افزایش رشد لژیونلا پنوموفیلا در مجاورت کشت آکانتامبا

سیدرضا حسینی‌دوست Ph.D.☆♁، اشرف محبتی مبارز M.Sc.★

☆ دانشگاه بقیةا...، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، صندوق پستی ۱۱۳۶۵/۶۷۷۷

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتریولوژی

♁آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۶۷۷۷-۱۱۳۶۵، دانشگاه بقیةا...، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

چکیده

* **هدف:** حساسیت نسبتاً پایین محیط کشت لژیونلا باعث عدم تشخیص آلودگی در برخی از نمونه‌های در واقع مثبت شده و در نتیجه برخی از نمونه‌ها به‌طور کاذب منفی می‌گردند. از این رو پیدا نمودن طریقه‌ای برای افزایش محیط کشت لازم به‌نظر می‌رسد. در این تحقیق تأثیر غنی‌سازی نمونه‌های منفی با آکانتامبا بر روی حساسیت کشت بررسی شد.

* **مواد و روشها:** کلیه نمونه‌ها قبلاً دو مرتبه با استفاده از روش استاندارد آزمایش و نتیجه‌گیری آنها منفی گزارش شده بود. این نمونه‌ها با استفاده از آکانتامبا کاستلانی غنی‌سازی و مجدداً روی محیط اختصاصی تقویت شده با ال‌سیستئین کشت داده شدند. پس از انجام غنی‌سازی، نمونه‌های مثبت با آزمایشهای باکتریولوژیک و بیوشیمیایی تأیید و گروه‌بندی سوشهای لژیونلا به کمک ایمونوفلورسانس آگلوتیناسیون لاتکس و RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) مشخص شد.

* **یافته‌ها:** از حدود ۱۶ درصد نمونه‌هایی که پس از کشت استاندارد، منفی بودند لژیونلاپنوموفیلا جدا شد. آزمایشهای تأییدی معلوم کرد که همگی سوشها به لژیونلاپنوموفیلا اختصاص داشتند. آزمایشهای تکمیلی معلوم نمود که اگر چه همگی سوشها، لژیونلاپنوموفیلا بودند؛ ولی از نظر سروتایپ به گروههای متفاوت تعلق داشتند.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج فوق نشانگر این امر هستند که لژیونلاهای موجود در نمونه‌های مورد نظر که به علت کم بودن تعداد یا علل دیگر قادر به رشد روی محیط نبودند، با اضافه شدن آکانتامبا به سرعت آن را آلوده و در آن تکثیر کردند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در آزمایشگاههای تخصصی لژیونلا، نمونه‌های منفی یک‌بار دیگر پس از هم‌کشتی با آکانتامبا کشت داده شوند.

کل واژگان: لژیونلا پنوموفیلا، غنی‌سازی، آکانتامبا کاستلانی، RFLP

مقدمه

لژیونلاها یک باسیل گرام منفی است که دو بیماری لژیونر و تب پونتیاک در رابطه با آن شناخته شده‌اند. اولی پنومونی غیرتیپیک و خطرناک بوده و از بیشتر نقاط دنیا گزارش شده است. این بیماری از طریق کولرهای آبی ایجاد می‌شود (۱). تاکنون بیش از ۳۴ گونه لژیونلا شناسایی شده و ارتباط حداقل ۱۸ گونه از آنها با لژیونلوز ثابت شده است (۲). به‌طور کلی لژیونلا یک باکتری داخل سلولی اختیاری است که در منابع مختلف آبهای محیطی به فراوانی یافت شده و قادر است تحت شرایط کاملاً نامساعد به‌راحتی زندگی خود را ادامه داده و انسان را آلوده کند (۳). انسان از طریق استنشاق قطرات ریز (آئروسل) موجود در آبهای آلوده که توسط وسایل خنک‌کننده آبی در فضا پراکنده شده‌اند مبتلا می‌شود (۴). لژیونلاها در مخازن آبهای طبیعی و نیز در سیستمهای آب شهری شایع بوده و لژیونلوز از طریق آئروسلهای ایجاد شده از این آبها به انسان منتقل می‌شوند.

عمده‌ترین کانونهای انتشار لژیونلوز عبارتند از: دستگاههای تهویه مطبوع، کولرهای آبی (۵)، چشمه‌های آب معدنی، دوشهای حمام، سیستمهای لوله‌کشی آب سرد و گرم اماکن مسکونی تجاری و بیمارستانها (۶)، افراد پیر و سالخورده، معتادان به الکل و مواد مخدر (۷)، بیماران مبتلا به اختلالات نقص ایمنی (۸) و نیز بیماران دریافت‌کننده اعضا بیش از سایرین مورد تهدید جدی عفونتهای لژیونلوز هستند. با توجه به اینکه انتقال مستقیم انسان به انسان تاکنون گزارش نشده، بنابراین قطع زنجیره انتقال این عفونت اغلب بر اساس شناسایی کانونهای اپیدمیولوژیک و نابودی آنها متمرکز شده است. از طرفی، شناسایی کانونهای عفونت بیماری مستلزم شناسایی گونه‌های مختلف لژیونلا در نمونه‌های محیطی است.

این باکتری در طبیعت نیز از بعضی تک یاخته‌های آزاد برای زندگی داخل سلولی و حفاظت خود در مقابل شرایط نامساعد محیط و ترکیبات باکتریوساید استفاده می‌کند (۹). به‌طور طبیعی بسیاری از پروتوزوئرها و آمیبهای آزاد، باکتریها را به عنوان مواد غذایی استفاده می‌کنند (۱۰)، در عین حال بعضی از باکتریهای بیماریزا از جمله لژیونلاها پس از ورود به سلول میزبان، از آن برای تکثیر داخل سلولی و مقاومت در برابر مواد باکتری‌کش استفاده می‌کنند. لژیونلا پنوموفیلا عملاً می‌تواند در داخل آمیب میزبان تکثیر کرده و زندگی آنرا مختل نماید. یافته‌های تحقیقاتی حاکی از این هستند که گروهی از تک یاخته‌ها و آمیبهای آزاد عملاً نقش مخزن را در عفونتهای لژیونلایی بازی می‌کنند (۱۱). نکته جالب‌تر اینکه پس از کاهش بیماریزایی لژیونلا در آزمایشگاه در نتیجهٔ پاساژهای متوالی، باکتری بر اثر زندگی داخل سلولی بیماریزایی خود را باز می‌یابد (۱۲). علیرغم پیدایش روشهای تشخیصی دیگر، روش کشت در دسترس‌ترین، اقتصادی‌ترین و مطمئن‌ترین روش موجود برای گونه‌های مختلف لژیونلا در نمونه‌های کلینیکی و نمونه‌های محیطی است (۱۳). حساسیت روش کشت تحت تأثیر عوامل مختلفی مثل تعداد اندک باکتری موجود در نمونه یا وجود باکتریهای غیر قابل رشد، محدود بوده (۸۰-۶۵ درصد) و تلاشهای زیادی برای رفع این محدودیت به‌عمل آمده است (۱۴). علیرغم این مزایا، کشت لژیونلا متأسفانه با محدودیتهایی همراه بوده که بعضی از آنها هنوز باقی هستند. خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک این باکتری مثل دیر رشد بودن، نیازهای پیچیده غذایی حضور و باکتریهای مزاحم در نمونه از جمله مشکلاتی هستند که در حال حاضر با روشهای جدید و عرضه محیطهای کشت اختصاصی برطرف شده‌اند (۱۵). در عین حال، وجود لژیونلاهایی که زنده ولی غیرقابل کشت هستند (۱۶) و نیز تعداد ناکافی باکتری در نمونه، از جمله مشکلاتی هستند که راه‌حلهای مناسبی را می‌طلبند. به هر حال لزوم نظارت دایمی بر انتشار لژیونلوز و نیز کنترل عفونتهای لژیونلا ایجاب می‌کند که روشهای تشخیصی موجود با رفع تدریجی تنگناهای مربوطه بهینه شوند. این تحقیق با هدف ارزشیابی اثر هم‌کشتی آکانتامبا بر روی غنی‌سازی نمونه‌های مشکوک به لژیونلا طراحی و انجام شد.

مواد و روشها

نمونه‌های مورد آزمایش طی یک بررسی اپیدمیولوژی از شبکه آبرسانی داخلی بیمارستانهای مختلف تهیه شده و تا زمان آزمایش در یخچال معمولی نگهداری شدند. همچنین نمونه‌ها با استفاده از محیط کشت استاندارد لژیونلا، BCYE[1] (۱۷)، کشت و نمونه‌های مثبت از بقیه جدا شدند. نمونه‌های منفی از نظر آلودگی به آکانتامباها نیز آزمایش (۱۸) و نمونه‌هایی که از آنها یک یا چند گونه آکانتامبا جدا شده بود برای این تحقیق برگزیده شدند. از گونه‌های آکانتامبای جدا شده، کشت آگزنیک تهیه (۱۹) و در ازت مایع نگهداری شد. در زمان آزمایش گونه‌های آکانتامبا از نظر آلودگیهای قارچی و باکتریایی بررسی و سپس در محیط PYG[2] به میزان دلخواه تکثیر شدند. حدود ۵ میلی‌لیتر از هر نمونهٔ اصلی آب، جدا و درون فلاسک کشت سلولی جای گرفت و به مدت یک‌ساعت در دمای ۳۰° سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس تروفوزوئیت آکانتامباهای مربوط به نمونه، شمارش شده و غلظت تقریبی آنها در حد ۱۰۰۰-۱۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر بافر مخصوص آکانتامبا[3] (۱۸) تنظیم شد. پس از گذشت یک ساعت از گرمخانه‌گذاری، نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون محتوی آکانتامبا به هر یک از فلاسکهای محتوی هر نمونه اضافه و همه فلاسکها به‌مدت یک‌هفته در دمای ۳۰° سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از چهار هفته گرمخانه‌گذاری هر فلاسک به‌مدت ۵ دقیقه روی شیکر تکان داده و سپس از هر نمونه، صد میکرولیتر بر روی محیط کشت BCYE آگار غنی شده (۱)، کشت داده شد. کلیه پلیتها به‌مدت چهارده روز در دمای ۳۷° سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد گازکربنیک، گرمخانه‌گذاری شده و از روز سوم، رشد لژیونلا کنترل شد. کلنیهای رشد کرده با توجه به خصوصیات آنها شناسایی و تا انجام آزمایشهای تکمیلی برای تعیین هویت نگهداری شدند.

پس از انجام آزمایشهای بیوشیمیایی روی نمونه‌های جدا شده و تأیید اولیه آنها، آزمایشهای تأییدی شامل فلورسنت آنتی‌بادی،

1. Buffered Charcoal Yeast Extract agar
2. Pepton Yeast Extract
3. Amoebae Saline

آگلوتیناسیون RFLP و انجام شد. برای تیپ‌بندی RFLP ابتدا DNA هر نمونه لژیونلا موردنظر با استفاده از روشهای استاندارد (۲۱) جدا شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به هر نمونه DNA اضافه و در حرارت ۶۵° سانتی‌گراد به‌صورت محلول درآمد. غلظت DNA موجود از طریق جذب UV تعیین شد. برای انجام RFLP، پروب نشاندار شده IMVS65 با Digoxigenin طبق روشهای قبلی (۲۲) استفاده شد. برای آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس طبق راهنمای همراه کیت عمل شد: ابتدا یک قطره سالین ایزوتونیک داخل حفره لام میکرواسکرین قرار گرفت. سپس با لوپ، مقداری از یک کلونی لژیونلا از روی محیط برداشته و در داخل قطره سالین مخلوط و به‌حالت امولسیون در آورده شد. بعد از حدود ۳۰ ثانیه یک‌قطره از معرف مخصوص لاتکس بر روی امولسیون فوق قرار گرفته و به‌خوبی مخلوط شد. با تکان ملایم لام، پس از مدت کمی چنانچه نمونه مثبت بود، آگلوتیناسیون مشاهده می‌شد.

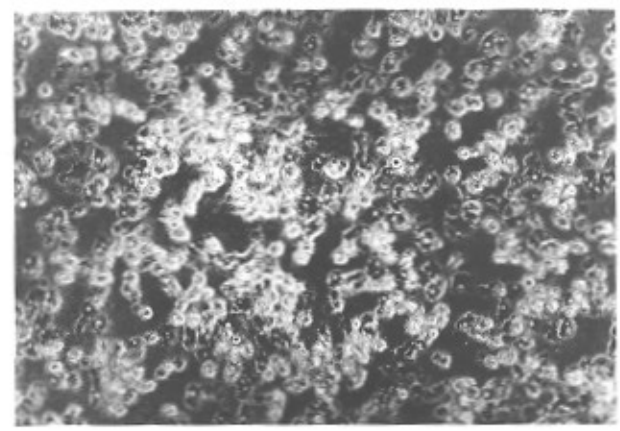
یافته‌ها

۱۳۸ نمونه آب که طی یک مطالعه همه‌گیرشناسی از بیمارستانهای مختلف جمع‌آوری شده بود، با استفاده از روش کشت از نظر لژیونلا و آکانتامبا آزمایش شدند. ۳۷ نمونه که از نظر لژیونلا منفی ولی آکانتامبا از آنها جدا شده بود، برای این تحقیق در نظرگرفته‌شدند (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج اولیه غربالگری نمونه‌ها بر اساس آلودگی به لژیونلا و آکانتامبا

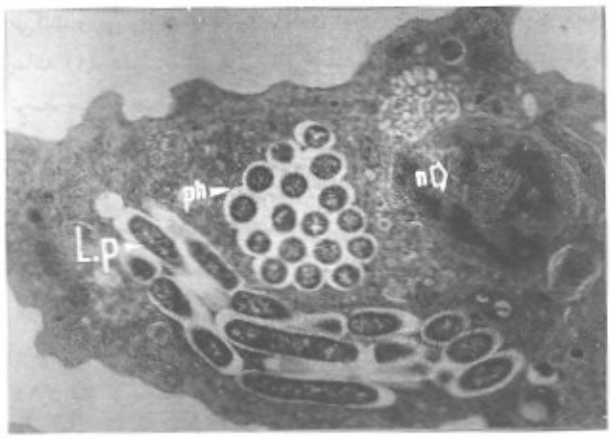
نمونه‌ها	فراوانی	
	تعداد	درصد
آمیب مثبت، لژیونلا مثبت	۲۷	۲۰
آمیب مثبت، لژیونلا منفی	۳۷	۲۶
آمیب منفی، لژیونلا مثبت	۴	۳
آمیب منفی، لژیونلا منفی	۷۰	۵۱

لژیونلا در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی می‌تواند به‌راحتی آکانتامباها و بعضی دیگر از تک یاخته‌های آزاد داخل آب را آلوده کرده و در آنها تکثیر کند. در شکل ۱، هم‌کشتی لژیونلا پنوموفیلا و آکانتامبا پس از ۴۸ ساعت مشاهده می‌شود.



شکل ۱: هم‌کشتی لژیونلا پنوموفیلا و آکانتامبا کاستلانی در فلاسک کشت سلولی در ۳۰° سانتی‌گراد (بزرگنمایی ۱۸۰۰x)

پس از یک هفته، حرکت سریع لژیونلاهای داخل سلولی حتی با میکروسکوپ نوری (شکل ۱) نیز قابل مشاهده بود ولی تصویر میکروسکپ الکترونی این منظره را بهتر نشان می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی از یک آکانتامبای آلوده با لژیونلا
در این آمیب دو فاگوزوم با بیش از ۱۰ باکتری دیده می‌شوند (بزرگنمایی ۲۵۰۰۰x)

از میان ۲۷ نمونه که با این روش تیمار و با آکانتامبا هم‌کشت شدند، شش نمونه (۱۶ درصد) پس از کشت مجدد مثبت شده و لژیونلا پنوموفیلا از آنها جدا شد.

سوشهای جدا شده با روش فلورسنت مستقیم و آگلوتیناسیون تأیید و سپس با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال و آنتی‌سرم اختصاصی تیپ‌بندی و گروه‌بندی شدند و به‌منظور تأیید عدم آلودگی نمونه‌ها در خلال آزمایشها، کلیه نمونه‌های لژیونلا با کمک آزمایشگاه رفرانس تحت آزمایش RFLP قرار گرفتند و معلوم شد که استرینهای جداشده از نظر منشا متعدد بوده و احتمال آلودگی منتفی است (جدول ۲).

جدول ۲: خصوصیات سوشهای جدا شده پس از غنی سازی نمونه‌ها

نمونه	RFLP	آگلوتیناسیون	سرو گروپ	سرو تایپ
LP اول	۱۵	۱	۱	Benidorm
LP دوم	۳۷	۱	۱	Olgal axford
LP سوم	۱۳	۲-۱۲ (+ قوی)	۲/۴/۱۰/۱۴	ND
LP چهارم	NRP	۱	۱	Belingham
LP پنجم	۱۳	۲-۱۲ (+ ضعیف)	۲/۴/۱۰/۱۴	ND
LP ششم	۱۵	۱	۱	Belingham

ND: آزمایش به دلایلی انجام نشد. NRP: باندی مشاهده نشد

در کشت اولیه، وجود لژیونلا تنها در ۲۲ درصد نمونه‌ها گزارش شد؛ حال آنکه با استفاده از این هم‌کشتی امکان تشخیص باکتری در ۲۷ درصد نمونه‌های اولیه و ۱۹ درصد کل نمونه‌های آزمایش شده، تشخیص داده شد. از طرف دیگر، انواع مختلفی از آمیبهای آزاد در ۴۶ درصد نمونه‌ها مشاهده شد. در ۲۶ درصد نمونه‌ها که آکانتامبا مشاهده شده بود، روش هم‌کشتی استفاده شد که در نتیجه منجر به تشخیص لژیونلا پنوموفیلا در ۶ نمونه دیگر شد. به‌عبارت دیگر، در این آزمایش با استفاده از روش غنی سازی (هم‌کشتی) نمونه‌ها، حداقل ۵ درصد به حساسیت روش کشت افزوده شد.

بحث

مطالعات باکتریولوژی و اپیدمیولوژی نشان دهنده آن است که گونه‌های مختلف لژیونلا در محیطهای مرطوب و منابع آب زندگی می‌کنند و می‌توانند در آئروسل‌های ایجاد شده از این آبها زنده بمانند (۱). عفونت لژیونلوز زمانی اتفاق می‌افتد که آئروسلهای آلوده توسط میزبان حساس استنشاق شود؛ ضمناً هنوز انتقال مستقیم این عفونت از فرد بیمار به اشخاص سالم گزارش نشده است (۲۳). بنابراین کنترل و پیشگیری از این بیماری مستلزم یافتن کانونهای زندگی لژیونلا است. علیرغم روشهای تشخیصی جدید مثل PCR[1]، هنوز اختصاصی‌ترین و اقتصادی‌ترین روش تشخیص موجود (۲۵) برای گونه‌های لژیونلا، کشت نمونه‌ها است؛ هرچند متأسفانه به‌اندازه کافی حساس نیست (۲۳). با توجه به تکثیر داخل آمیبی لژیونلا (۲۴)، حدود ۶۵ درصد از محققین پیشنهاد کردند که از آمیبهای آزاد برای بازیافت لژیونلا در نمونه‌های آب استفاده شود و سپس از آکانتامبا پلی فاژ برای بازیافت موفقیت‌آمیز لژیونلا پنوموفیلا استفاده شد (۹). در این تحقیق یک گونه دیگر آکانتامباها که لژیونلا در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند درون آن تکثیر کند (۱۱) برای غنی سازی نمونه‌ها به کار برده شد. انجام این تیمار مخصوص باعث شد که چندکانون اضافی لژیونلا که قبلاً ناشناخته مانده بود، شناسایی شود. البته در خلال این تحقیق به جز استرینهای مختلف لژیونلا، گونه‌های دیگر لژیونلا کشت نشدند. با این حال گونه‌های دیگر لژیونلا نیز در شرایط آزمایشگاهی می‌توانند آکانتامباکاستلانی را آلوده کرده و درون آن تکثیر کنند (۱).

در این تحقیق از آکانتامباهای به‌دست آمده از نمونه‌ها برای غنی‌سازی آنها استفاده شد ولی این مطلب که آیا هم‌کشتی نمونه‌ها با آکانتامباهای جدا شده از نمونه‌های دیگر نیز منجر به بازیافت لژیونلا می‌شود یا خیر؟ موضوعی است که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. با توجه به اینکه حدود ۵۴ درصد از نمونه‌ها فاقد آکانتامبا بوده و به همین دلیل آزمایشی روی آنها انجام نشد، به‌نظر می‌رسد چنانچه بتوانیم از آکانتامباهای رفرانس موجود در آزمایشگاه برای غنی سازی این نمونه‌ها استفاده کنیم شاید از برخی نمونه‌های دیگر که به طور طبیعی فاقد آمیبهای آزاد و به خصوص آکانتامباها هستند، نیز لژیونلا جدا شده و به این ترتیب باز هم به حساسیت کشت افزوده شود (۲۶). غلظت لژیونلا در نمونه‌های آب که فاقد آمیبهای آزاد هستند پس از مدتی کاهش یافت. این مشاهدات، فرضیه ازدیاد تعداد لژیونلا را تا سطح قابل کشت بر اثر هم‌کشتی با آکانتامباکاستلانی تقویت می‌کند. با توجه به اینکه این تغییر تنها در حضور آمیب انجام پذیرفت. بنابراین مقاومت لژیونلاها در برابر عملیات مختلف تصفیه آب و نیز تکثیر آنها در منابع آبی، با حضور آمیبهای آزاد ساکن در آن محیطها ارتباط دارد. نظر به اینکه این باکتری در شرایط آزمایشگاهی قادر به تکثیر در داخل بعضی از تاژکدان آزاد موجود در آب نیز هست؛ بنابراین این تاژکدان هم برای استفاده در هم کشتی پیشنهاد شده‌اند (۳). هدف ما در این تحقیق این بود که ببینیم آیا غنی‌سازی با استفاده از یک گونه به‌خصوص از آکانتامبا نیز نتیجه مطلوب حاصل می‌گردد و یا اینکه مخلوطی از چند گونه آمیب آزاد مناسب‌تر است. ضمن آنکه امکان استفاده از آکانتامباهایی که قبلاً به‌صورت آگزنیک تهیه شده و در آزمایشگاه نگهداری می‌شوند ایده‌آل خواهد بود. با توجه به شیوع گونه‌های آمیب‌های آزاد در نمونه‌های آب، شاید گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها قبل ازکشت راه کار خوبی برای غربالگری اولیه نمونه‌ها و جدا نمودن نمونه‌های منفی از نمونه‌های مثبت باشد. ولی برای استفاده از این راه‌کار در نمونه‌های بالینی و یا نمونه‌های آب فاقد هر گونه آمیب آزاد (و تک یاخته‌های دیگر)، به‌نظر می‌رسد معرفی گونه‌ای از آمیب‌های آزاد که بهترین نتیجه را در شرایط آزمایشگاهی حاصل کند ضروری است.

غنی سازی نمونه‌های آب با آکانتامبا، باعث افزایش حساسیت کشت گونه‌های مختلف لژیونلا خواهد بود. برای انجام این کار هیچ‌گونه به تجهیزات و موادی، به‌جز آنچه که معمولاً در آزمایشگاههای میکروبشناسی درگیر با لژیونلا موجود است نیاز نیست. کشت اولیه نمونه‌های آب برای تعیین وجود یا عدم وجود گونه‌هایی از آمیبهای آزاد می‌تواند راهنمای خوبی برای ادامه آزمایش باشد. چنانچه هیچ گونه آمیبی در نمونه‌ها مشاهده نشد، پیشنهاد می‌شود از آکانتامبا کاستلانی و یا گونه‌های دیگر آن برای غنی‌سازی نمونه‌ها استفاده شود. این روش هم‌کشتی می‌تواند باعث افزایش قابل توجه حساسیت کار در تحقیقات همه‌گیرشناسی لژیونلا شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تقدیر خود را از آزمایشگاه رفرانس لندن (کولیندل) برای مساعدت در تهیه سرو تایپ و آزمایش RFLP نمونه‌ها ابراز می‌دارند.

References

1. Rodgers FG: Legionellae in systematic bacteriology: Balows A, Duerden B, In Topley (eds). Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Coiller L, Balows A & Sussman M (eds), London, Arnold, 1998, pp 1148-1165

2. Victor Y: L. pneumophila (Leginnaires' disease) in: Principles and practice of Infection disease. by: Mandell M, Bennett J, Dolin R. Published by Churchill Livingston, London, 1995, pp 2087-2093

3. Barker J, Brown WM: Torjan horses of the microbial world protozoa the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology 1994; 140: 1253-1259

4. Alary M, Joly R: Factors contributing to the contamination of hospital water distribution system by legionellae. J Infect Dis 1992; 165: 565-569

1. Polymerase Chain Reaction

5. Alary M, Joly R: Risk factors for contamination of domestic hot water systems by legionellae. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 2360-2367
6. Hay J, Seal D: Surveying of legionnaires' disease bacterium. Current Opinion Infect Dis 1994; 7: 484-487
7. Almirant B, Tarragona J, Ferrer A: L. Pneumophila Pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection. Annal of Internal Med 1994; 11(1): 47-48
8. Bilat P, Dolani J, Hendrix W, Melcher P: Legionnaires' disease in human immunodeficiency virus infected patients. Clin Infect Dis 1994; 18(2): 227-232
9. Rowbotham TJ: Isolation of L. Pneumonia from clinical specimens via Amoeba and the interaction of those and other isolates with Amoebae. J Clin Pathol 1983; 36: 978-986
10. Thom S, Warhurst D, Sracar SB: Association of vibrio cholera with fresh water Amoeba. J Med Microbiol 1992; 36; 303-306
11. Paszko-K olva C, Shahamat M, Colwell R: Long-term survival of L. Pneumophila serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. FEMS Microbiol and Ecol 1992; 102: 45-55
12. Cirrilo DJ, Falkow S, Tompkins SL: Growth of L. Pneumophila in A. castellanii enhance Envision. Infect Immun 1994; 62(8): 3254-3261
13. Patterson W, Seal D, Curran E, Siclare T, Mc Luckei J: Fatal nosocomial legionnaires' disease: relavance of contamination of hospital water supply by temperature dependent buoyancy-deriven flow from spur pipes. Epidem Infect 1994; 112: 513-525
14. Maiwald M, Kissel K, Srimugang S, Doeberitz M, Sonntag H: Comparison of Polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellas in hospital samples. J Appl Bacteriol 1994; 76: 216-225
15. Edelstein H, Edelstein M: Comparison of different agars used in the formulation of buffered charcoal yeast extract medium. J Clin Microbiol 1991; 29: 190-191
16. Hay J, Seal D, Billclifee B, Free J: Non-culturable L. Pneumophila associated with A. castllanii: Detection of the bacterium using DNA amplification and hybridization. J Applied Bacteriol 1995; 78: 61-65
17. Hosseini Doust R, Seal LD: Isolation of legionnaires' disease bacterium from hospital water supplies. Kowsar Med J 1998; 3(3): 145-150
18. Barer M, Gribbon L, Harwood C, Nwoguh C: The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology. Rev Med Microbiol 1993; 4: 183-191
19. Page F: A new key to fresh water and soli gymnamoebae with instructions for culture. Ambleside UK. Fresh water Biological Association. The Ferry House, 1988
20. Hosseini Doust R: Free-Liviny amoebae in hospital water supplies. 2nd National congress of parasitic disease, October 19-22, Tehran, Iran, 1997
21. Own JR, Borman P: A rapid biochemichal method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for reaction enzyme analysis. Nucleic acid research 1987; 15(8): 3631-3635
22. Lanser J, Adams M, Doyle R, Hewitt P, Sangster N: Genetic Characterization of L. Pneumophila S1 Associated with respiratory disease in Australia. Appl Environ Microbiol 1992; 58(2): 706-708
23. Blatt P, Dolani J, Hendrix W, Melcher P: Legionnaires disease in human immunodeficiency virus infected patients. Clin Infect Dis 1994; 18(2): 227-232
24. Hosseini Doust R: Relationship of L. pneumophila and Free-living Amoebae. Kowsar Med J 1996; 1(1): 49-56
25. Allyssa A, Stoat S, Yu V, Wagener M: Comparison of culture methods for monitoring Leginella species in hospital water systems and recommendations of such methods. J Clin Microbiol 1995; 33(8): 2118-2123
26. Polmer C, Tsai Y, Paszko-Kolva C, Mayer C, Sangermano L: Detection of Legionella species in sewage and ocean wter by Polymerase chain reaction, direct fluorescent antibody, and plate culture methods. Appl Environ Microbiol 1993; 59(11): 3618-3624