

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

سیدرضا حسینی دوست Ph.D.\*، اشرف محبتی مبارز Ph.D.\*

دانشگاه بقیه‌الله، گروه میکروبی‌شناسی

دانشگاه تربیت مدرس، گروه میکروبی‌شناسی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۷۷۷-۱۱۳۶۵، دانشگاه بقیه‌الله، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی

### چکیده

**هدف:** تغییرات ایجاد شده در الگوی پروتئینی و لیپوپلی ساکاریدهای لژیونلا پتوموفیلا 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 لژیونلاپنوموفیلا کلیه 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 داد که باکتریهای خارج سلولی فاقد آن بودند. آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد لژیونلا نشان داد که پروتئین جدید به طور ضعیف توسط آنتی بادی ضد لژیونلا شناسایی شده بود. بنابراین تعیین قطعی منشأ 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.

**کل 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 باخته‌های آزاد و نیز ماکروفاژها و منوسیت‌های انسانی را آلوده و درون آنها تکثیر کنند (۱). لژیونلا پنوموفیلا 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 آئروسول‌های آلوده ناشی از تجهیزات خنک‌کننده 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 باخته‌های آزاد را در طبیعت به عنوان میزبان انتخاب کرده و درون آنها زندگی می‌کند (۳). محیط امن و مطمئن 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 عفونی‌کننده 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.pneumophila* 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 منوسیت‌های انسانی نیز اتصال یافتند (۱۴). این نتایج نشان می‌دهند که MOMPs می‌توانند کمپلمان را از طریق آنترونیو 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 لیپولی 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 لژیونلا پنوموفیلا قبلاً از سیستم آب بیمارستان (۷) جدا شده بود. لژیونلا پنوموفیلا تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- سانتیگراد روی گلوله‌های شیشه‌ای نگهداری شد. هنگام انجام آزمایش، باکتری روی محیط جامد BCYE<sup>۱</sup> غنی شده با آل سیستین و فریک پیروفسفات پاساز و در دمای ۳۷ سانتیگراد در حضور گاز کربنیک (۵ درصد) گرمخانه گذاری شدند. سلول میزبان (آکانتامیا 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 جدا کردن 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 سانتریفیوژ (۱۱۶۰۰g به مدت ۲ ساعت در ۴ سانتیگراد) استحصال گردید (۱۳). پروتئین‌های دیواره سلولی توسط ژل SDS PAGE محتوی ۱۲ درصد و لیپولی ساکارید در ژل محتوی ۱۵ درصد آکریل آمید آنالیز شد. پس از انجام الکتروفورز ژل‌های پروتئین با روش کوماسی بلو و ژل LPS با روش نیترات نقره رنگ آمیزی و عکسبرداری شدند (۱۹).

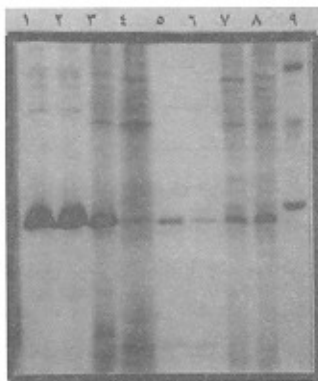
برای وسترن بلات از روش Tween و همکاران (۱۸) استفاده شد. به طور خلاصه، باندهای پروتئین هر بک از نمونه‌ها با آنتی سرم اختصاصی ضد *L. pneumophila* در سیستم وسترن بلات مجاور شدند. ابتدا باندهای پروتئین به کمک جریان الکتریکی (با فرم مخصوص

1. Bafferd Charcoal Yeast Extract

با توجه به اینکه رنگ نقره‌ای به طور یکنان 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 پروتیناز 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 بلواندهای مشاهده شده روی ژل SDS-PAGE نشان دهنده مقادیر نسی 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 باکتریهای 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) تفاوتی 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 ۲۷ سانتیگراد)؛ ۲: پروتئینهای لایه خارجی باکتری (رشد داخل سلولی در دمای ۲۰ سانتیگراد)؛ ۳: کل پروتئینهای دیواره سلولی باکتری (رشد خارج سلولی در دمای ۲۷ سانتیگراد)؛ ۴: کل پروتئینهای دیواره سلولی باکتری (رشد خارج سلولی در دمای ۲۰ 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: ماکروژن مولکولی (به ترتیب از بالا: ۶۶، ۲۵ و ۲۹)

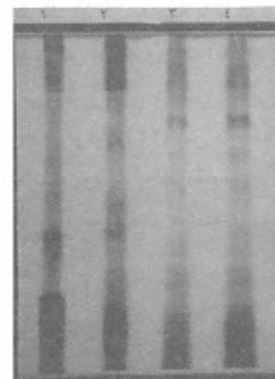
مشکل از ۱۹۲ میلی مول گلابسین، ۲۰ درصد متانول به مدت ۴ ساعت و با ولتاژ ۱۰۰ (از روی ژل SDS PAGE به غشای نیتروسولوز منتقل شد. سپس باندهای منتقل شده روی غشای نیتروسولوز توسط بافر TTBS (Tween-Tris Buffered, pH 7.4) بلوک شدند. واکنش بلات با آنتی سرم اختصاصی لژیونلا پنوموفیلا در دمای ۴ سانتیگراد و به مدت یک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

## یافته‌ها

به طور کلی نتایج حاکی از این است که زندگی داخل سلولی تغییراتی را روی الگوهای لیپوپلی ساکاریدی و پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا 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 پروتئینهای کمک پروتیناز 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 لیپوپلی ساکاریدی پنوموفیلا با شرایط مختلف رشد روی ژل SDS PAGE. ستون ۱ (۲۰ سانتیگراد)، ستون ۲: رشد خارج سلولی (۲۷ سانتیگراد)، ستون ۳: رشد داخل سلولی (ماکروفاژ)، ستون ۴: رشد داخل سلولی (آکانتامبا)

برای اینکه منشاء پروتئینهای جدید بیان شده تحت شرایط زندگی

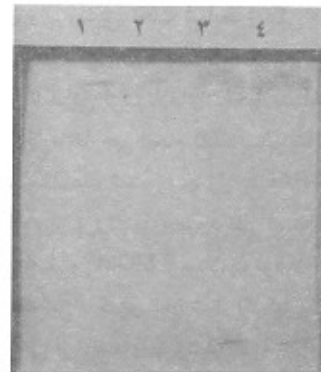


بعضی از همین پروتئینها مثل Major Secretary Protein (MSP) توانسته کوچکه هندی را علیه عفونت ناشی از آئروسولهای آلوده به *L. pneumophila* محافظت کنند (۱۴). بنابراین تغییر تراکم برخی از باندهای پروتئینی دیواره سلولی چنانچه مربوط به کاهش آنها در شرایط زندگی داخل سلولی لژیونلا باشد، می تواند این مطلب که پس از تکثیر داخل سلولی باکتری قدرت مهاجم بیشتری پیدا می کند (۱۲) را توجیه کند. ضمن آنکه راه را برای تحقیق بیشتر در مورد واکنش ایمنی علیه بیماری لژیونر هموار می سازد. در دمای ۲۰ سانتیگراد علیه غم فراوانی سلولهای میزبان در محیط کشت، تعداد لژیونلاهای داخل سلولی را می توان 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 پنوموفیلا پس از چند مرتبه پاساژ روی محیط مولر هینتون بیماریزایی خود را از دست می دهد (۲۱). از طرفی لژیونلاهای غیر بیماریزایی پس از کشت روی تخم مرغ جنین دار، سلولهای فیروپلاست یا کوچک هندی می تواند قدرت بیماریزایی را به آن برگرداند (۲۲). این در حالی است که یافته های قبلی نشان می داد که تغییر بیماریزایی این باکتری یک مسیر یک طرفی بوده و تغییر سوش بیماریزایی در شرایط معمولی نامحتمل است (۲۲، ۲۳). این گونه تغییرات در پاتوژنسیته باکتری را بعضی محققین به وجود یا عدم وجود کپسول پلی ساکاریدی نسبت می دهند ولی بعضی دیگر وجود و مقدار پروتئینهای لایه خارجی را در این امر دخیل می دانند. با این وجود بعضی از باکتریها به خوبی خود را با شرایط داخل سلولی وفق داده و به زندگی ادامه می دهند. زندگی داخل آمیبی تغییرات زیادی نیز روی لژیونلا باقی می گذارد از جمله اینکه باکتری متعاقب زندگی داخل سلولی مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد کرده (۸، ۱۰) و یا قدرت بیماریزایی آن افزایش می یابد (۲۴). همچنین لژیونلاهای داخل سلولی (در آمیب) روی محیط کشت رشد نکرده و برای تشخیص مشکلاتی به وجود می آورند و تنها به کمک روش می توان به وجودشان پی برد. در این تحقیق نشان داده شده که چگونه شرایط داخل سلول میزبان بر ترکیبات و مقدار پروتئینهای لایه خارجی لژیونلاهای داخل سلولی تاثیر گذاشته و باعث شده تا مقدار پروتئینها لیپولی ساکارید آن در مقایسه با باکتری آزاد تغییر یافته یا حتی پروتئینهای جدیدی در آن به وجود آید. این یافته ها با بعضی از تحقیقات دیگر نشان می دهد زندگی داخل آمیبی در بدست آوردن مجدد پاتوژنسیته لژیونلا پنوموفیلا (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 نا محدودی مکانیسم آن را بیان می دارد.

### تقدیر و تشکر

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

داخل سلولی مشخص شود، باندهای موجود روی ژل SDS-PAGE را از طریق وسترن بلات به غشای نیتروسولوز انتقال داده و با آنتی سرم (پلی والانت) ضد لژیونلا پنوموفیلا مجاور شد. در آنالیز تصویر ایمونوبلات مشاهده شد که آنتی سرم 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 السوی پروتئینهای لایه خارجی *L. pneumophila* در واکنش با آنتی سرم اختصاصی باکتری. ۱: پروتئینهای لایه خارجی (خارج سلولی) رشد در ۳۷ سانتیگراد؛ ۲: پروتئینهای لایه خارجی (خارج سلولی) رشد در ۲۰ سانتیگراد؛ ۳: پروتئینهای لایه خارجی (داخل سلولی - ماکروفاژ)؛ ۴: پروتئینهای لایه خارجی (داخل سلولی - آکنتامبا)

### بحث

نتایج این تحقیق نشان می دهد که شرایط داخلی سلول میزبان می تواند تغییراتی را در باکتری داخل سلولی به وجود آورد. این مطالعه توانایی لژیونلا پنوموفیلا برای زندگی و تکثیر داخل سلولی را نشان می دهد. لژیونلا پنوموفیلا از طریق ممانعت از اتصال فاگوزم-لیزوم سلول میزبان زنده می ماند. فاگوسیتوز در میان تک باخته های آزاد به عنوان یک فرآیند طبیعی و بیشتر به منظور تغذیه و تامین انرژی انجام می شود (۱۸) ولی در عین حال مکانیسمهای دفاعی و باکتری کشی در میان این تک باخته ها قابل توجه است. مشاهده تفاوت های متعدد در ترکیب ساختمانی دیواره سلولی باکتری در شرایط گوناگون رشد از دیدگاههای مختلف حائز اهمیت است. امروزه در تحقیقات مربوط به واکنش سازی واکسنهای محتوی یک یا چند مولکول و یا اپی تاپهای آنتی ژنی مورد نظر بوده و امتیازهای بالقوه ای 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 می توانند سیستم کمپلمان را تحریک کرده یا اینکه در خلال انکوئاسیون لژیونلا می توانند به جزء سوم کمپلمان متصل شود (۱۴، ۱۶). بنابراین پروتئینهای مذکور می توانند نقش فعال کننده کمپلمان را ایفا کرده و ضمناً نقش مهمی را در فاگوسیت شدن لژیونلا توسط مونوکلرها (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



## 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 Legionnaires' disease two decades later: Old sources, new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 1998; 26(2): 426-433
2. Blatt P, Dolani J, Hendrix W, Melcher P: Legionnaires' 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: Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passenger exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet*; 1996; 347(9000): 494-499
5. Jaraud S, Reyrolle M, Riffard S, Lo-Presti, Etienne J: Legionnaires' disease in travellers. *Bull-Sco-Pathol-Exot*; 1998; 91(5 Pt 1-2): 486-489
6. Dowling J, Saha A, Glew R: Virulence factor of the family Legionellaceae. *Microbiology Review*. 1992; 56(1): 32-60
7. Patterson W, Seal D, Curran E, Siclare T, Mc Luckej: Fatal nosocomial legionnaires' disease: relevance of contamination of hospital water supply by temperature dependent buoyancy-derived 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 Agents and Chemotherapy*, 1995; 39(12): 2648-2688
9. Cirilo D, Falkow S, Tompkins S: Growth of legionella in *Acanthamoeba* enhances invasion of legionella. *Infection 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-Antimicrob-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 susceptibility to chemical inactivation. *Applied Environmental Microbiology*, 1992; 58: 2420-2425
14. Krinos C, High S, Robgers G: Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence 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-independent binding of complement component C1q by *L. pneumophila*. *Infect. Immun*, 1995; 63(12): 4936-4943
17. Hosseini Doust R, seal D: Isolation of legionnaires' 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-Leeuwenhoek*, 1995; 68(3): 237-243
19. Ali Q, Davis R, Parton R, Coote J, Gibbs H: Lipopolysaccharidse of *P. heamolultica* isolates from cattle and sheep. *J General Microbiol* 1992; 183: 2185-2195
20. Towbin H, Steahelin T, Gordon J: Electrophoretic 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.pneumophila* a one- way phenomenon. *Infect Immun*1988; 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 monocytes and L929 cells correlate with virulence. Infect-Immun; 1996; 64(6): 1968-1976

24. Hacker J, Ott M, Ludwig B, Rdest U: Intracellular survival and expression of virulence determinants of Legionella pneumophila. Infection; 1991; 19Suppl4: S198-201

