

## 조직내 및 배양기내 자유생활아메바의 전자현미경적 비교연구

延世大學校 醫科大學 寄生蟲學教室

柳在淑·蘇鑣璋

漢陽大學校 醫科大學 寄生蟲學教室

任敬一

### 서론

*Naegleria fowleri*의 전자현미경적 관찰은 Carter (1970)가 인체 감염에서 분리한 *Naegleria fowleri*를 실험적으로 마우스에 감염시켜 얻은 뇌조직 부유액에서의 영양형의 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 이래 Martinez 등(1971)은 *N. fowleri*를 실험적으로 마우스에 감염시켜 얻은 마우스 뇌조직에서의 영양형과 그 주위조직을 관찰하고 또한 Visvesvara와 Callaway (1974)는 *N. fowleri*를 실험적으로 접종한 조직배양기와 마우스 뇌조직에서의 미세구조를 관찰하여 *N. fowleri*가 심한 조직의 괴사를 일으키며 또한 강한 식작용(phagocytic activity)을 나타냄을 보고하였다.

Maitra 등(1974 a, b)은 *Hartmannella culbertsoni*가 무균배양기, monobacterial 배양기 및 실험적으로 감염시킨 마우스 뇌조직 등에서 mitochondria, 골지체, spongione, 식포 등 cellular organelles에 있어 차이가 있음을 관찰하였고 또 *Naegleria aerobia*도 배양기와 실험적으로 감염시킨 마우스 뇌조직에서의 영양형에서 mitochondria, ribosome에 있어 차이가 있음을 관찰 보고하였다. 자유생활아메바는 같은 영양형인지라도 환경에 따라 신진대사가 다를 것으로 생각되며 따라서 이 아메바 영양형의 미세구조도 다를 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *N. fowleri*를 사용하여 무균 액체 배양중인 영양형과 실험적으로 감염시킨 마우스 뇌조직에 존재하는 영양형의 미세구조를 전자현미경으로 비교 관찰하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 실험동물

18~20g 내외의 백색 ICR 마우스를 사용하였다.

#### 2. *Naegleria fowleri*의 배양

실험에 사용된 자유생활아메바 *N. fowleri* 0359 strain

(Belgium, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine의 Jardin, J.B. 교수 제공)은 무균적으로 CGVS 배지(Willert & Le Ray, 1973)에서 3일에 한번씩 계대 배양하여 사용하였다.

CGVS 배지의 처방은 bactocastone 20 g, folic acid 2 mg, biotin 20 mg, glucose 1 mg, penicillin  $50 \times 10^4$  unit, streptomycin  $5 \times 10^4$  mcg, 증류수 950ml, fetal calf serum 50ml이며 이를 잘 용해시킨 후 Seitz filter로 여과하여 사용하였다.

#### 3. *Naegleria fowleri*의 감염방법

마우스 복강내로 secobarbital 용액을 체중 g 당 0.05 mg을 주어 마취시킨 후 계대한 지 2일된 운동이 활발한 아메바를 생리식염수로 세척하여 아메바가 5  $\mu$ l에  $1 \times 10^6$ 개가 되게 부유액을 만들어 마우스의 비강내에 떨어뜨려 감염시켰다.

#### 4. *Naegleria fowleri* 영양형의 미세구조 관찰

##### 1) 마우스 뇌조직내 *Naegleria fowleri* 영양형

*N. fowleri*를 마우스에 감염시킨지 7일후 ether로 마취시킨후 1% glutaraldehyde-paraformaldehyde를 마우스 심장내로 직접 주입하여 관류 고정시킨 후 두개 관을 제거하고 동일한 고정액을 후구(喉球, olfactory bulb) 및 전두엽(前頭葉, frontal lobe)에 떨어뜨려 수분간 고정하였다. 병변이 심한 후구보다 약간 후방의 전두엽을 택해서 3% glutaraldehyde에 전고정하며 1% OsO<sub>4</sub>로 후고정하고 알코올계로 탈수시킨다. Epon으로 포매하여 ultramicrotome으로 500~600Å 두께로 절편을 만들었다. Lead citrate와 uranyl acetate로 이중염색하고 Hitachi-500 투과전자현미경으로 관찰하였다.

##### 2) 액체 무균배지에서 배양한 *Naegleria fowleri* 영양형

계대배양한지 2일된 아메바를 0.1M 인산완충액(pH 7.4)으로 두 번 세척하고 3% glutaraldehyde에 2시간 고정시킨 후 인산완충액으로 세척하고 2% agar solution을 부어 굳힌 후 1 mm 두께로 절단한다. 1% OsO<sub>4</sub>에

고정시키고 다음 과정부터는 통상적인 방법으로 염색하여 관찰하였다.

### 실 험 성 적

#### 1. *Naegleria fowleri* 영양형의 미세구조 관찰

##### 1) 배양중인 영양형

아메바는 위쪽을 내어 불규칙한 모양을 보였다(Fig. 1). 핵막은 이중막으로 되어 있고 핵막공이 있으며 핵의 중심엔 전자밀도가 큰 핵인이 위치하며 핵막에는 ribosome 이 있었다(Fig. 1, 4). 핵은 대개 한 개씩 존재하나 가끔 두 개의 핵도 있었다(Fig. 1, 2). Mitochondria 는 풍부히 존재하며 cristae 가 분명히 보이며 형태는 난원형, 구형 및 원통형이었으며 대부분 진하게 염색되어 있었다(Fig. 2, 4). 액포(vacuole)도 다수가 존재하고 대개가 내용물이 없는 액포였고 가끔 그 안에 미립자물(particulate material)이 있었다(Fig. 3). 조면세포질내세망(rough endoplasmic reticulum, rER)은 특이하게 소낭(vesicle) 모양이 많았고 이 외에 세관(microtubule) 모양도 있었다. Ribosome 은 free ribosome으로 세포질내에서 기질을 구성하고 있었다(Fig. 4). 지방과립은 막이 없이 있었고(Fig. 2, 3), 골지체는 없었다.

##### 2) 마우스 뇌조직내 영양형

배양기내의 아메바에서 관찰한 것에 비해 위쪽을 적게 내어 둥근 모양이다. Mitochondria는 모양이 다양하여 난원형, 구형 및 원통형 이외에 특이하게 아령(dumbbell) 모양이 많았고(Fig. 5) 염색상도 배양기내 아메바와 달리 진한 mitochondria와 흐린 mitochondria 가 모두 존재하였다(Fig. 5). 식포(food vacuole)는 다량 존재하였으며 식포 내용물은 대개 전자밀도가 크며 미열린 양 구조(myelin-like structure)가 있었는데 이것은 소화과정중의 파괴된 적혈구, 변성된 뇌조직 및 자가용해된 물질이라고 생각되었다(Fig. 6). 이외에 내용물이 없는 액포도 있었다(Fig. 5). 조면세포질내세망(rER)은 배양기내 아메바에서와 달리 세관(microtubule) 모양이었고(Fig. 8), ribosome 은 polysome 형태

로 있었다(Fig. 6). 막의 구조가 없는 지방과립이 있었고(Fig. 7) 골지체는 없었다.

#### 2. *Naegleria fowleri*에 감염된 마우스 뇌조직의 미세구조

침범된 후엽(喉葉, olfactory lobe)은 심하게 파괴되었으며 침윤된 염증세포로는 다핵백혈구가 많았다. 다핵백혈구는 아메바에 근접하여 피판(flap)을 내거나 부분적으로 아메바의 세포막과 백혈구의 세포막이 달라붙어 접촉되어있는 막이 희미하게 보였다(Fig. 5). 가끔 아메바가 단핵백혈구에 잡아 먹혀 변성되고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 7). Neuron 및 신경교세포(neuroglial cell)는 밀접히 연관되어 있어 아메바 근처의 신경세포는 손상되었고(Fig. 5) 특히 축삭돌기는 수초의 손상이 보이고 수초가 분리되어 axoplasm을 구획으로 나누며 이 상태에서 아메바에 탐식되어 세포내에 존재하는 것도 있었다(Fig. 8). 아메바는 혈관주위에서 다핵백혈구 및 신경세포와 함께 있었으나 혈관 내강(內腔) 내에서는 발견되지 않았다.

### 고 찰

Limax 아메바는 생활사(life cycle)의 각 단계에 따라 미세구조의 차이가 있으며(Vickerman, 1960 & 1962; Schuster, 1963 a,b; Bower & Korn, 1968 & 1969), 또 같은 영양형일지라도 환경에 따라 미세구조가 달라진다(Vickerman, 1962; Carter, 1970; Maitra *et al.*, 1974 a, b).

*Naegleria fowleri*에 의한 원발성 아메바성 뇌수막염(primary amoebic meningoencephalitis, PAM)을 연구하는 데 있어 실험동물로 마우스를 사용하여 아메바를 비강내로 감염시켰을 때 인체감염시와 같은 병변을 가져옴이 알려졌으므로(Culbertson *et al.*, 1968; Carter, 1970; Cerva, 1970; Martinez *et al.*, 1971) 본 실험에서도 마우스를 사용하여 실험하였다.

본 실험에서는 *Naegleria fowleri*를 사용하여 액체 무균배양기내에서의 영양형과 마우스에 실험적으로 감염시켜 얻은 뇌조직내의 영양형과 비교할 때 mitochondria, ribosome, 조면세포질내세망(rER), 액포 등에서 차이가 있음을 알 수 있었다.

실험적으로 감염시킨 마우스 뇌조직내의 *N. fowleri*에 있어 mitochondria의 형태가 배양기내 영양형에 비해 특이하게 아령(dumbbell) 모양(Fig. 5)이 많은 것은 널리 알려진 바로(Carter, 1970; Martinez *et al.*, 1971; Visvesvara & Callaway, 1974) 이러한 형태변화에 대해 Lastovica(1974)는 아메바가 mitochondria의 표면적을 넓혀 신진대사를 크게 하려 함이라고 해석하였다. 또 mitochondria의 염색상에 있어 배양기내 아메바에서는 mitochondria가 진하게 염색되는 반면 마우스 뇌조직내에서는 진한 것과 흐린 것 두가지 모두 관찰되었는데(Fig. 5) 이것은 Maitra 등(1974 a, b)의 관

**Table 1.** Ultrastructural characteristics of *Naegleria fowleri* trophozoite

	Culture form	Tissue form
Outline	irregular many pseudopodia	round few pseudopodia
Mitochondria	densely stained	dumbbell form lightly and/or densely stained
Endoplasmic reticulum	rough vesicular, tubular	rough tubular
Ribosome	free ribosome	polysome
Food vacuole	not seen	many

찰과 일치되는 소견이었다. Mitochondria의 염색상과 신진대사와의 관련에 대해 Maitra 등(1974 a, b)은 진한 mitochondria가 흐린 mitochondria에 비해 신진대사가 활발함을 나타낸다고 하며 *Hartmanella culbertsoni*와 *Naegleria aerobia*를 실험적으로 마우스에 감염시켜 얻은 뇌조직내 아메바의 mitochondria 염색상에서 *N. aerobia*에서는 진한 것과 흐린 것 양쪽이 모두 있었고 *H. culbertsoni*에서는 흐린 mitochondria가 나타나므로 *N. aerobia*가 *H. culbertsoni*보다 신진대사가 더 왕성하다고 설명하였다. 그러나 이러한 관련성에 대해 아직 명백하게 설명된 바 없다. 조면세포질내세망(rER)은 마우스 뇌조직내의 아메바에서는 그 모양이 세관(microtubule) 모양이었고(Fig. 10) 배양기내의 영양형에서는 세관(microtubule)모양 이외에 소낭(vesicle)모양이 관찰되었는데 (Fig. 1, 4) 이것은 *Hartmanella culbertsoni*가 각기 다른 환경에 속해 있을 때, 실험적으로 감염시킨 마우스 뇌조직에서는 긴관(long profile)모양이고 무균배지와 monobacterial 배지에서는 이외에 vesicular endoplasmic reticulum(VER)이 보인다는 관찰(Maitra et al., 1974b)과 일치되었다. Ribosome도 형태적 차이를 보여 배양기내 아메바에서는 free ribosome이 많았고(Fig. 4) 마우스 뇌조직내 아메바에서는 polysome이 많이 있었는데(Fig. 7) 이것은 Maitra 등(1974a)의 관찰과 일치되었다. 뇌조직내의 아메바 세포질에 polysome이 많다는 것은 여기서 단백질합성이 왕성히 이루어지고 있다는 것을 뜻하는 것으로 생각되었다.

*N. fowleri*를 실험적으로 감염시킨 뇌조직은 괴사가 심하였고 그 미세구조의 변화는 전의 연구자들(Martinez et al., 1971; Visvesvara & Callaway, 1974)에서의 소견과 비슷하였다. 마우스 뇌조직내에서 발견되는 아메바 세포질에는 식포(food vacuole)가 풍부히 존재하였고 미엘린양 구조가 있음(Fig. 6)은 아메바가 강한 식작용(phagocytic activity)이 있는 것으로 생각된다. 그러나 Martinez 등(1971)과 Visvesvara와 Callaway(1974)가 관찰한 것과 같은 활발한 아메바양 운동은 관찰되지 않았다. 아메바의 세포막과 숙주의 세포막이 접촉되어 있으며 이런 현상은 *Entamoeba histolytica*에서와 같고(Griffin, 1972) 또 가끔 접촉되어있는 막이 희미하게 보였다(Fig. 5). 뇌조직으로부터 아메바내로 용해물질의 능동수송으로 생긴다는 micropinocytic vesicle(Visvesvara & Callaway, 1974)은 아메바내에서 관찰되지 않았다. 아메바주위에 clear space가 관찰되는데(Fig. 5, 8) 이와 같은 관찰은 이질아메바(Balamuth & Siddiqui, 1970)와 *Acanthamoeba culbertsoni*(Visvesvara, 1972)에서도 관찰되며 이것의 생성기전은 숙주 세포를 섭취하여 생기기나 단백질분해물질의 방출로 생긴다고 하며(Visvesvara & Callaway, 1974) Visvesvara(1972)와 Chang(1971)은 이러한 단백질분해 또는 세포 용해물질을 분리하여 세포배양에 접종하면 세포병변효

과(cytopathic effect; CPE)를 나타냄을 증명하였다. 아메바가 혈관주위에서 많이 발견됨(Martinez et al., 1971, 1973; Visvesvara & Callaway, 1974; Schuster & Dunnebacke, 1977)은 본 관찰에서도 동일하였다. Martinez 등(1971 & 1973)은 아메바가 특히 덜 심하게 손상된 부위의 혈관주위에서 발견됨에 대해 아메바가 전파의 초기상태에서 혈관주위 조직을 이용하기 때문이라고 하며 또 본 실험에서는 관찰하지 못하였으나 Martinez 등(1973)과 Schuster와 Dunnebacke(1977)는 혈관 내강(內腔)내에서 아메바를 관찰하여 아메바의 뇌조직내에서의 혈행성 전파를 시사하였으나 Martinez 등(1973)은 아메바가 신체의 다른 장기에서 발견되지 않으므로 이러한 전파는 중추신경계를 전파시키는데 중요하지 않다고 하였다.

본 실험은 *Naegleria fowleri*를 사용하여 액체 배지에서 무균적으로 배양된 영양형과 실험적으로 감염시켜 얻은 마우스 뇌조직에 존재하는 영양형의 미세구조를 비교하여 mitochondria, ribosome, 조면세포질내세망(rER), 액포 등에서 차이가 있음을 관찰할 수 있었으며 이러한 사실로 미루어 보아 *N. fowleri*의 신진대사가 무균배지에 비해 마우스 뇌조직에서 보다 왕성한 것으로 생각된다.

*Naegleria fowleri*의 병원성 강약과 감염된 숙주의 뇌조직 반응과의 상호관계는 앞으로 연구하여야 할 과제이며 이는 아메바의 병원성을 이해하는데 도움을 줄 것이다.

## 요 약

원발성 아메바성 뇌수막염(primary amoebic meningoencephalitis; PAM)을 일으키는 자유생활아메바인 *Naegleria fowleri*를 사용하여 액체배지에서 무균적으로 배양된 영양형과 실험적으로 감염시켜 얻은 마우스 뇌조직에 존재하는 영양형의 미세구조를 전자현미경을 이용하여 비교 관찰한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 마우스 뇌조직내의 *Naegleria fowleri* 영양형은 다소 둥근 모양인데 반해 액체배지에서 무균배양하여 얻은 영양형은 불규칙한 모양을 보였다.

2. 배양기에서 얻은 아메바 세포질내 mitochondria는 난원형, 구형 및 원통형 등 형태가 다양한데 마우스 뇌조직내의 아메바에서는 이러한 형태 이외에 아령모양이 특이하게 있었고 배양기내 아메바의 mitochondria는 진하게 염색되거나 마우스 뇌조직내의 아메바에서는 진한 것과 흐린 것이 모두 있었다.

3. 조면세포질내세망(rER)의 형태에 있어 마우스 뇌조직내 아메바에서는 세관(microtubule)모양인데 비해 배양기내 아메바에서는 세관모양 이외에도 소낭(vesicle)모양이 관찰된다. Ribosome은 배양기내 아메바에서는 free ribosome이 많은 반면 마우스 뇌조직내 아

메바에서는 polysome이 많았다.

4. 배양기내 아메바에서는 내용물이 없는 액포(vacuole)가 많았고 마우스 뇌조직내 아메바에는 식포(food vacuole)가 많고 그 안에 미엘린양 구조가 존재함을 보았다. 이것으로 아메바는 마우스 뇌조직내에서 강한 식작용을 나타낼을 알 수 있었다.

5. *Naegleria fowleri*에 감염된 마우스 뇌조직은 과사가 심하였다. 침윤된 염증세포로 다핵백혈구가 많았고, 아메바는 혈관 주위에 많았다.

### 참 고 문 헌

- Balamuth, W. and Siddiqui, W.A. (1970) Amoebas and other intestinal protozoa. In Jackson GJ, Herman R & Singer I. eds., Immunity to Parasitic Animals, Appleton-Century-Crofts, New York, 2: 439-68.
- Bower, B. and Korn, D.E. (1968) The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). I. The trophozoite. *J. Cell Biol.*, 39:95-111.
- Bower, B. and Korn, D.E. (1969) The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.*, 41:786-806.
- Carter, R.F. (1970) Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Path.*, 100:127-244.
- Cerva, L. (1970) Comparative morphology of three pathogenic strains of *Naegleria gruberi*. *Folia Parasit. (Praha)*, 17:127-133.
- Chang, S.L. (1971) Small free-living amoebae: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenicity and resistance. Current Topics in Comparative Pathology, p.201. Academic Press, New York.
- Culbertson, C.G., Ensminger, P.W. and Overton, W. M. (1968) Pathogenic *Naegleria* sp.-Study of a strain isolated from human cerebrospinal fluid. *J. Protozool.*, 15:353-363.
- Griffin, J.L. (1972) Human amoebic dysentery. Electron microscopy of *Entamoeba histolytica*; contacting, ingesting, and digesting inflammatory cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21:895-906.
- Lastovica, A.J. (1975) Ultrastructure of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* amoebae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 69:286-287.
- Maitra, S.C., Krishna Prasad, B.N., Das, S.R. and Agarwala, S.C. (1974a) Study of *Naegleria aerobia* by electron microscopy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68:56-60.
- Maitra, S.C., Krishna Prasad, B.N., Das, S.R. and Agarwala, S.C. (1974b) Ultrastructural differences of *Hartmanella culbertsoni* Singh and Das, 1970, in mouse brain and under different cultural conditions. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68:229-235.
- Martinez, J.A., Nelson, E.C., Jones, M.M., Duma, R.J. and Rosenblum, W.I. (1971) Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study. *Lab. Invest.*, 25:465-475.
- Martinez, J.A., Duma, R.J., Nelson, E.C. and Moretta, F.L. (1973) Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: A light and electron microscope study. *Lab. Invest.*, 29:121-133.
- Schuster, F.L. (1963a) An electron microscope study of the amoeboid-flagellate, *Naegleria gruberi* (Schar-dinger). I. The amoeboid and flagellate stage. *J. Protozool.*, 10:297-313.
- Schuster, F.L. (1963b) An electron microscope study of the amoeboid-flagellate, *Naegleria gruberi* (Schar-dinger). II. The cyst stage. *J. Protozool.*, 10:313-320.
- Schuster, F.L. and Dunnebacke, T.H. (1977) Ultrastructural observation of experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice: Intranuclear inclusions in amoeba and host cells. *J. Protozool.*, 24:489-497.
- Vickerman, K. (1960) Structural changes in mitochondria of *Acanthamoeba* at encystation. *Nature*, (Lond.) 188:248-249.
- Vickerman, K. (1962) Patterns of cellular organization in limax amoebae. An electron microscope study. *Exp. Cell Res.*, 26:497-519.
- Visvesvara, G.S. (1972) Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae, with special reference to *Acanthamoeba*. Ph. D. Thesis. University of California, Berkeley.
- Visvesvara, G.S. and Callaway, C.S. (1974) Light and electron microscopic observations on the pathogenesis of *Naegleria fowleri* in mouse brain and tissue culture. *J. Protozool.*, 21:239-250.
- Willert, E. and Le Ray, D. (1973) Caracters morphologiques, biologiques et immunologiques de *Naegleria jadini* sp. nov. (Amoebida vohlkampfiidae), *Protistologica*, 9:417-426.

=Abstract=

**Ultrastructural observation of *Naegleria fowleri* trophozoite in mouse brain and axenic culture**

Jae-Sook Ryu, Chin-Thack Soh

*Department of Parasitology, College of Medicine and Institute of Tropical Medicine,  
Yonsei University, Seoul, Korea*

and Kyung-Il Im

*Department of Parasitology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea*

Present study was undertaken to elucidate the changes of the ultrastructure of *Naegleria fowleri* trophozoite in brain tissue of mice and culture medium. *Naegleria fowleri*, 0359 strain, which used in this study was cultured in axenic liquid medium, CGVS medium. Each mouse was inoculated with  $1 \times 10^5$  amoebas intranasally under secobarbital anesthesia, and sacrificed on 7th day after the infection. Comparative observation of the ultrastructure of the amoebas in axenic culture and experimentally infected mice brain was done with transmission electron microscope.

The results are summarized as follows:

1. The amoebas in mouse brain tissue were round in outline, whereas those of amoebas from axenic culture showed irregular appearance.
2. Mitochondria in the amoebas from axenic culture was oval, round and cylindrical shape and darkly stained, whereas those of the amoebas from mouse brain tissue showed dumbbell shape together with above forms. The stain was not unique, but light and/or dark.
3. Rough endoplasmic reticulum of amoebas in brain tissue was tubular, but from culture it was vesicular or tubular in shape.
4. Empty vacuoles were demonstrated in amoebas from culture, while food vacuoles with myelinated structures were abundant in those from tissue, suggesting a strong phagocytic activity.
5. Mouse brain tissue infected were extensively destroyed, and polymorphonuclear leukocytes were infiltrated predominantly with inflammatory lesion. Amoebas were observed in the vicinity of the capillary.

### LEGENDS FOR FIGURES

- Fig. 1.** *N. fowleri* trophozoite cultured showing two nuclei (N), vesicular endoplasmic reticulum (VER) and pseudopodial extension (P) ( $\times 7,500$ ).
- Fig. 2.** *N. fowleri* trophozoite cultured showing two nuclei (N), and darkly stained mitochondria (M) ( $\times 12,500$ ).
- Fig. 3.** *N. fowleri* trophozoite cultured showing vacuole that is containing the particulate material (V) ( $\times 15,000$ ).
- Fig. 4.** *N. fowleri* trophozoite cultured showing vesicular endoplasmic reticulum (VER) and various shapes of mitochondria (M) ( $\times 10,000$ ).
- Fig. 5.** *N. fowleri* trophozoite observed in the mouse brain tissue. The amoeba is enclosed partially by two polymorphonuclear leukocytes (PMN) and contained dumbbell shaped mitochondria (M) ( $\times 10,000$ ).
- Fig. 6.** *N. fowleri* trophozoite observed in the mouse brain tissue showing polysome and autophagic vacuole (AV) ( $\times 25,000$ ).
- Fig. 7.** *N. fowleri* trophozoite observed in the mouse brain tissue. The amoeba, that is partially disintegrated, is engulfed by a leukocyte ( $\times 12,500$ ).
- Fig. 8.** *N. fowleri* trophozoite observed in the mouse brain tissue showing the vacuole and its axonal contents ( $\times 20,000$ ).



