ممانعت از اتصال فاگوزوم ـ لیزوزوم توسط لژیونلا پنوموفیلا در داخل آمیب آزاد

سیدرضا حسینی‌دوست Ph.D.☆♦، اشرف محبّتی مبارز M.Sc.★

☆ دانشگاه بقیةالله، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتریولوژی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۶۷۷۷-۱۱۳۶۵، دانشگاه بقیةالله، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

چکیده

* **هدف:** عدم توفیق عملیات مرسوم تصفیه آب برای ریشه‌کنی عامل بیماری لژیونر توجه بسیاری از میکروبیولوژیست‌ها را به‌خود جلب کرده است. در این مقاله نحوهٔ مقاومت این باکتری در مقابل مکانیسمهای باکتریسایدِ داخل آمیب میزبان بیان شده است.

* **مواد و روشها:** در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای فلورسنت، لیزوزومهای آکانتامبا نشاندار شد و پس از انجام فاگوسیتوز، نحوه مقاومت باکتریهای داخل سلولی بررسی گردید. لیزوزومهای آکانتامبا کاستلانی به‌وسیلهٔ آکریدین اورنج که یک مادهٔ فلوروسنت است نشاندار و سپس اتصال یا عدم اتصال آنها با فاگوزومهای همان سلول از روی تغییر رنگ تعیین شد.

* **یافته‌ها:** نتیجه این تحقیق نشان داد که لژیونلا پنوموفیلا وقتی توسط آمیب بلعیده و در داخل واکوئل هضمی آن (فاگوزوم) قرار گرفت، از اتصال لیزوزومهای میزبان به فاگوزوم ممانعت کرده و به این طریق موجبات ادامه زندگی خود را در سلول میزبان فراهم می‌کند. درحالی‌که ایشرشیاکلی که معمولاً غذای این آمیب را تشکیل می‌دهد قادر به این ممانعت نیست.

* **نتیجه‌گیری:** آمیبهای آزاد به‌طور فعال باکتریهای موجود در طبیعت را فاگوسیت و هضم کرده و از این طریق در ایجاد تعادل بیولوژیک طبیعت مشارکت می‌نماید. بعضی از باکتریها مثل لژیونلا پس از بلع توسط آمیب، این چرخه را به نفع خود تغییر داده و علاوه بر رشد درون سلولی موجب مرگ سلول میزبان می‌شوند. این که چگونه باکتریها می‌توانند بر آنزیمهای هضمی سلول میزبان فائق آیند تاکنون در مورد آمیبهای آزاد بی‌پاسخ مانده است. این مطالعه نشان می‌دهد که لژیونلا پنوموفیلا با ممانعت از اتصال لیزوزومهای آمیب به فاگوزومی که در آن گرفتار شده به زندگی خود ادامه می‌دهد. این واقعیت احتمالاً دلیل عدم کارآیی روشهای متعارف ضدعفونی آب و در نتیجه ریشه کنی لژیونلا از محیط زیست را بیان می‌کند.

گل واژگان: لژیونلا پنوموفیلا، آکانتامبا کاستلانی، آکریدین اورنج، اتصال فاگو ـ لیزوزوم

مقدمه

لژیونلوز عفونت‌هایی هستند که توسط استرین‌های مختلف لژیونلا در انسان ایجاد می‌شود. لژیونلوز معمولاً به دو صورت بروز می‌نماید: یکی بیماری لژیونر که یک پنومونی کشندهٔ غیر تیپیک است و دیگری تب پونتیاک (۱). کشف این باکتری از نظر تاریخی به همه‌گیری مشهور پنومی سال ۱۹۷۶ در شهر فیلادلفیای آمریکا برمی‌گردد که طی آن ۲۴ نفر به هلاکت رسیدند (۲). لژیونلاپنومونیلا عامل اصلی بیماری لژیونر بوده و شیوع آن از بیشتر نقاط جهان گزارش شده است. این باکتری به‌طور طبیعی در مخازن آبهای محیطی و لوله‌کشی آب شهری (۳) زندگی می‌کند و از این طریق تجهیزات خنک‌کننده شهری را آلوده کرده و به انسان منتقل می‌شود (۴). لژیونلا یک باکتری گرم منفی داخل سلولی است که می‌تواند به‌صورت اختیاری منوسیتها، ماکروفاژها (۵) و طیف وسیعی از تک‌یاخته‌های آزاد (۶) مثل آکانتامباها (۷) را آلوده کرده و درون آنها تکثیر کند. در بیشتر تحقیقاتی که پیرامون اپیدمیولوژی این بیماری انجام شده، لژیونلا و آمیبهای آزاد به‌طور توأم از نمونه‌ها جدا شده است (۸). وجود این ارتباط تنگاتنگ بین دو میکروارگانیسم باعث شده که از همان ابتدا آمیبهای آزاد را به‌عنوان مخزن (۹) و به‌عبارتی جان‌پناه لژیونلا به‌حساب آورند. علاوه بر لژیونلا، میکروارگانیسم‌های بیماریزای دیگر مثل برخی از پلاسمودیومها، تریپانوزوم کروزی، شیگلا فلکسنری، ریکتزیاها و کلامیدیاها نیز بعضی به‌صورت اختیاری و بعضی به‌صورت اجباری زندگی داخل سلولی دارند (۱۰). میکروارگانیسم‌های داخلی سلولی مکانیسم‌های متفاوتی را برای این منظور به‌کار می‌گیرند. برخی مثل تریپانوزم کروزی از فاگوزوم می‌گریزند، بعضی دیگر مثل لیشمانیا در مقابل آنزیمهای لیزوزومی مقاومت می‌کنند و بالاخره گروهی همچون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و کلامیدیا از اتصال فاگوزوم و لیزوزوم ممانعت می‌کنند (۱۰). لژیونلا پنومونیلا نیز از طریق ممانعت از اتصال فاگو ـ لیزوزوم به زندگی خود در داخل ماکروفاژهای انسانی ادامه می‌دهد (۱۱). علیرغم توانایی این باکتری در زندگی و تکثیر درون آمیبها، هنوز مکانیسمهای موجود در این خصوص به‌خوبی تشریح نشده‌اند. این تحقیق به‌منظور فراهم آوردن اطلاعات بیشتر در مورد زندگی داخل سلولی لژیونلا و هموار نمودن مسیر ریشه‌کنی بیماری لژیونر طراحی و انجام یافته است.

مواد و روشها

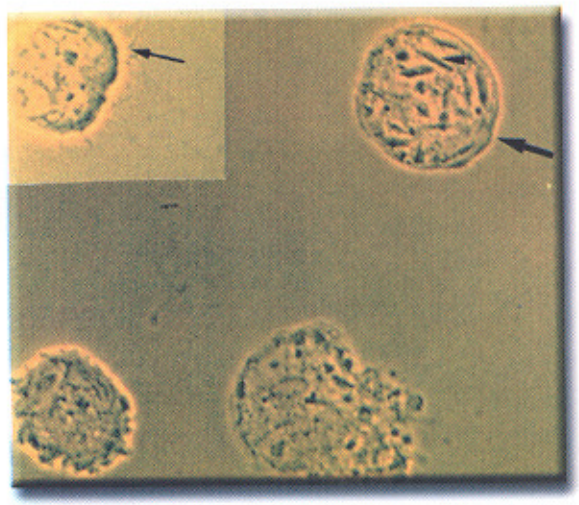
استرین بیماریزای لژیونلا پنومونیلا که در ابتدا از سیستم آب بیمارستان جدا شده بود (۱۲) و روی گلوله‌های شیشه‌ای به‌حالت منجمد در آزمایشگاه نگهداری شد. آکانتامباکاستلانی نیز از چشم یک بیمار مبتلا به‌کراتیت آمیبی جدا شد (۱۳). آکانتامبا روی محیط آگار معمولی و همراه با ایشرشیاکلی کشته شده رشد داده شد و این کشتها در داخل پاکتهای پلاستیکی درب بسته درون یخچال معمولی تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

آکریدین اورنج (AO) از شرکت سیگما خریداری شد و در آزمایشگاه یک محلول ذخیره به غلظت صد میکروگرم در هر میلی‌لیتر در داخل بافر فسفات تهیه و به‌کمک فیلتر (به‌اندازه ۰/۲ میکرومتر) استریل و در یخچال معمولی نگهداری شد. محلول آکریدین اورنج در موقع استفاده به غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسانده شد. آزمایشهای انجام شده بی‌ضرر بودن این میزان آکریدین اورنج را برای آمیب تأیید کردند.

قبل از آزمایش، آکانتامباکاستلانی در داخل فلاسکهای یکبار مصرف کشت سلولی محتوی محیط PYG که حاوی پروتون پپتون، عصاره مخمر و گلوکز است (۱۵)، کشت و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ سانتی‌گراد نگهداری شد تا یک لایهٔ سلولی در کف فلاسک تشکیل گردد. *L. pneumophila* روی محیط اختصاصی BCYE که محتوی بافر، چارکول، عصاره مخمر، ال سیستئین و فریک پیروفسفات است (۱۶)، کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد نگهداری شد و باکتری *E. coli* روی محیط لوریل آگار، کشت و در یخچال معمولی نگهداری شد.

برای آزمایش فاگوسیتوز، ابتدا لیزوزومهای آکانتامبا با آکریدین اورنج و مطابق روشهای قبل (۱۴) با اندکی تغییرات نشاندار شد. به این منظور، از لامل‌های مدور میکروسکوپی به قطر ۲۰ میلی‌متر استفاده شد. این لامل‌ها در ابتدا به‌وسیلهٔ اتانول ۹۰ درصد و آب مقطر تمیز و شسته شده و با شعله چراغ الکلی استریل شدند. آکانتامبا از داخل فلاسک جمع‌آوری شده و دومرتبه با بافر مخصوص آمیب (۱۳) شستشو داده شدند و در نهایت تعداد آنها حدود 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر بافر تعیین گردید. میزان آمیبهای زنده به‌وسیلهٔ رنگ تریپان‌بلو تعیین شد که در این مرحله بیش از ۹۵ درصد بود. مقدار صد میکرولیتر سوسپانسیون آمیب روی هر لامل قرار گرفت و پس از آن لامل‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ سانتی‌گراد قرار داده شدند تا آکانتامباها فرصت یابند خود را به سطح لامل بچسبانند. در این موقع مایع اضافی به آرامی جمع‌آوری و سلولهای موجود روی لامل‌ها با بافر شسته شدند. بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر محلول آکریدین اورنج (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) روی هر لامل ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن محلول آکریدین اورنج از روی سطح لامل‌ها جمع‌آوری و لامل‌ها با بافر شستشو داده شده و در نهایت به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در داخل محیط PYG قرار گرفتند تا آکریدین اورنج موجود در سطح سلولها جذب شده و به‌خوبی لیزوزومهای آن را نشاندار کند. پس از این مرحله یکبار دیگر لامل‌ها با بافر شسته و بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون محتوی 10^7 در میلی‌لیتر از *L. pneumophila* یا *E. coli* بر روی آکانتامباهای موجود روی لامل منتقل و سپس کلیهٔ لامل‌ها به‌منظور ایجاد تماس نزدیکتر بین باکتری و سطح آمیب به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰×g و در دمای ۴ سانتی‌گراد سانتریفوژ (Beckman) شدند. به این منظور کلیه لامل‌ها در کف حفره‌های پلیتهای ۴۸ حفره‌ای قرار گرفته و سپس این پلیتها با استفاده از هد مخصوص سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ، مایع اضافی از روی لامل‌ها جمع‌آوری و هر کدام از آنها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر نیم‌گرم شسته شدند. کلیه لامل‌ها سپس در داخل حفره‌های پلیت کشت سلولی قرار گرفته و بعد از اینکه حدود یک میلی‌لیتر بافر روی سطح هر

کدام ریخته شد، به‌مدت ۴ ساعت در دمای °۲۰، °۳۰ و °۳۷ سانتی‌گراد قرار داده شدند تا فاگوسیتوز انجام گیرد. در پایان بافر از روی لامل‌ها جمع‌آوری و یک بار نیز با بافر نیمه گرم شستشو داده شدند. در این موقع کلیه لامل‌ها در جریان هوای آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند. پس از کشتن باکتریهای موجود در سطح آنها به کمک اشعه اولتراویوله، بر روی لامل‌های میکروسکوپی قرار گرفته و بلافاصله با میکروسکوپ فلورسنت زایس مجهز به لامپ جیوه‌ای و فیلترهای مخصوص آزمایش شدند. در هر لام حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی آزمایش و در مجموع بیش از ۱۰۰ باکتری داخل سلولی شمارش گردید. باکتریهایی که به رنگ نارنجی پر رنگ متمایل به قرمز بودند به‌عنوان نمونه مثبت (اتصال لیزوزوم به فاگوزوم) و باکتریهایی که دارای رنگ زرد کمرنگ متمایل به سبز بودند به‌عنوان نمونه منفی شمارش شدند. به موازات آزمایش اصلی و به‌منظور بررسی فعالیت بیگانه‌خواری در آکانتامبا، بدون آنکه آمیب نشاندار شود به همان نحو با لژیونلا و ایشرشیاکلی مجاور شدند. پس از پایان زمان تماس لامل‌های حامل میکروارگانیسمها ثابت شده و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری ارگانیسمهای فاگوسیت شده شمارش شدند (شکل ۱).



شکل ۱: این تصویر لژیونلا پنوموفیلای فاگوسیت شده توسط آکانتامبا کاستلانی را با میکروسکوپ فاز کنتراست نشان می‌دهد. پیکان بزرگ نمایانگر ترووفوزوئیت آمیب و پیکان کوچک نشان‌دهندهٔ لژیونلاها در داخل آمیب است (بزرگنمایی ×۷۵۰).

اندکس اتصال فاگوزوم به لیزوزوم (FI)[1] در هر نمونه از طریق ضرب نمودن موارد مثبت هر نمونه در تعداد متوسط فاگوزومهای متصل شده در همان نمونه محاسبه شد. اندکس فاگوسیتوز (PI)[2] نیز با ضرب کردن درصد تعداد باکتریهای فاگوسیت شده در تعداد متوسط باکتری در هر سلول و در نمونه موردنظر به‌دست آمد (۲۳).

یافته‌ها

به‌طور کلی به موازات افزایش دما، بر فعالیت ریزه‌خواری آمیب نیز افزوده شده است (جدول ۱). این امر را می‌توان به این صورت توجیه نمود که در دماهای پایین (°۲۰ و °۳۰ سانتی‌گراد) تنها آمیب فعال بوده ولی هرچه دما افزایش یافته (°۳۷ سانتی‌گراد) بر فعالیت باکتری نیز افزوده شده است. از سوی دیگر؛ در این میان چون قدرت هجوم لژیونلا (بیماری‌زا) بیش از کلیفرم بوده، احتمالاً فعالیت خود باکتری نیز در افزایش اندکس فاگوسیتوز نقش داشته است. به‌منظور مشاهده فعالیت ریزه‌خواری آکانتامبا در مواجه با ذرات غیربیولوژیک از ذرات لاتکس نشاندار شده با ماده ایزوتوپسیانات استفاده شد (شکل A-۲). چنانچه اندکس فعالیت فاگوسیتوز در آکانتامبا کاستلانی نشان می‌دهد (جدول ۱)، قدرت ریزه‌خواری آمیب، وقتی که *L. pneumophila* در دسترسش بوده نسبت به زمانی که *E. coli* در اختیارش بوده افزایش یافته است (شکل B-۲ و C-۲).

جدول ۱: اندکس اتصال فاگوزوم - لیزوزوم (FI) و فاگوسیتوز (PI) در آکانتامبا کاستلانی در حین فعالیت فاگوسیتوز

	Fusion Index (FI)				Phagocytosis Index (PI)			
	L. pneumophila		*E. coli*		*L. pneumophila*		*E. coli*	
°C	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M
۲۲	۸/۲	۲/۸	۱۹/۲	۵/۹	۱۲/۴	۱/۲	۲/۷	۰/۸
۲۰	۳/۲	۲/۶	۱۷/۱	۳/۹	۱۸/۹	۲/۷	۱۰/۳	۲/۰
۳۷	۲۸/۲	۷/۴	۱۵۲	۱۷/۲	۱۲۸/۲	۸/۵	۱۲۹/۴	۱۳/۷

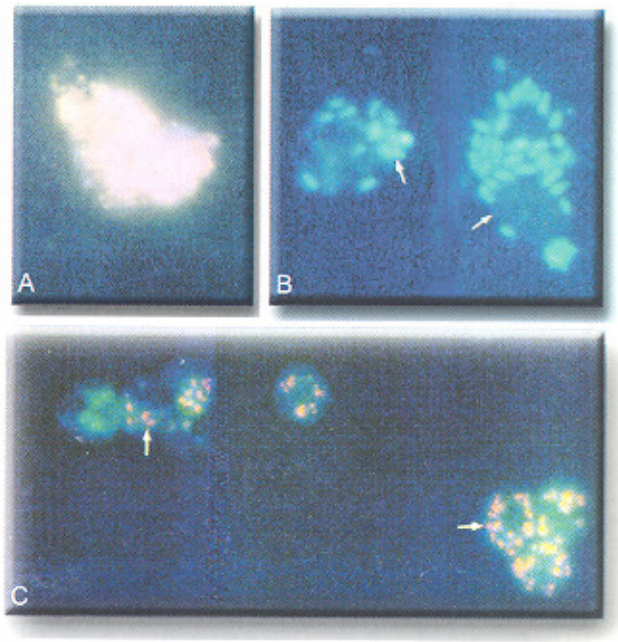
مقایسه اندکسهای اتصال در دماهای مختلف نشان می‌دهد که اولاً این اندکس در آمیبهایی که محتوی *L. pneumophila* بودند در مقایسه با آمیبهای محتوی *E. coli* کمتر است. به همین ترتیب اندکس مذکور، در دمای °۳۰ سانتی‌گراد بیشتر از °۲۰ سانتی‌گراد، و در °۳۷ بیشتر از °۳۰ سانتی‌گراد است. به بیان دیگر؛ باکتری در دمای °۳۷ سانتی‌گراد بیشتر توانسته از اتصال فاگو - لیزوزوم ممانعت کند و به همین ترتیب در دماهای پایین‌تر قدرت باکتری‌کشی آمیب ملموس‌تر است. لیزوزومهای نشاندار شدهٔ آکانتامبا را با آکریدین اورنج در شکل ۳ مشاهده می‌کنیم. تغییر رنگ این لیزوزومها مربوط به pHهای متفاوت داخل آنها است که خود بیانگر اتصال یا عدم اتصالشان به فاگوزوم است. همچنین آمیبهایی که در جریان خشک شدن و مواجه با اشعه اولترویوله کشته شده‌اند، به رنگ زرد یکنواخت در همین تصویر دیده می‌شوند. در شکل B-۲ لژیونلاهای داخل سلولی را به رنگ سبز کمرنگ مشاهده می‌کنیم که دلیل بر ممانعت آنها از اتصال فاگو - لیزوزوم آمیب می‌باشد. در مقابل باکتری ایشرشیاکلی به‌صورت میله‌های کوچک قرمز رنگ در داخل فاگوزوم آمیب دیده می‌شوند (شکل C-۲). این رنگ باکتری در داخل سلول میزبان، دلیلی است بر اینکه فاگوزومی که آن را احاطه کرده به لیزوزومهای سلول متصل شده است.

1. Fusion Index
2. Phagocytosis Index

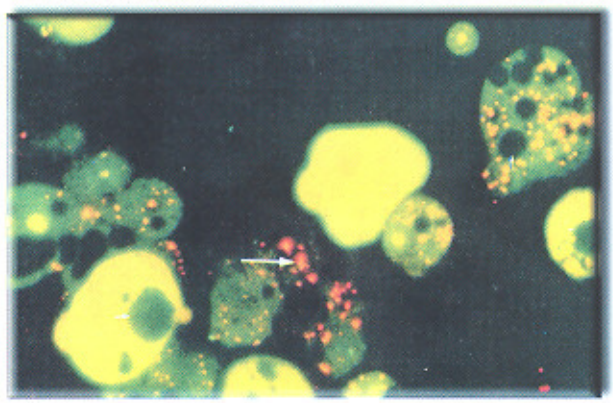
بحث

بعضی از میکروارگانیسم‌های داخل سلولی مثل مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، کلامیدیا پسی‌تاسی و انسفالیتوزوم کونیکولی پس از بلعیده شدن توسط ماکروفاژهای پستانداران مانع از اتصال لیزوزومها به فاگوزوم سلول شده و از این طریق بر مکانیسم‌های ضدحیات داخل سلول میزبان فائق می‌آیند (۱۱، ۱۷). لژیونلا پنوموفیلا که یک باکتری داخل سلولی اختیاری است از طریق ممانعت از اتصال فاگوزوم لیزوزوم بر ماکروفاژها و منوسیتهای انسانی چیره می‌شود (۱۱) و در این مطالعه معلوم شد که باکتری موردنظر همین مکانیسم را برای تکثیر در داخل آکانتامبا به‌کار می‌برد و شاید بتوان ممانعت از اتصال فاگو ـ لیزوزوم را حداقل یکی از تاکتیکهای زندگی داخل سلولی لژیونلا در داخل تک‌یاخته‌های محیط زیست قلمدادکرد. فاگوسیتوز در میان تک‌یاخته‌های آزاد به‌عنوان یک فرآیند طبیعی و بیشتر به‌منظور تغذیه و تأمین انرژی انجام می‌شود ولی در عین حال مکانیسم‌های دفاعی و باکتری‌کشی این پدیده در میان این گروه از میکروارگانیسم‌ها قوی و قابل توجه است (۱۸). با این وجود بعضی از باکتریها به‌خوبی خود را با شرایط داخل سلولی وفق داده و به زندگی ادامه می‌دهند. زندگی داخل آمیبی نیز آثار زیادی بر روی لژیونلا باقی می‌گذارد از جمله اینکه باکتری متعاقب زندگی داخل سلولی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد کرده (۱۹) یا قدرت بیماری‌زایی آن افزایش می‌یابد (۲۰). همچنین لژیونلاهای داخل سلولی (در آمیب) روی محیط کشت رشد نمی‌کنند و مشکلاتی را در تشخیص به‌وجود می‌آورند (۲۱) و تنها با استفاده از روشهای PCR و DNA پروب می‌توان به وجودشان پی برد (۲۲). تاکنون چندین روش برای اتصال فاگوزوم ـ لیزوزوم پیشنهاد شده است که می‌توان به‌کاربرد میکروسکوپ الکترونی در ردیابی بعضی از نشانگرهای لیزوزومی مثل اسیدفسفاتاز در واکوئل‌های سلول میزبان اشاره کرد. ولی ردیابی لیزوزومها با استفاده از نشانگرهای فلورسنت، کاربرد وسیعتری پیداکرده است (۲۳). در این مطالعه از آکریدین اورنج که یک نشانگر فلورسنت لیزوزوم بوده و نسبت به تغییر داخل سلولی حساسیت خوبی دارد (۲۴)، با اعمال برخی تغییرات استفاده شده است.

به‌طور کلی اندکس فاگوسیتوز آکانتامبا نسبت *L. pneumophila* و *E. coli* تقریباً شبیه و در هر دو نسبتاً بالاست. در مورد کلیفرم تقریباً مقاومت و ممانعت زیادی در مقابل اتصال فاگو ـ لیزوزوم صورت نگرفت و شاید به همین دلیل باکتری پس از مدت کمی در داخل واکوئل آمیب از بین رفته است. یافته‌های آزمایشگاهی نیز این واقعیت را تأیید می‌نمایند؛ چراکه *E. coli* در آزمایشگاه طعمه غذایی دلخواه آکانتامبا را تشکیل می‌دهد ولی در مورد *L. pneumophila* این‌طور نبوده و باکتریهای فاگوسیت شده تا مدتها پس از بلعیده شدن (در شرایط آزمایشگاهی) در بدن آمیب زنده می‌ماند.



شکل ۲: A: این تصویر، ذرات لاتکس نشاندار شده با فلورسئین را پس از آنکه توسط آمیب فاگوسیت شدند به رنگ سفید درخشنده در زمینه آبی نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۲۰۰×). B: *L. pneumophila* در داخل فاگوسیت آمیبی که قبلاً با آکریدین اورنج نشاندار شده است به‌صورت باسیل‌های با رنگ زرد مایل به سبز در زمینهٔ آبی تاریک دیده می‌شوند و پیکانها باکتریهای داخل سلولی را مشخص کرده‌اند (بزرگنمایی ۴۰۰×). C: *E. coli* در داخل فاگوسیت آمیبی که قبلاً با آکریدین اورنج نشاندار شده است به‌صورت اجسامی به‌رنگ میخکی در زمینه آبی رنگ دیده می‌شوند (بزرگنمایی ۱۳۰×).



شکل ۳: نروفوزومهای آکانتامبا کاستلانی که با آکریدین اورنج نشاندار شده‌اند. لیزوزومهای آمیب به‌صورت عناصر مدور و به رنگ قرمز پررنگ دیده می‌شوند. پس از اتصال به فاگوزوم، به رنگ زرد متمایل به نارنجی درمی‌آیند. پیکان بزرگ لیزوزومهای نشاندار شده آمیب و پیکان کوچک واکوئل انقباضی آمیب را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۶۸۰۰×).

References

1. Victor Y: Legionella pneumophila. In principles and practice of infection disease, Mandell M, Bannett Y, Dolin R (eds). London, Churchill Livingston, 1995, pp 2087-2093

2. McDade EJ: Legionellaes' disease, isolation of bacterium and demonstration of its role in other

2. McDade EJ: Legionellaes' disease, isolation of bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. New Engl J Med 1977; 297: 1197-1203
3. Paszko-Kolva C, Shahamat M, Colwell R: Long-term survival of L. pneumophila serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. FEMS Microb Eco 1992; 102: 45-55
4. Blatt P, Dolani J, Hendrix W, Melcher P: Legionnaries' disease in human immunodeficiency virus infected patients. Clin Infect Dis 1994; 18(2): 227-232
5. Dowling J, Saha A, Glew R: Virulence factors of the family Legionellacea. Microbiology Review 1992; 56(1): 32-60
6. Henk M, Seidel M: Association between L. pneumophila and Amoeba in water. Israel J Med 1986; 22: 690-695
7. Rodriguez S: Ecology of free-living amoebae. Critical Review Microbiology 1994; 20(3): 225-241
8. Rowbotham T: Preliminary reprot on the pathogenicity of L. pneumophila for fresh-water and soil amoebae. J Clin Path 1980; 33: 1129-1183
9. Housong D, Colwell R, O'Brein M, Weiss E, Pearson A, Weinner R, Burge W: Viable L. pneumophia not detectable by culture on agar media. Biotechnology 1987; 5: 947-950
10. Moulder J: Comperative Biology of intracellular parasitism. Microbilogical Reviews 1985; 94(3): 298-337
11. Horwitz M: The legionnaires' disease bacterium (L. pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J Exp Med 1983; 158: 2108-2126
12. patterson W, Seal D, Curran E, Siclare T, Mc Luckei J: Fatal nosocomial legionnaries' disease: Relavance of contamination of hospital water supply by temperature dependent buoyancy-deriven flow from spur pipes. Epidemiology & Infections 1994; 112: 513-525
13. Hay J, Kirkness C, Seal D, Wright P: Drug resistance and Acanthamoeba keratitis, the quest for alternative anti protozoa chemotherapy. Eye 1994; 8: 555-563
14. Taylor M, Espinosa M, Iturbe R, Rico B, Casasola J, Goodsaid F: Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with histoplasma capsulatum. Clin Exp Immun 1989; 75: 466-470
15. Page F: A new key to fresh water and soil gymnamoebae with instructions for culture. Ambleside Uk: Fresh water Biological Association. The Ferry House, 1988, pp 16-19
16. Harrison T, Tylor A: A laboratory manual for legionella. J Willey, S Chiester (eds). 1989; pp 73-84
17. Horwitz M: Formation of a novel phagosome by the legionnaires' disease bacterium in human monocytes. J Exp Med 1983; 158: 1319-1331
18. Weekers H, Engelberts M, Vogels D: Bacteriolytic activities of the freeliving soil amoeba, A. castellanii and Hartmanella vermiformis. Antonie-Van-Leeuwnhoek 1995; 68(3); 237-243
19. Barker J, Scaife H, Brown R: Intraphagocytic grown induces an antibiotic resistanct phenotype of L. pneumophila. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1995; 39(12): 2684-2688
20. Cirllo D, Falkow S, Tompkins S: Grwoth of legionella in Acanthamobea enhaces invasion of legionella. Infection and Immunity 1994; 62(8): 3254-3261
21. Barer M, Gribbon L, Hearwood C, Nwoguh C: The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology: Rev Med Microb 1993; 4: 183-191
22. Hay J, Seal D, Billclifee B, Freer J: Non-culturable L. pneumophila associated with A. castllanii: Detection of the bacterium using DNA amplification and hybridization. J Appl Bact 1995; 78; 61-65
23. Kielian M: Assay of phagosome-lysosome fusion. Methods in Enzymology 1986; 132: 257-262
24. Ishibashi Y, Yamashita T: Effect of phagocytosis stimulating factor on the phagocytic process of polymorphonuclear neutrophils. Infection and Immunity 1982; 38(3): 825-833