تاثیر زندگی داخلی سلول بر الگوی پروتئینی و لیپوپلی ساکاریدی دیواره سلولی لژیونلاپنوموفیلا

سیدرضا حسینی‌دوست .Ph.D☆♦، اشرف محبتی مبارز .Ph.D★

☆ دانشگاه بقیه‌الله، گروه میکروب‌شناسی

★ دانشگاه تربیت مدرس، گروه میکروب‌شناسی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۷۷۷-۱۱۳۶۵، دانشگاه بقیه‌الله، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

چکیده

* **هدف:** تغییرات ایجاد شده در الگوی پروتئینی و لیپوپلی ساکاریدهای لژیونلا پنومونیا در شرایط داخل سلولی

* **مواد و روشها:** *L. pneumophila* در شرایط مختلف (داخل سلولی و خارج سلولی) تهیه و تغییرات دیواره سلولی آنها بررسی شد. ابتدا دیواره سلولی باکتریها شکسته و لایه خارجی از بقیه قسمتهای سلول جدا شد. سپس با کمک ژل SDS PAGE پروتئینها و لیپو ساکارید نمونه‌های مختلف آنالیز شد. برای مطالعه تطبیقی پروتئینهای لایه خارجی با استفاده از آنتی سرم اختصاصی لژیونلاپنوموفیلاکلیه نمونه‌ها در سیستم ایمونوبلات بررسی شدند.

* **یافته‌ها:** مقایسه الگوهای لیپوپلی ساکارید لژیونلا در شرایط مختلف رشد، تغییراتی را از نظر تراکم باندها نشان دادند. تغییراتی نیز در الگوی پروتئینی (لایه خارجی) باکتری مشاهده شد. این باکتری در شرایط داخل سلولی یک پروتئین نسبتاً کوچک (۱۵ KDa) در لایه خارجی دیواره سلولی بروز دادکه باکتریهای خارج سلولی فاقد آن بودند. آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد لژیونلا نشان دادکه پروتئین جدید به طور ضعیف توسط آنتی بادی ضد لژیونلا شناسایی شده بود. بنابراین تعیین قطعی منشا پروتئین جدید و اینکه از سلول میزبان گرفته شده یا در شرایط داخل سلولی توسط خود باکتری ساخته شده و نیز نقش احتمالی آن در زندگی داخل سلولی باکتری به آزمایشهای بیشتری نیاز دارد.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به اینکه عمده تغییرات ناشی از زندگی داخل سلولی لژیونلا در ترکیبات دیواره سلولی آن است و اجزای مختلف دیواره سلولی باکتری به ویژه پروتئینهای لایه خارجی آن نقش مهمی را در آنتی ژنیسیته باکتری بازی می‌کنند این نتایج می‌توانند از نقطه نظر تولید واکسن علیه این بیماری نیز مفید واقع شوند.

گل واژگان: لژیونلاپنوموفیلا، زندگی داخل سلولی، پروتئینهای لایه خارجی، لیپوپلی ساکارید

مقدمه

لژیونلاها از باکتریهای گرم منفی سخت رشد هستند که زندگی داخل سلولی اختیاری داشته و عملاً می‌توانند طیف وسیعی از تک یاخته‌های آزاد و نیز ماکروفاژها و مونوسیتهای انسانی را آلوده و درون آنها تکثیر کنند (۱). لژیونلاپنومونیلا عامل اصلی بیماری لژیونر بوده و شیوع آن به خصوص در میان جمعیتهای خاص (۲) از بیشتر نقاط جهان گزارش شده است. این باکتری به طور طبیعی (۳) در آبهای محیطی (رودخانه‌ها، نهرها، جویبارها و... همین‌طور چشمه‌های آب گرم...) و نیز شبکه لوله کشی آب شهری (۴) زندگی می‌کند و توسط آئروسلهای آلوده ناشی از تجهیزات خنک کننده آبی به انسان منتقل می‌شوند (۵). مهمترین فاکتور بیماریزایی این باکتری در بدن انسان (فاگوسیتهای مونونوکلئاز) آن است (۶). علاوه بر رابطه سیمبیوتیک که با بعضی از باکتریهای دیگر و نیز پلانکتونها دارد، لژیونلا طیف وسیعی از تک یاخته‌های آزاد را در طبیعت به عنوان میزبان انتخاب کرده و درون آنها زندگی می‌کند (۳). محیط امن و مطمئنی که به این ترتیب برای این باکتری مهیا می‌شود به خوبی او را در مقابل شرایط نامساعد محیط مقاوم می‌کند (۱۷). به این ترتیب مقاومت قابل توجه لژیونلا در مقابل هیپوکلریت سدیم و سایر عوامل ضد عفونی کننده آب و نیز انتشار نسبتاً وسیع آن در آبهای لوله کشی شهرها علیرغم عملیات تصفیه و ضد عفونی به وضوح توجیه می‌شود (۷). با وجود مطالعات فراوان، چگونگی زندگی داخل سلولی لژیونلا هنوز به طور دقیق معلوم نشده است. با این حال این نوع زندگی و ارتباط متقابل انگل و میزبان خصوصیات فنوتیپی قابل توجهی را در هر دو میکروارگانیسم به وجود آورده است (۸). کوچک و پرحرکت بودن لژیونلاهای داخل سلولی و رشته‌ای و غیرمحرک بودن باکتریهای ناشی از رشد آزمایشگاهی از جمله این خصوصیات هستند (۹). شاید مهمترین و جالبترین این خصوصیات القایی مقاومت بیشتر لژیونلاهای داخل سلولی در مقابل بیوسایدها پس از خروج از سلول میزبان باشد (۱۰). بنابراین مطالعه مقایسه‌ای زندگی داخل سلولی باکتریها می‌تواند اطلاعات مفیدی را فراهم آورد که راه را برای مبارزه موثر بر علیه عفونتهای ناشی از آنها هموار می‌سازند. لژیونلا مثل بعضی از باکتریهای داخل سلولی دیگر در داخل سلول میزبان با فقر آهن مواجه شده و خصوصیات ویژه‌ای که منطبق با این شرایط است را از خود بروز می‌دهد. مثلاً بارکر و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که مقاومت لژیونلا پس از تکثیر داخل سلولی نسبت به عوامل باکتریساید افزایش می‌یابد (۱۱). این موضوع نشان می‌دهد که تغییراتی در ساختمان بعضی از قسمتهای باکتری حادث شده نتیجه آنها را در تغییر حساسیت ملاحظه می‌کنیم. از طرفی ترکیبات اصلی لایه خارجی دیواره سلولی این باکتری نقش مهمی را در تحریک سیستم ایمنی بازی می‌کنند و احتمالاً در خلال زندگی سلولی تغییراتی در ترکیبات دیواره سلولی نیز حاصل می‌شوند (۱۲)، از جمله این تغییرات این است که پروتئینهای اصلی لایه خارجی دیواره سلولی *L.pnemophila* توانستند در خلال انکوباسیون به جزء C3 کمپلمان متصل شده و آنرا فعال کنند (۱۳). علاوه بر آن لیپوزومهای محتوی Major Outer Membrane Protein (MOMPs) پس از انکوباسیون با سرم انسانی علاوه بر اتصال با جزء C3 کمپلمان به مونوسیتهای انسانی نیز اتصال یافتند (۱۴). این نتایج نشان می‌دهند که MOMPs می‌توانند کمپلمان را از طریق آلترناتیو فعال کرده و فاگوسیت شدن *L. pneumophila* را تسهیل کنند (۱۵، ۱۶). در این مقاله تاثیر شرایط رشد بروی تغییر الگوی بیوشیمیایی دیواره سلولی باکتری بررسی شده است.

این تحقیق به منظور فراهم آوردن اطلاعات بیشتر در مورد تاثیر شرایط داخل سلولی میزبان روی تغییر الگوی پروتئینها و لیپوپلی ساکارید دیواره سلولی *L. pneumophila* انجام شد. نتایج حاصل به منظور ادامه مطالعات روی عامل بیماری لژیونر (که در ایران کار زیادی روی آن انجام گرفته) و شناسایی وضعیت بیماری مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

سویه بیماریزای لژیونلاپنومونیلا قبلاً از سیستم آب بیمارستان (۷) جدا شده بود. لژیونلا پنومونیلا تا زمان آزمایش در دمای °۲۰- سانتیگراد روی گلوله‌های شیشه‌ای نگهداری شد. هنگام انجام آزمایش، باکتری روی محیط جامد BCYE[1] غنی شده با ال سیستئین و فریک پیروفسفات پاساژ و در دمای °۳۷ سانتیگراد در حضور گاز کربنیک (۵ درصد) گرمخانه گذاری شدند. سلول میزبان (آکانتامبا و ماکروفاژ) نیز به صورت هدیه از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه گلاسگو تهیه و در محیط کشت دارای گلوکز (۱۳) نگهداری شدند. لژیونلا داخل سلولی نیز طبق روش Barker و همکاران (۱۶) کشت و باکتریهای داخل سلولی تهیه شد.

در این تحقیق چهار نمونه لژیونلا که در شرایط مختلف رشد کرده بودند استفاده شد، دو نمونه باکتری داخل سلولی و دو نمونه دیگر تحت دمای °۳۰ و °۳۷ سانتیگراد روی محیط اختصاصی رشد کرده بودند. برای جداکردن پروتئینهای لایه خارجی باکتری از روش Barker و همکاران (۸) استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا دیواره سلولی باکتری به سونیکاسیون (۱۰ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای) روی یخ مذاب، شکسته شد. سپس غشای سیتوپلاسمی به وسیله سدیم لوریل سارکوسینات (۲۰ درصد) حل شد. در نهایت پروتئینهای دیواره خارجی باکتریها به کمک سانتریفوژ (g ۱۱۶۰۰۰ به مدت ۲ ساعت در °۴ سانتیگراد) استحصال گردید (۱۳). پروتئینهای دیواره سلولی توسط ژل SDS PAGE محتوی ۱۲ درصد و لیپوپلی ساکارید در ژل محتوی ۱۵ درصد آکریل آمید آنالیز شد. پس از انجام الکتروفوز ژلهای پروتئین با روش کوماسی بلو و ژل LPS با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی و عکسبرداری شدند (۱۹).

برای وسترن بلات از روش Tween و همکاران (۱۸) استفاده شد. به طور خلاصه، باندهای پروتئین هر یک از نمونه‌ها با آنتی سرم اختصاصی ضد *L. pneumophila* در سیستم وسترن بلات مجاور شدند. ابتدا باندهای پروتئین به کمک جریان الکتریکی (باقر مخصوص

1. Bafferd Charcoal Yeast Exstract

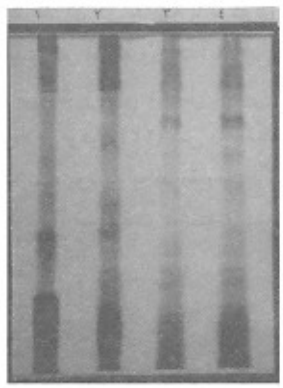
متشکل از ۱۹۲ میلی مول گلایسین، ۲۰ درصد متانول به مدت ۴ ساعت و با ولتاژ ۱۰۰) از روی ژل SDS PAGE به غشای نیتروسلولز منتقل شد. سپس باندهای منتقل شده روی غشای نیتروسلولز توسط بافر TTBS (Tween-Tris Buffered, pH 7.4) بلوک شدند. واکنش بلات با آنتی سرم اختصاصی لژیونلاپنوموفیلا در دمای ۴° سانتیگراد و به مدت یک ساعت انجام و پس از اتمام واکنش، غشای نیتروسلولزی سه مرتبه در بافر مخصوص شسته و در نهایت باکونژوگه Horse radish پروکساید به مدت سه ساعت در دمای آزمایشگاه مجاور شد. پس از شستشوی مجدد غشای نیتروسلولز و آنزیم اتصال یافته به پروتئین موجود روی نیتروسلولز با اضافه کردن سوبسترا (۱۹) آشکار گشت.

یافته‌ها

به طور کلی نتایج حاکی از این است که زندگی داخل سلولی تغییراتی را روی الگوهای لیپوپلی ساکاریدی و پروتئینی لژیونلاپنوموفیلا به وجود می‌آورد. آزمایشها و تحقیقات پیشین نشان دادند که لژیونلا پس از آلوده کردن سلول میزبان، در داخل سلول زنده مانده و به تکثیر خود ادامه می‌دهد (۲۶). لژیونلاهای داخل سلولی کوچک و بسیار فعال بودند. این باکتریها از درون سلول میزبان جمع آوری شده و بعضی خواص ساختمانی دیواره سلولی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

در این تصویر بعضی از باکتریهای داخل سلولی را در حال تقسیم شدن مشاهده می‌کنیم. باکتریهای داخل سلولی کوچک و به شدت فعال بودند. این باکتریها از درون سلول میزبان جمع آوری و دیواره سلول آنها روی ژل SDS تجزیه و آنالیز شد.

آنالیز لیپوپلی ساکاریدهای *L. pneumophila* روی SDS-PAGE پس از حذف پروتئینهایش به کمک پروتئیناز K به وسیله رنگ‌آمیزی نقره آشکار شد (شکل ۱). این باندها که روی ژل ۱۵ درصد تراکم آشکاری را نشان می‌دادند در غلظتهای پایینتر ژل آکرلامید وضوح کمتری داشتند. به طور کلی باندهای LPS لژیونلا که در شرایط مختلف رشد کرده بودند دارای شباهتهای اساسی بودند. با این حال اختلافهای اندکی نیز در این باندها مشاهده شد (شکل ۱).

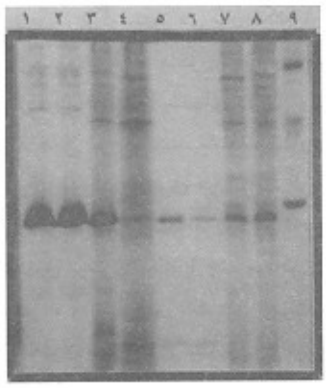


شکل ۱: آنالیز الگوی لیپوپلی‌ساکاریدی پنوموفیلا با شرایط مختلف رشد روی ژل SDS PAGE. ستون ۱ (۳۰° سانتیگراد)، ستون ۲: رشد خارج سلولی (۳۷° سانتیگراد)، ستون ۳: رشد داخل سلولی (ماکروفاژ)، ستون ۴: رشد داخل سلولی (آکانتامبا)

با توجه به اینکه رنگ نقره‌ای به طور یکسان با LPS موجود در دیواره باکتری (رشد در شرایط مختلف) واکنش می‌کند، به نظر می‌رسد که اختلاف در تراکم این باندها تا حدودی نشان دهنده مقدار LPS موجود در نمونه باشد. نکته جالب اینکه لژیونلاهایی که داخل سلول میزبان رشد کرده بودند نسبت به لیز شدن در برابر پروتئیناز K مقاومت بیشتری داشتند. به طور خلاصه بروز تغییراتی در تراکم باندهای لیپوپلی ساکاریدی و پروتئینی تحت شرایط زندگی داخل سلولی قابل توجه بود.

به علت مقدار ناکافی لژیونلاهای داخل سلولی اندازه‌گیری غلظت پروتئینهای لایه خارجی انجام نشد. بنابراین در رنگ‌آمیزی کوماسی بلوباندهای مشاهده شده روی ژل SDS-PAGE نشان دهنده مقادیر نسبی هر کدام از پروتئینهای مورد نظر است. پروتئین ۲۹ کیلو دالتون که پروتئین اصلی MOMP لژیونلا پنوموفیلا قلمداد شده تقریباً در تمام شرایط رشد این باکتری بیان شد (شکل ۲). علاوه بر آن ملاحظه شد که برخی از باندهای پروتئینی لایه خارجی؛ زمانی که باکتری زندگی داخل سلولی دارد دیده می‌شود ولی در باکتریهایی که در دماهای مختلف در شرایط آزمایشگاهی رشد کرده بودند وجود نداشتند. مثلاً پروتئین کوچکی به وزن ۱۵ کیلو دالتون که تنها در باکتریهای داخل سلولی ملاحظه شدند و از این دیدگاه جالب توجه است (شکل ۳).

پروتئینهای بیش از ۴۵ کیلو دالتون در باکتریهای داخل سلولی یا خیلی ضعیف بودند یا اساساً بیان نشدند. همچنان که در تصویر فوق دیده می‌شود تراکم بعضی از پروتئینهای لایه خارجی لژیونلا (در شرایط مختلف رشد) تفاوتهایی را نشان می‌دهند. به عبارت دیگر؛ در شرایط داخل سلولی تراکم برخی از پروتئینهای لایه خارجی کمتر است.

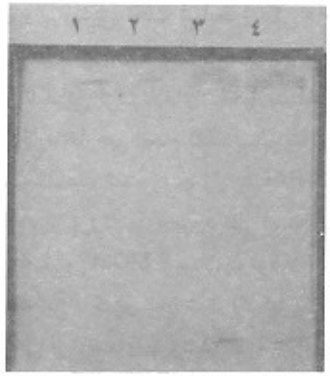


شکل ۲: آنالیز پروتئینهای دیواره سلولی *L. pneumophila* روی ژل SDS PAGE

۱: پروتئینهای لایه خارجی باکتری (رشد خارج سلولی در دمای ۳۷° سانتیگراد)، ۲: پروتئینهای لایه خارجی باکتری (رشد داخل سلولی در دمای ۳۰° سانتیگراد)، ۳: کل پروتئینهای دیواره سلولی باکتری (رشد خارج سلولی در دمای ۳۷° سانتیگراد)، ۴: کل پروتئینهای دیواره سلولی باکتری (رشد خارج سلولی در دمای ۳۰° سانتیگراد)، ۵: پروتئینهای لایه خارجی باکتری (رشد داخل سلولی – آکانتامبا)، ۶: پروتئینهای لایه خارجی باکتری (رشد داخل سلولی – ماکروفاژ)، ۷: کل پروتئینهای دیواره سلولی باکتری (رشد داخل سلولی – آکانتامبا)، ۸: کل پروتئینهای دیواره سلولی باکتری (رشد داخل سلولی–ماکروفاژ)، ۹: مارکروزن مولکولی (به ترتیب از بالا، ۶۶، ۴۵ و ۲۹)

برای اینکه منشاء پروتئینهای جدید بیان شده تحت شرایط زندگی

داخل سلولی مشخص شود، باندهای موجود روی ژل SDS-PAGE را از طریق وسترن بلات به غشای نیتروسلولز انتقال داده و با آنتی‌سرم (پلی والانت) ضد لژیونلاپنومونیا مجاور شد. در آنالیز تصویر ایمونوبلات مشاهده شد که آنتی‌سرم ضد لژیونلا ۱۵ کیلو دالتونی را که در شرایط داخل سلولی بیان شده بود شناسایی کرد (شکل ۳). این پروتئین در الگوی پروتئینی سلول میزبان نیز مشاهده شد.



شکل ۳: ایمونوبلات الگوی پروتئین‌های لایه خارجی *L. pneumophila* در واکنش با آنتی‌سرم اختصاصی باکتری. ۱: پروتئینهای لایه خارجی (خارج سلولی رشد در ۳۷° سانتیگراد)، ۲: پروتئینهای لایه خارجی (خارج سلولی رشد در ۳۰° سانتیگراد)، ۳: پروتئینهای لایه خارجی (داخل سلولی - ماکروفاژ)، ۴: پروتئینهای لایه خارجی (داخل سلولی - آکانتامبا)

بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شرایط داخلی سلول میزبان می‌توانند تغییراتی را در باکتری داخل سلولی به وجود آورند. این مطالعه توانایی لژیونلا پنومونیا برای زندگی و تکثیر داخل سلولی را نشان می‌دهد. لژیونلا پنومونیا از طریق ممانعت از اتصال فاگوزم-لیزوم سلول میزبان زنده می‌ماند. فاگوسیتوز در میان تک یاخته‌های آزاد به عنوان یک فرآیند طبیعی و بیشتر به منظور تغذیه و تامین انرژی انجام می‌شود (۱۸) ولی در عین حال مکانیسمهای دفاعی و باکتری‌کشی در میان این تک یاخته‌ها قابل توجه است. مشاهده تفاوتهای متعدد در ترکیب ساختمانی دیواره سلولی باکتری در شرایط گوناگون رشد از دیدگاههای مختلف حائز اهمیت است. امروزه در تحقیقات مربوط به واکسن سازی واکسنهای محتوی یک یا چند مولکول و یا اپی‌تاپهای آنتی ژنی مورد نظر بوده و امتیازهای بالقوه‌ای نسبت به واکسنهای متعارف (که معمولاً محتوی باکتریهای کشته شده یا غیر بیماریزا هستند) دارند. تحقیقات قبلی نشان داده که پروتئینهای اصلی لایه خارجی دیواره سلولی لژیونلا می‌توانند سیستم کمپلمان را تحریک کرده یا اینکه در خلال انکوباسیون لژیونلا می‌توانند به جزء سوم کمپلمان متصل شود (۱۴، ۱۶). بنابراین پروتئینهای مذکور می‌توانند نقش فعال کننده کمپلمان را ایفا کرده و ضمناً نقش مهمی را در فاگوسیت شدن لژیونلا توسط مونوکلئرها (با واسطه کمپلمان) بر عهده گیرند. در تحقیقات قبلی توانایی بعضی از پروتئینهای لایه خارجی در تحریک سیستم ایمنی سلولی بر علیه *L. pneumophila* معلوم شد (۱۵). همچنین مشخص شده که بعضی از همین پروتئینها مثل Major Secretory Protein (MSP) توانسته خوکچه هندی را علیه عفونت ناشی از آئروسلهای آلوده به *L. pneumophila* محافظت کنند (۱۴). بنابراین تغییر تراکم برخی از باندهای پروتئینی دیواره سلولی چنانچه مربوط به کاهش آنها در شرایط زندگی داخل سلولی لژیونلا باشد، می‌تواند این مطلب که پس از تکثیر داخل سلولی باکتری قدرت تهاجم بیشتری پیدا می‌کند (۱۲) را توجیه کند. ضمن آنکه راه را برای تحقیق بیشتر در مورد واکسن ایده آلی بر علیه بیماری لژیونر هموار می‌سازد. در دمای ۳۰° سانتیگراد علیرغم فراوانی سلولهای میزبان در محیط کشت، تعداد لژیونلاهای داخل سلولی را می‌توان به علت پایین بودن متابولیک باکتری در این دما دانست. نکته مهم این است که تغییرات دیواره سلولی لژیونلا تا چه حد روی بیماریزایی آن تاثیر دارد. تحقیقات Mc Dade نشان داد که لژیونلا پنومونیا پس از چند مرتبه پاساژ روی محیط مولر هینتون بیماریزایی خود را از دست می‌دهد (۲۱). از طرفی لژیونلای غیر بیماریزایی پس از کشت روی تخم‌مرغ جنین‌دار، سلولهای فیبروبلاست یا خوکچه هندی می‌تواند قدرت بیماریزایی را به آن برگرداند (۲۲). این در حالی است که یافته‌های قبلی نشان می‌داد که تغییر بیماریزایی این باکتری یک مسیر یک طرفی بوده و تغییر سوش بیماریزایی در شرایط معمولی نامتحمل است (۲۲، ۲۳). این گونه تغییرات در پاتوژنسیته باکتری را بعضی محققین به وجود یا عدم وجود کپسول پلی‌ساکاریدی نسبت می‌دهند ولی بعضی دیگر وجود و مقدار پروتئینهای لایه خارجی را در این امر دخیل می‌دانند. با این وجود بعضی از باکتریها به خوبی خود را با شرایط داخل سلولی وفق داده و به زندگی ادامه می‌دهند. زندگی داخل آمیبی تغییرات زیادی نیز روی لژیونلا باقی می‌گذارد از جمله اینکه باکتری متعاقب زندگی داخل سلولی مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد کرده (۸، ۱۰) و یا قدرت بیماریزایی آن افزایش می‌یابد (۲۴). همچنین لژیونلاهای داخل سلولی (در آمیب) روی محیط کشت رشد نکرده و برای تشخیص مشکلاتی به وجود می‌آورند و تنها به کمک روش می‌توان به وجودشان پی برد. در این تحقیق نشان داده شده که چگونه شرایط داخل سلول میزبان بر ترکیبات و مقدار پروتئینهای لایه خارجی لژیونلای داخل سلولی تاثیر گذاشته و باعث شده تا مقدار پروتئینها لیپوپلی ساکارید آن در مقایسه با باکتری آزاد تغییر یافته یا حتی پروتئینهای جدیدی در آن به وجود آید. این یافته‌ها با بعضی از تحقیقات دیگر نشان می‌دهد زندگی داخل آمیبی در بدست آوردن مجدد پاتوژنیسه لژیونلاپنومونیا (۱۲) پس از آنکه بر اثر پاساژهای متوالی آن را از دست داده بود یا ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی لژیونلا زندگی داخل آمیبی (۱۰)، موافقت داشته و در واقع تا حدودی مکانیسم آن را بیان می‌دارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با کمک مالی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) و در دانشگاه گلاسگو انجام شد.

References

1. Fiore E, Nuorti P, Levimes S, Marx A, Weltman C, Yeager S, Benson F, Ptuckler J, Edelstein H, Greer P, Zaki R, Fields S, Butler C: Epidemic Lagionnaires´ disease two decades later: Old sources, new diagnostic methods. Clin- Lnfect- Dis 1998; 26(2): 426-433

2. Blatt P, Dolani J, Hendrix W, Melcher P: Legionnaries´ disease in human immunodeficiency virus infected patients. Clinical Infection Disease. 1994; 18(2): 227-232

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 Microbiology and Ecology, 1992; 102: 45-55

4. Jernigan B, Hofmann J, Cetron S, Genese A, Nurti P, Fields S, Benson F, Carter J, Edelstein H, Guerrero C, Paul M, Lipman B, Breiman R: Outbreack of Legionnaires´ disease among cruise ship passenger exposed to a contaminated whirlpool spa. Lancet; 1996; 347(9000): 494-499

5. Jaraaud S, Reyrolle M, Riffard S, Lo-Presti, Etienne J: Legionnaries´ disease in travellers. Bull-Sco-Pathol-Exot; 1998; 91(5 Pt 1-2): 486-489

6. Dowling J, Saha A, Glew R: Virolence factor of the family Legionellacea. Microbiology Review. 1992; 56(1): 32-60

7. Patterson W, Seal D, Curran E, Siclare T, Mc Luckej: Fatal nosocomial legionnaries´ disease: relevance of contaminiation of hospital water supply by temprature dependent buoyancy-deriven flow spur pipes. Epidemiology & Infections. 1994; 112:513-525

8. Barker J, Scaif H, Brown R: Intraphagocytic grown induces an antibiotic resistance phenotype of L. pneumophila. Antimicrobial Agnets and Chemotherapy, 1995; 39(12): 2648-2688

9. Cirllo D, Falkow S, Tompkins S: Growth of legionella in Acanthamobea enhaces invasion of legionella. Infaction and Immunity, 1994; 62(8): 3254-3261

10. Kwaik Y, Engleberg C: Cloning and molecular characterization of L. pneumophila gene induced by intracellular infection and by various stress conditions. Molecular Microbiology, 1994; 13(2): 243-251

11. Barker J, Brown R: Speculations on the influence of infecting phenotype on virulence and antibiotic susceptibility of Legionella pneumophila. J-Antimicbob-Chemother: 1995; 36(1): 7-21

12. Kwaik Y, Eisenstein B, Engleberg C: Phenotypic Moduation by L. pneumophila upon infection of macrophage. infection and Immunity, 1993: 61: 1320-1329

13. Barker J, Brown M, Collier O, Farell L, Gilber R: Relationship between L. pneumophila and A. polyphage: Physiological status and suscepitibility to chemical inactivation. Applied Environmental Microbiology, 1992; 58: 2420-2425

14. Krinos C, High S, Robgers G: Role of the 25 kDa major outter membrane protein of Legionella pneumophila in attachment to U-937 cells and its potentisl as a virolence factor for chick embryos. J-Appl-Microbiol: 1999; 86(2): 237-244

15. Weerana R, Stamler A, Edelstein H, Ripley M, Marrie T, Hoskin D, Hoffman S: Human and guinea pig immune responses to Legionella pneumophila protein antigens OmpS and Hsp60. Infect-Immun: 1994; 62(8): 345-362

16. Cliffords M, Patrica R, William J, Duane S: Antibody-independene binding of complement component C1q by L. pneumophila, Infect. Immun, 1995; 63(12): 4936-4943

17. Hosseini Doust R, seal D: Isolation of legionnaries´ disease bacterium from hospital water supplies. Kowsar Med J 1998; 3(3): 145-150

18. Weekers H, Engelberts M, Vogels D: Bacteriolytic activities of the free-living soil amoeba, A. castellanii and Hartmanella vermiformis. Antonie-Van-Leeuwnhoek, 1995; 68(3): 237-243

19. Ali Q, Davis R, Parton R, Coote J, Gibbs H: Lipopolysaccharidse of P. heamolutica isolates from cattel and sheep. J General Microbiol 1992; 183: 2185-2195

20. Towbin H, Steahelin T, Gordon J: Electophoretic transfer of proteins from polyacrelamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proccedings of the national Academy of Sciences if the United State of America, 1979; 76: 4350-4354

21. Mc Dade E, Spard C: Virulent to avirulent conversion of L. pneumophila its affect on isolation tecgniques. J Infect Dis 1979; 139: 707-711

22. Catrenich C, William J: Virulence conversion of L.pneumophoila a one- way phenomenon. Infect Immun1988; 56(12): 3121-3125

23. Fernandez C, Logan M, Lee H, Hoffman S:

Elevated levels of Legionella pneumophila stress protein Hs69 early in infection of human monosutesand L929 cells correlate with virylence. Infect-Immun; 1996; 64(6): 1968-1976

24. Hacker J, Ott M, Ludwing B, Rdest U: Intracellular survival and expression of virulence determinants of Legionella pneumophila. Infection; 1991; 19Supp14: S198-201