# بررسی وجود ژن انتقال دهنده مس در لیستریا مونوسیتوژنز و واردکردن آن به درون اشریشیاکلی

جمیله نوروزی Ph.D.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروبیولوژی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروبیولوژی

## چکیده

* **هدف:** لیستریا مونوسیتوژنز، باکتری گرم مثبتی است که در محیط اطراف یافت می‌شود و عامل بیماریهای شدیدی نظیر عفونتهای قبل و بعد از تولد، سپتی سمی و مننژیت در انسان و حیوان می‌باشد. وجود ژن ctpA (ژن انتقال دهنده مس) در عفونتهای ناشی از لیستریامونوسیتوژنز در انسان اهمیت دارد. هدف از این بررسی، یافتن ژن ctpA در لیستریا مونوسیتوژنزهای جدا شده از منابع گوناگون، تعیین شرایط مناسب برای انجام PCR و یافتن روشی برای انتقال ژن ctpA به درون باکتری اشریشیاکلی در دانشگاه آدلاید استرالیا بوده است.

* **مواد و روشها:** این تحقیق در دو مرحله (مرحله اول، یافتن ctpA در ۶۹ سویه لیستریا مونوسیتوژنز نگهداری شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آدلاید و در مرحله دوم انتقال این ژن به باکتری (E.coli DH5-$\alpha$) انجام گرفته است. ابتدا، DNA از کروموزوم لیستریا مونوسیتوژنز جدا شد و سپس با استفاده از PCR و الکتروفورز، وجود ژن ctpA در آن جستجو، جدا و در روی ژل اگاروز با فنل خالص گردید. بعد این ژن به درون پلاسمید PGEM-T اتصال داده شد و به سلولهای گیرنده از E. coli DH5-$\alpha$ وارد گردید. کلنی‌های سفید رنگی که در محیط کشت حاوی X - gal ظاهر شدند حاوی ژن ctpA بودند. پس از خالص کردن این ژن در روی ژل آگاروز، بااستفاده از dye-terminator و خالص سازی ژن، توالی کامل نوکلئوتیدی از DNA کلون شده تعیین گردید.

* **یافته‌ها:** از ۶۹ لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی، ۳۸ درصد آنها دارای ژن ctpA بودند. ctpA از ۹۰ درصد از نمونه‌های کلینیکی و لبنیات، ۸۵ درصد از نمونه‌های محیطی و ۷ درصد از نمونه‌های حاصل از گوشت و مرغ به دست آمد. با توجه به مشکلاتی که در انجام انتقال ژنها وجود دارد، خوشبختانه در این روش، توالیهای نوکلئوتیدی ژن ctpA از لیستریا مونوسیتوژنز به درون اشریشیاکلی با موفقیت انجام شد.

* **نتیجه‌گیری:** چون ژن ctpA در ۹۰ درصد از لیستریا مونوسیتوژنزهای به دست آمده از لبنیات و نمونه‌های کلینیکی یافت شد و در ۷ درصد از لیستریا مونوسیتوژنزهای به دست آمده از مرغ و خروس مشاهده گردید، این امر احتمالاً نشان دهنده آن است که نژادهای مختلف این باکتریها، خاصیت بیماریزایی یکسانی ندارند. با توجه به اینکه، این باکتری در درون سلول قادر به تکثیر می‌باشد، بنابراین با انتقال این ژن به درون اشریشیاکلی، شاید بتوان از اشریشیاکلی حاوی این ژن جهت تهیه واکسن در برابر عفونتهای لیستریا مونوسیتوژنز استفاده نمود.

**کل واژگان:** لیستریا مونوسیتوژنز، انتقال ژن، ژن ctpA، باکتری E. coli DH5-$\alpha$

## مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز، باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی اجباری است که در درون سلول نیز قادر به تکثیر می‌باشد. این باکتری در محیط اطراف یافت می‌شود. در بررسیهای اپیدمیولوژی نشان داده شده است که این باکتری از طریق غذاهای آلوده مانند کره (۱)، پنیر (۲)، شیر پاستوریزه شده (۳)، سبزیجات خام (۴)، گوشت و فرآورده‌های آن (۵) و غیره به انسان انتقال می‌یابد. بیماران سالمند، زنان باردار و افرادی که سیستم ایمنی آنها مختل شده است مانند گیرندگان پیوند عضو و افراد مبتلا به بدخیمی‌ها مانند لنفوم، در خطر ویژه‌ای می‌باشند. منتژیت، شایع‌ترین عفونت لیستریای انسانی است که گرایش این باکتری را به سیستم عصبی مرکزی نشان می‌دهد (۶). بیماری لیستریوز قبل از تولد در انسان ممکن است به صورت عفونت درون رحمی بوده که موجب سپتی سمی جنین و مرگ جنین قبل از تولد می‌شود. حمله بعدی بیماری به صورت منتژیت از زمان تولد تا ۳ هفته بعد از تولد بروز می‌کند (۷).

در سال ۱۹۹۶، ژنی در لیستریامونوسیتوژنز به نام ctpA شناسایی گردید (۸). این ژن، پروتئینی با ۶۵۳ اسید آمینه راکد می‌کند (Accession number Genbank). آنالیز این پروتئین، شباهت عمده‌ای را به خانواده آنزیمهای وابسته به ATP که در انتقال مس در پروکاریوتها و ایوکاریوتها دخالت دارد آشکار ساخت. این پژوهشگران، مکان جدیدی را در DNA یافتند که سیستم انتقال مس را در لیستریامونوسیتوژنز کد می‌کنند.

عوامل بیماریزایی که نقشی در پاتوژنز عفونتهای لیستریا مونوسیتوژنز به عهده دارند توسط برخی از پژوهشگران مرور شده است (۹، ۱۰). در هر حال، عوامل دیگری ممکن است در برقراری عفونت دخالت داشته باشند. برای مثال تعداد زیادی از نژادهای لیستریامونوسیتوژنز به کاتیونهای فلزات سنگین مانند کادمیم مقاوم هستند (۱۱). در این مورد، مقاومت توسط شاخص cadA اعطاء می‌گردد و پروتئین ATP آز از نوع P در انتقال کادمیم یا مس در سایر باکتریها دخالت دارند نیز گزارش شده است مانند ژن cadA و ژن cadC در استافیلوکوک بیماریزا (۱۲)، ژن PacS در Synechococcus (۱۳)، ژن copA در E.hirea (۱۴)، copA و ORF در هلیکوباکترپیلوری (۱۵).

توالی اسیدهای آمینه موجود در پروتئینهای ctpA همچنین شباهت زیادی با پروتئینهای در ارتباط با اختلالات متابولیسم مس در سندرم ارثی Menkes (۱۶) و بیماری Wilson (۱۷) در انسان دارد. در بیماری منکس، ورود و خروج مس در سلولهای روده دچار اختلال بوده و کمبود شدید مس در بدن حاصل می‌شود. در بیماری ویلسون، ناتوانی در ورود مس از کبد به درون صفرا دیده می‌شود که به مسمومیت تدریجی از مس منجر گردد. از طرفی ATPآز در ctpA موجود در لیستریامونوسیتوژنز با پروتئینهای باکتری که در جابجایی مس دخالت دارد و همچنین با ctpA موجود در لیستریامونوسیتوژنز با پروتئینهای باکتری که در جابجایی مس دخالت دارد و همچنین با پروتئینهایی که در بیماری منکس و ویلسون ساخته می‌شود تشابه زیادی دارد (۱۰). با توجه به اینکه، لیستریامونوسیتوژنز در محیط اطراف پراکنده است، پس این یافته‌ها نشان می‌دهد که این ارگانیزم در محیط طبیعی خود با داشتن ctpA آز در جابجایی یون مس دخالت کرده و مقدار مس را در سلول ثابت نگاه می‌دارد تا زنده بماند.

هدف از این بررسی، در مرحله اول یافتن درصد وجود ژن ctpA (ژن انتقال دهنده مس) در لیستریا مونوسیتوژنزهای جدا شده از منابع گوناگون (نمونه‌های کلینیکی، لبنیات، محیط اطراف، گوشت قرمز و مرغ) که در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آدلاید استرالیا نگهداری شده بود و در مرحله دوم، وارد کردن این ژن به درون اشریشیاکلی DH5-$\alpha$ بوده است.

## مواد و روشها

این تحقیق در دو مرحله انجام شده است. در مرحله اول، یافتن ژن ctpA به روش اکتشافی با توصیفی در ۶۹ لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آدلاید استرالیا و در مرحله دوم، انتقال این ژن به روش تجربی به درون باکتری E. coli DH5-$\alpha$ نگهداری در بخش میکروبیولوژی دانشگاه آدلاید بوده است (۸، ۱۸).

لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیاکلی DH5-$\alpha$ که در این آزمایش به کار رفت در محلول گلیسرول و پپتون در ۷۰- سانتیگراد نگهداری شده بود. یک کلنی از لیستریا مونوسیتوژنز در محیط BHI و یک کلنی از اشریشیاکلی در محیط نوترینت اگار به روش خطی، کشت داده شد و به مدت یک شب در حرارت ۳۷° سانتیگراد نگهداری گردید. سپس، جهت بررسیهای زیر مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا، DNA کروموزومی با روش اصلاح شده Flamm و همکارانش به دست آمد (۱۹). غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گرفته شد. عمل الکتروفورز در حرارت اتاق با غلظت ۱ درصد ژل آگاروز در محلول بافر TAE انجام شد. محلول بافر TAE شامل EDTA، Tris و اسید استیک بود. ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در زیر نور ماورای بنفش مشاهده و عکسبرداری گردید.

از DNAی SPP-1، باکتریوفاژ حاصل از باسیلوس سوبتیلیس که توسط Ecor-1 بریده شده بود به عنوان مارکر استفاده گردید.

تجربیات اولیه جهت یافتن بهترین شرایط برای انجام PCR صورت گرفت. سپس، ctpA در ۶۹ سویه لیستریا مونوسیتوژنز موجود در آزمایشگاه که قبلاً از مناطق متفاوتی (محیط اطراف، بیمار، لبنیات، گوشت قرمز و مرغ) جدا شده بود مورد جستجو قرار گرفت.

کیت پلاسمید (+) PGEM-7zf برای کلون کردن قطعات ژن ctpA به عنوان حامل (vector) به کار رفت (۲۰). اشریشیاکلی DH5-$\alpha$ به عنوان باکتری میزبان برای کلون کردن ژن در نظر گرفته شد. زیرا بررسیهای اولیه نشان داد که این باکتری فاقد ژن ctpA می‌باشد.

در این بررسی، ابتدا ژن ctpA از لیستریا، جدا شد (۸). پس از انجام PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز، ژن ctpA بوسیله فنل خالص گردید. در این حالت، DNA حاصل از PCR را که به روش استاندارد الکتروفورز شده بود از ژل آگاروز بدون استفاده از

اتیدیوم بروماید یا نور ماورای بنفش با تیغ استریل بریده شد. سپس یک میلی‌لیتر از فنل به هر گرم آگاروز افزوده شد و توسط ورتکس به خوبی مخلوط گردید و در حرارت °۷۰- سانتیگراد به مدت یک ساعت نگهداری شد. بعد از سانتریفوژ، کلروفوم را به آن اضافه کرده و سپس DNA با افزودن اتانول ۱۰۰ درصد به دست آمد. سپس، مطابق دستور کارخانه سازنده، قطعات خالص ژنهای ctpA به درون پلاسمید pGEM-T آن وارد شد (ligation). بعد با حرارت دادن سلولها و افزودن کلسیم، پلاسمیدهای حاوی ژن ctpA به درون سلولهای گیرنده (competent) E.coli DH5-$\alpha$ وارد گردید. پلاسمیدهایی که ژن ctpA به درون آنها الحاق شده بود در روی پلیت نوترینت آگار حاوی X-gal شناسایی گردید. کلنی‌های سفید رنگی که در پلیت X-gel رشد کرده بودند برداشته شد و در محیط نوترینت اگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. سپس، یک کلنی از پلیت حاوی آمپی‌سیلین برداشته شد، پس از جدا کردن ژن ctpA و انجام PCR، از کیت گرفت dye-terminator برای توالی کردن ژن ctpA مورد استفاده قرار گرفت (۲۱).

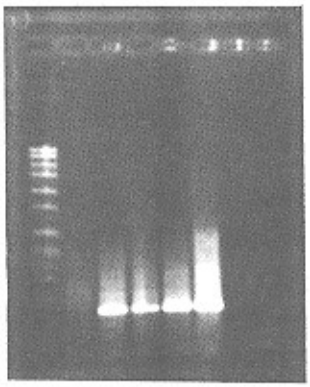
## یافته‌ها

تجربیات اولیه نشان داد که شرایط مناسب برای انجام PCR، غلظت ۲۵mM کلرور منیزیم در حرارت °۹۴ سانتیگراد (denaturation) به مدت ۳ دقیقه (یک چرخش)، °۵۵ سانتیگراد (annealing) به مدت ۳۰ ثانیه، °۷۲ سانتیگراد (extension) به مدت ۳ دقیقه (۳۰ چرخش) و °۷۲ سانتیگراد (stabilization) به مدت ۴ دقیقه (یک چرخش) می‌باشد (۲۲).

از ۶۹ سویه لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی، در ۳۸ درصد از موارد، بندی به اندازه ۵۵۸bp در ژل الکتروفورز به دست آمد. این ژن از ۹۰ درصد نمونه‌های کلینیکی جدا شده از لبنیات، ۸۵ درصد نمونه‌های محیطی و ۷ درصد نمونه‌های حاصل از گوشت قرمز و مرغ به دست آمد. نتایج نشان داد که اکثر نژادهای بیماریزا از لیستریامونوسیتوژنز بر روی ژل الکتروفورز حاوی ctpA بودند و سایر نژادهای غیربیماریزا، فاقد ژن ctpA بودند.

عمل هضم DNA ویژه ctpA با آنزیم اندوکلئاز با عمل برندگی به نام Hpa-1 انجام شد و دو باند به اندازه ۱۷۶ bp و ۳۲۸ bp در مقایسه با SPP-1 در ژل الکتروفورز یافت گردید که مجموع ۵۵۸bp (۰/۵۵۸ kbp) بود.

پس از عمل ligation و انتقال ژن ctpA به درون باکتری E.coli DH5-$\alpha$، حدود ۲۰۰ کلنی از باکتریهای اشرشیاکلی با پیدایش کلنی‌های آبی - سفید در روی محیط کشت حاوی X-gel (۴۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، برای شناسایی توانایی تولید بتاگالاکتوزیداز) از هم متمایز شدند. کلنی‌های سفید رنگی که حاوی ژن ctpA بودند (کلون مثبت)، برداشته شد و در سطح محیط کشت نوترینت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت گردید. سپس، DNA حاصل از باکتریهای ترانسفورم شده E.coil جدا شد و مجدداً پس از انجام PCR، ژن ctpA در روی ژل آگاروز خالص گردید و با استفاده از کیت dye-terminator و خالص کردن DNA ویژه ctpA، توالی کامل نوکلئوتیدی از ژن کلون شده تعیین گردید که به طور دقیق مشابه ژن ctpA وارده شده به اشرشیاکلی بوده است. این نتایج، انتقال کامل توالیهای نوکلئوتیدی از ژنهای ctpA از لیستریامونوسیتوژنز به اشرشیاکلی را نشان داد. در شکل ۱، باند ژن ctpA مشاهده شده بر روی ژل اگاروز در الکتروفورز نشان داده شده است.



شکل ۱: باند ژن ctpA مشاهده شده بر روی ژل آگاروز در الکتروفورز

## بحث

مقدار بسیار کم مس برای حیات تمام سلولهای زنده ضروری است اما چنانچه مقدار آن زیاد باشد برای سلول کشنده می‌باشد. به نظر می‌رسد که باکتریها نیز دارای یک سیستم انتقال یون هستند (۲۳) که در زنده ماندن باکتریها ضروری است. پروتئینهایی که در انتقال یون مس و کادمیم در سایر باکتریها دخالت دارندنیز گزارش شده است (۱۱، ۱۵). در هنگام عفونت، سلولهای ایوکاریوتی میزبان در معرض تغییرات عمده‌ای در غلظتهای عناصر کمیاب در سرم قرار می‌گیرند (۲۴). برای مثال، غلظت یون مس در کبد موش در هنگام عفونت انگلی به مقدار زیادی کاهش می‌یابد (۲۵، ۲۶). بنابراین لیستریامونوسیتوژنز ممکن است برای زنده ماندن مکانیزمهایی داشته باشد که مس را به وسیله عمل ctpA از سلولهای آلوده به دست آورد.

وجود ژن ctpA در لیستریامونوسیتوژنز برای پایداری و ایجاد بیماری در موش آلوده ضروری است (۱۸). چون وجود ژن ctpA در عفونتهای باکتری اهمیت دارد، توزیع ژن ctpA در بین ۶۹ سویه لیستریامونوسیتوژنز جدا شده از منابع مختلف موجود در دانشگاه آدلاید استرالیا بررسی شد. با استفاده از PCR، DNA ویژه ctpA در ۳۸ درصد آنها یافت شد. در حال حاضر، آنتی‌بیوتیکها به طور موثری در درمان لیستریوز انسانی به کار می‌روند (۲۷). آمپی سیلین، آموکسی سیلین و جنتامایسین، داروهای انتخابی برای درمان لیستریوز انسانی می‌باشند و آنتی بیوتیکهایی مانند کلرآمفنیکل و آزلوسیلین بر روی لیستریوز موثر نیستند. با وجود این، در حدود ۳۰ درصد از بیمارانی که قبلاً دارو مصرف کرده‌اند، ممکن است عفونت مجدد ظاهر شود (۲۸). توضیح احتمالی آن است که لیستریامونوسیتوژنز در درون سلول زندگی می‌کند و بدینوسیله، این باکتریها از در معرض آنتی بیوتیک قرار گرفتن محفوظ می‌مانند. در نتیجه، تعدادی از پژوهشگران در صدد ساختن

واکسنی در برابر لیستریامونوسیتوژنز می‌باشند تا محافظتی را در برابر این عفونت فراهم سازند. چون این باکتری، درون سلولی است، بنابراین، پاسخ ایمنی سلولی برای محافظت ضد میکروبی آن ضروری می‌باشد. در این صورت، ایمنی محافظتی بوسیله واکسن حاصل از سلولهای زنده حاصل می‌شود و واکسنهای تولید شده از پروتئینهای محلول و باکتریهای کشته شده معمولاً موثر نمی‌باشد (۲۹). اخیراً فقط دو واکسن زنده فعال در برابر پاتوژنهای درون سلولی مورد استفاده قرار گرفته است: یکی واکسن ب ث ژ حاصل از مایکوباکتریوم بویس (باسیل کالمت وگورین) بر علیه بیماری سل و دیگری واکسن Ty21a سالمونلاتایفی (۳۰) می‌باشد که محافظت را در برابر تیفوئید فراهم می‌سازد.

در این بررسی، انتقال ژن ctpA به درون E.coil DH5-$\alpha$ با موفقیت کامل انجام شد. در بررسیهای بعدی می‌توان این اشرشیاکلی را به موش خوراند تا آنتی بادی در برابر این باکتری که این کلون (ctpA) را در خود پناه داده است در بدن موش تولید کند. سپس، میزان ایمنی توسط این آنتی بادی را در موش می‌توان تعیین نمود. در آینده با وارد کردن این کلون به درون نژادهای مناسب می‌توان ایمونوژن خوراکی را در برابر لیستریامونوسیتوژنز به دست آورد.

## References


1. Lyytikjainen O, Autio T, Maijala R, Ruutu Honkanen-Buzalski T, Miettinen M, Hatakka M, Mikkola J, Anttila VJ, Johansson T, Rantala L, Aalto T, Korkeala H, Siitonen SA: An Outbreak of Listeria monocytogenes serotype 3a infections from butter in Finland. J Infect Dis 2000; 181(5): 1838-1841
2. Larson AE, Johnson EA, Nelson JH: Survival of Listeria monocytogenes in commercial cheese brines. J Dairy Sci 1999; 82: 1860-1868
3. Teo AYL, Knabel SJ: Development of a simple recovery enrichment system for enhanced detection on heat injured Listeria monocytogenes in pasteurized milk. J Food Protection 2000; 63(4): 462-472
4. Mclauchlin JA: Listeria monocytogenes, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J Appl Bacteriol 1987; 63: 1-11
5. Shannon AC, Carr LE, Mallinson ET, Lamichanne C, Rice BE, Rollins DM, Joseph SW: Development and evaluation of a 24 hour method for the detection and quantification of Listeria monocytogenes in meat products. J Food Protections 2000; 63: 347-353
6. Nieman RE, Lorber B: Listeriosis in adult: a changing pattern, Report of eight cases and review of the literature, 968-1978. Rev Infect Dis 1980; s 2: 207-227
7. Lorber B: Clinical listeriosis-implications for pathogenesis. In food-borne listeriosis. Miller AL, Smith J, Somkuti GA (eds). Elsevier science publications co, Amsterdam 1990; 41-49
8. Francis MS, Thomas CJ: Analysis of multiplicity of infection. J Med Microbiol 1996; 45: 323-330
9. Portnooy DA, Chakroborty T, Goebel W, Coosart P: Molecular determinants of Listeria monocytogenesis. Infect Immun 1992a; 60: 1263-1267
10. Sheehan B, Kocs C, Dramsi S, Gouin E, Klarsfeld AD, Mengaud J, Coosart P: Molecular and genetic determinants of the Listeria monocytogenes infectious process Curr. Top Microbiol Immunol 1994; 192: 182-216
11. Lebrun M, Audrier A, Cossart P: Plasmid-borne cadmium resistance genes in Listeria monocytogenes are to cadA of cadC of Staphylococcus aureus and are induced by cadmium. J Bacteriol 1994; 174: 3040-3048
12. Nucifore G, Chu L, Misra TK, Silver S: Cadmium resistance from Staphylococcus aureus plasmid p1258 cadA gene results from a cadmium efflux ATPase. Proc. Nalt Acad Sci USA 1989; 86: 3544-3548
13. Kanamaru K, Kashiwagi S, Mizuno T: The Cyanobacterium, Synechococcus sp. Pcc 7942. possess two distics genes encoding cation-transporting P-type ATPases. FEBS Letts 1993; 330: 99-104
14. Odermatt A, Suter H, Krapf R, Solioz M: Primay structure of two P-type ATPase involved in copper homeostasis in Enterococcus hirae. J Biol Chem 1993; 268: 12775-12779
15. Ge Z, Hirastsuka K, Taylor DE: Nucleotide sequense and mutational analysis indicate that two Helicobacter pylori genes enduce a P-type ATPase and cation-binding protein associated with copper transport. Mol Microbiol 1995; 15: 97-106
16. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitscheir J: Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. 1993; Nature Gene 5: 7-13
17. Bull PC, Thomas GR, Rummenes JM, Forbes JR, Cox DW: The wilson disaese gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. 1993; Nature Gene 5: 327-337
18. Francis MS, Thomas CJ: The Listeria monocytogenes gene ctpA encodes a putative P-type ATPase involved in copper transport. 1997; Mol Gen

Genet 253: 484-491
19. Flamm RK, Hinrichs DJ, Thomaslow MF: Introduction of pAM $\beta$1 into Listeria monocytogenes by conjugation homology between native L. monocytogenes. Plasmids Infect Immun 1984; 44: 157-161
20. Technical M: pGEM-T and pGEM-T easy vector system: Promega: Instruction for use of products. part# TM042, revised 7/79
21. The Perkin-Elmer Corporation: ABI Prism TM Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit with Ampli Tag DNA polymerase, FS, protocol P/N 402078. revision A. Aug 1995
22. Fitter S, Heuzenroeder MN, Thomas CJ: A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of Lisreia monocytogenes. J Appl Bacteriol 1992; 73: 53-59
23. Brown NT, Lee BT, Silver O: In metal ions biological system. Sigel H, Sigel A (eds). Dekker NY 1994; 405-434
24. Beisel WR: Magnitude of the host nutritional responses to infection. Am J Clin Nutr 1997; 30: 1236-1247
25. Matousek- be- Abel- be- la- Curz A, Burguera BurgueraJL,Burguera M, Anez N: Changes in the total content of iron, copper and zinc in serum, heart, liver, spleen and skeletal muscle tissues of rats infected with Trypanosoma cruzi. Biol Trace Elem Res 1993; 37: 51-70
26. Crocker A, Lee C, Aboko C, Durham C: Interaction isolates of nutrition and infection: Effect of copper deficiency on resistance to Trypanosoma lewisi. J Natl Med Assoc 1992; 84: 697-706
27. Marget W, Eeliger HPR: Listeria monocytogenes infection: Therapeutic Possibilities and problems. Infection 1988; 16: 5175-5177
28. Nieman RE, Lorber B: Listeriosis in adult: a changing pattern, report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. Rev Infect Dis 1980; 2: 207-227
29. Hess J, Kaufmann SHE: Vaccination strategies against intracellular microbes. FEMS Immunol Med Microbiol 1993; 7: 95-104
30. Germanier R: Isolation and characterization of gel mutant Ty21a of Salmonella typhi: a condidate for a live oral typhoid vaccine. J Infect Dis 1975; 141: 553-555