et de la Salmonellose, respectivement.

Comme pratiquement tous les organismes, que l'on parle de bactéries, de plantes ou d'humains, il y a les bons et les méchants. Il y a bon nombre d'espèces d'amibes qui sont inoffensives, qui vivent leur vie sans tracas, mais il y a malheureusement quelques espèces qui sont plus aventureuses. C'est le cas de *Acanthamoeba*, qui est normalement retrouvée partout, même dans l'eau du robinet. *A priori* elle n'est pas bien méchante, mais nourrissez la d'un savoureux biofilm au fond d'un étui à verres de contact mal entretenu et Bam! Vous la retrouvez collée à votre œil où elle fait des dégâts à coups sûrs. Cette infection de la couche cornée de l'œil est nommée kératite amibienne et bien que les cas soient rares, elle entraîne une sévère diminution de la vision et est très difficile à traiter. Une infection un peu plus commune est la dysenterie amibienne, causée par *Entamoeba histolytica* qui survient surtout dans les pays tropicaux. C'est dans les eaux plutôt malpropre que cette dernière est à son aise, jusqu'à ce qu'un malheureux

l'ingère par inadvertance. La maladie causée n'est pas mortelle mais est évidemment hautement incommode. L'amibe peuple l'intestin de son hôte où elle perturbe l'absorption normale de l'eau, causant ainsi des diarrhées aiguës. La dernière mais certainement pas la moindre, est *Naegleria fowleri*, la plus machiavélique mais heureusement la plus rarissime de toutes. Cette petite sournoise se complait dans les eaux chauffées, comme les lacs en plein mois d'août ou dans les rejets thermiques d'usines. Il est rare que la concentration d'amibes soit suffisante dans l'eau pour causer une infection, puisqu'il est rare que l'eau d'un lac n'atteigne plus de 40°C (100°F), ce qui est sa température privilégiée. L'amibe se permet d'entrer dans le nez d'un baigneur, traverse la muqueuse nasale au niveau du bulbe olfactif et se sert du nerf olfactif comme d'une autoroute qui la mène tout droit dans le cerveau même du malheureux baigneur. Une fois dans le cerveau, comme sur un biofilm, elle se régale de tout ce qu'elle y trouve... Ce qui évidemment entraîne le décès chez la personne infectée.

Il y a très peu de recherche faite au sujet des espèces d'amibes pathogènes, surtout parce que les cas d'infection sont rares. Il n'en est pas moins que c'est un sujet de recherches fort intéressant et où il reste encore beaucoup à découvrir.

Sabrina Gravel

ANNEXE V

Résumés présentés dans différents congrès.

1- 4th ASM international meeting on Biofilms, Marsh 2007

Detection of free-living amoebae in dental units-associated biofilms

Sabrina Gravel, T. Buhler, J. Barbeau, *Faculty of Dentistry, University of Montreal, Montreal, CANADA*

It is now widely known that biofilms thrive in the small tubing of dental units (DU) and that high concentration of bacteria may find their way in water sometimes used for invasive procedures. Free-living amoebae (FLA) have also been shown to be present in high concentration in DU water (Barbeau *et al.* 2001). Two cases of severe amoebic infections possibly related to exposure to DU biofilms were recently identified in Quebec, raising a question seldom addressed in literature. Assessment of the presence of FLA in biofilm samples is not routinely done because of inherent difficulty of the methods used to cultivate them. Our research is aimed at studying the presence of potentially pathogenic free-living amoeba in DU water and in biofilm samples and from suction systems' tubing and filters. A control was established by comparison with residential hot water tanks samples. We compared two techniques to enrich FLA; a natural biofilm culture in tissue culture flasks and non nutrient agar plates seeded with heat-killed *E. coli*. Transmission Electron Microscopy (TEM) was done on some biofilm samples. Cultures were incubated at 25, 37 and 40°C. Identification of amoebae to the family and genus was performed using the key of Page. It appears that we are able to observe a larger diversity of genus and forms in tissue culture flasks. Although, on a petri dish, it is easier to isolate a single trophozoite to perform further experimentations. FLA were detected in 52% of DU water (n=21),

43% of suction lines and filters (n=44), 23% of water tanks (n=13) and in large number in both biofilms sampled in two sinks in a neonatology unit. *Acanthamoeba* sp. were detected in more than 25% of positives samples of DU water and suction systems (n=33). TEM revealed that cysts can be embedded in biofilm matrix and that trophozoites tend to be present on the surface and are actively phagocytosing bacteria. Dental unit biofilms are populated with potentially pathogenic amoebae. Health care providers should be aware that these microorganisms represent infectious risk for some patients.

2- 34è congrès de l'ACFAS, Mai 2007

Détection d'amibes d'eau douce dans les biofilms des unités dentaires

Sabrina Gravel, T. Buhler, J. Barbeau, *Faculté de Médecine Dentaire, Université de Montréal, CANADA*

Il est connu que les conduites d'eau des unités dentaires (UD) sont couvertes de biofilm. De nombreuses amibes d'eau douce (AED) ont déjà été récupérées dans l'eau des UD. Suite à des procédures dentaires, deux cas d'infection amibienne sévère ont été vus récemment au Québec. Notre but est d'étudier la présence d'AED possiblement pathogènes dans l'eau et les biofilm des UD ainsi que dans les tubes et filtres des appareils de succion (AS). Des réservoirs d'eau chaude domestiques nous ont servi de contrôle. Deux méthodes ont été comparées pour accroître les AED, soit par culture en bouteille de Roux et par culture sur agar. Des biofilm ont été observés en Microscopie Électronique à Transmission (MET). L'incubation s'est faite à 25, 37 et 40°C. L'identification du genre des AED a été pratiquée grâce à la clé de F. C. Page. La bouteille de Roux permet la prolifération de plusieurs genres d'AED tandis que le pétri permet d'isoler un seul trophozoïte. Des AED ont été décelées dans 52% de l'eau des UD, dans 43% des AS et dans 23% des réservoirs. L'espèce *Acanthamoeba* a été vue dans plus de 25% des échantillons positifs. La MET a révélé que les kystes sont encastrés dans la matrice du biofilm et que les trophozoïte sont surtout à la surface, phagocytant les bactéries. Les unités dentaires sont peuplées d'AED qui peuvent possiblement être pathogènes. Les spécialistes de la santé devraient être conscientisés à l'effet qu'elles représentent un risque infectieux pour certains patients.

3- 36è congrès de l'ACFAS, Mai 2009

Identification de la faune amoebienne à potentiel pathogène dans les unités dentaires

Sabrina Gravel, J. Barbeau, *Faculté de Médecine Dentaire,
Université de Montréal, CANADA*

Il a été prouvé qu'il y avait des amibes au sein des unités dentaires (UD). Les petites canalisations d'eau de celles-ci en font un réservoir parfait pour favoriser la croissance de biofilms bactériens et ainsi permettre aux amibes d'eau-douce d'y proliférer. Des cas d'infections amibiennes reliées aux UD ont été répertoriés et le nombre de cas total est en constante augmentation. Il est à noter que les infections amibiennes non-tropicales (kératite et méningoencéphalite) atteignent habituellement les personnes en santé. Il est impossible de déterminer hors de tout doute le genre et l'espèce exacts d'une amibe par des critères morphologiques. Pour pallier à cet obstacle, nous faisons appel à la biologie moléculaire pour mettre en évidence les amibes à potentiel pathogène (APP). Un total de 25 UD ont été échantillonnées en trois endroits chaque : l'eau des canalisations, les parois internes des appareils de succion et les filtres à débris. Grâce à des méthodes de culture, d'extraction d'ADN et de PCR nouvelles, nous avons mis en évidence la présence d'amibes du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria* dans 60% et 56% des UD respectivement. En séquençant certaines parties du génome des acanthamibes retrouvées, nous avons constaté qu'elles appartenaient aux génotypes T4 et T11, deux génotypes à potentiel pathogène. Bien que le risque d'infection soit faible, la présence d'APP dans les unités dentaires est à prendre en considération, même pour un patient en bonne santé.

4- 109th ASM international meeting Mai 2009

Detection of *Acanthamoeba* sp and *Naegleria* sp in dental units components with PCR methods

Sabrina Gravel, J. Barbeau, *Faculty of Dentistry, University of Montreal, Montreal, CANADA*

It has been previously proved that several genera of amoebae may be found in dental unit's (DU) water, and on the inner surface of the DU's tubing. It is thought to be related to the presence of bacterial biofilm on these surfaces. Two major pathogenic amoebae, *Acanthamoeba* sp and *Naegleria fowleri*, may present an infectious risk. The first are associated with keratitis and the latter with primary amoebic meningoencephalitis (PAM). One case of keratitis and a case of PAM, possibly correlated to the use of a dental unit, have been reported in Québec. Identification of amoebae based only on morphological features is not always trustworthy, and cultivation methods currently used all have their drawbacks. Our aim was to investigate by PCR the presence of potentially pathogenic amoebae in dental unit components. We searched for *Acanthamoeba* sp, *Naegleria* sp and *Naegleria fowleri* in 25 DU at the university's dentistry clinic. On each DU, water samples (W), a swab of the suction tubing (S) and the suction's debris filter (F) were taken. We improved the standard culture method (non-nutrient agar seeded with heat-killed *E. coli*) by putting our samples in saline on a pre-grown *E. coli* biofilm in a tissue culture flask. Our DNA extraction method permits also to retrieve DNA from the robust *amoebae* cysts. We extracted DNA directly from crude pelleted samples and also from the samples that have been amplified on *E. coli* biofilms, and then performed PCR. Our results showed that there were *Naegleria* and/or *Acanthamoeba* in 14 W (56%), in 17 S (68%) and in 13 F (52%). *Acanthamoeba* sp. were detected in 20 samples: 5 in W, 6 in S and 9

in F. *Naegleriae* were detected in 28 of the 75 samples: 10 W, 12 S and 6 F. Out of the 28 *Naegleria sp* positive samples, none were containing *Naegleria fowleri*, according to PCR analysis. The simple protocol we describe is proved to be reliable for the detection of potentially pathogenic amoebae in various samples. The presence of *Acanthamoeba sp* and *Naegleria sp* in DUs implies that these devices should be considered as a possible infection source.

ANNEXE VI

Milieux de culture

Saline de Page

Solutions mères (pas nécessaire d'autoclaver)

		1L	125ml
#1	NaCl	12,0g	3g
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,4g	0,1g
	CaCl ₂ • 6H ₂ O	0,6g	0,15g
#2	Na ₂ HPO ₄	14,2g	3,55g
	KH ₂ PO ₄	13,60g	3,4g

Ajouter 10ml de chaque solution-mère à 1l d'eau distillée

Autoclaver

Garder les solutions-mère 6 mois

PYG ATCC® #712

			1 L	500 ml
	Solution saline (100ml)	0,4M MgSO ₄ • 7H ₂ O 4g	10ml	5ml
		0,05M CaCl ₂ 0,58g		
		0,1M sodium citrate • 2H ₂ O 10,2g		
Solution mère #2 de Page's saline	0,25M Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O (5ml de...) 3,5g dans 100ml	12,4ml	6,2ml	
	0,25M KH ₂ PO ₄ (5ml de...) 3,4g dans 100ml			
Eau distillée			917,6 ml	458,8 ml
Yeast extract			1g	0,5g
Proteose peptone			20g	10g
Ajouter après autoclave	Stéril. par filtration	2M Glucose 72g dans 200ml	50ml	25ml
	Ne se conserve pas	0,005M Fe(NH ₄) ₃ (SO ₄) ₂ • 6H ₂ O 0.072g dans 30ml	10ml	5ml

Préparer la solution avec les sels, le yeast extract et le protéose peptone, mais sans le glucose et le fer. Autoclaver. Ajouter le fer et le glucose lorsque la solution est refroidie. Stériliser la solution finale par filtration.

