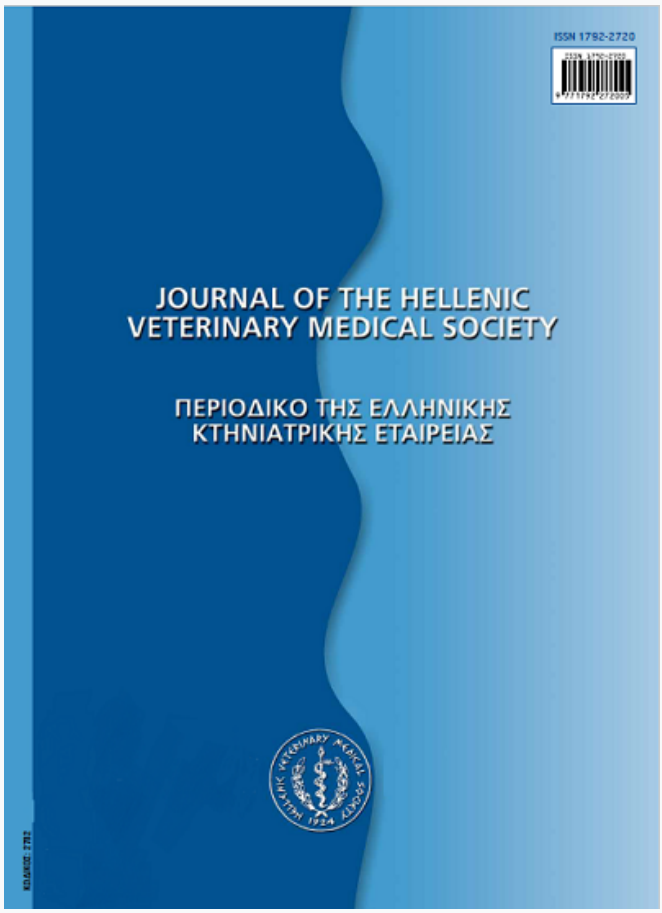
ePublishing
ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 57, Αρ. 4 (2006)



Μελέτη μικροβιολογικής διερεύνησης της μηνιγγοεγκεφαλίτιδας από λιστέρια στα μηρυκαστικά

A. GIANNATI-STEFANOU (Α. ΓΙΑΝΝΑΤΗ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ), P. TSAKOS (Π. ΤΣΑΚΟΣ), E. BOURTZI-HATZOPOULOU (Ε. ΜΠΟΥΡΤΖΗ-ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ), K. ANATOLIOTIS (Κ. ΑΝΑΤΟΛΙΩΤΗΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15048

Βιβλιογραφική αναφορά:

GIANNATI-STEFANOU (Α. ΓΙΑΝΝΑΤΗ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ) A., TSAKOS (Π. ΤΣΑΚΟΣ) P., BOURTZI-HATZOPOULOU (Ε. ΜΠΟΥΡΤΖΗ-ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ) E., & ANATOLIOTIS (Κ. ΑΝΑΤΟΛΙΩΤΗΣ) K. (2017). Μελέτη μικροβιολογικής διερεύνησης της μηνιγγοεγκεφαλίτιδας από λιστέρια στα μηρυκαστικά. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, *57*(4), 275–288. https://doi.org/10.12681/jhvms.15048

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2006, 57(4): 275-288
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2006, 57(4): 275-288

Ερευνητική
Original article

Μελέτη μικροβιολογικής διερεύνησης της μηνιγγοεγκεφαλίτιδας από λιστέρια στα μηρυκαστικά

Α. Γιαννάτη-Στεφάνου[1], Π. Τσάκος[2], Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου[3], Κ. Ανατολιώτης[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Διερευνήθηκε μικροβιολογικά η μηνιγγοεγκεφαλίτιδα των μηρυκαστικών από λιστέρια στη Βόρεια Ελλάδα. Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε στην απομόνωση της *Listeria monocytogenes* από εγκεφάλους βοοειδών, προβάτων και αιγών. Εξετάστηκαν 43 εκτροφές βοοειδών, 310 προβάτων και 976 αιγών, που θεωρήθηκαν ύποπτες της νευρικής μορφής της λιστερίωσης. Θετικές βρέθηκαν δύο εκτροφές βοοειδών (4,6%), 60 προβάτων (19,3%) και 361 αιγών (36,9%). Οι προσβεβλημένες εκτροφές αιγών ήταν στατιστικώς περισσότερες (P<0,05) από εκείνες των προβάτων. Όλα τα στελέχη, εκτός από δύο, απομονώθηκαν από ενήλικα ζώα και τα περισσότερα από αυτά τους μήνες Δεκέμβριο και Ιανουάριο. Από την οροτυπία 141 στελεχών λιστέριας διαπιστώθηκε ότι ο ορότυπος 4b ήταν ο επικρατέστερος (81%) και βρέθηκε σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα, όπου διαγνώστηκε η νόσος. Η φαγοτυπία 60 στελεχών βακτηρίου επέτρεψε την ομαδοποίηση τους σε αυτά που ανήκαν στον ίδιο ορότυπο και λύονταν από τον ίδιο φάγο ή από μία σειρά φάγων. Οι ομάδες αυτές βρέθηκαν κυρίως σε όμορα γεωγραφικά διαμερίσματα με ελάχιστες εξαιρέσεις. Το γεγονός αυτό δείχνει πιθανόν την κοινή προέλευση των στελεχών.

Λέξεις ευρετηρίασης: λιστερίωση, εγκέφαλοι μηρυκαστικών, οροτυπία, φαγοτυπία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λιστερίωση στην Ελλάδα αναφέρεται για πρώτη φορά το 1952 σε πρόβατα (Χριστοδούλου και Ταρλατζής 1952) και το 1973 σε αίγες (Φραγκόπουλος και συν. 1973) με τη μορφή της μηνιγγοεγκεφαλίτιδας. Από τότε έχουν γίνει διάφορες μελέτες σχετικά με τη νόσο

[1] Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας

[2] Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης

[3] Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία υποβολής: 05.07.2005
Ημερομηνία εγκρίσεως: 15.03.2007

Study of microbiological aspects of meningoencephalitis due to *Listeria* spp in ruminants

Giannati-Stefanou A.[1], Tsakos P.[2], Bourtzi-Hatzopoulou E.[3], Anatoliotis K.[2]

ABSTRACT. Microbiological aspects of meningoencephalitis due to *Listeria* spp in Northern Greece were studied. The diagnosis was based on the isolation of *Listeria monocytogenes* from bovine, sheep and goats brains. Forty three bovine herds, 310 sheep flocks and 976 goat herds, suspicious of the neural form of listeriosis, were examined and 2 (4.6%), 60 (19.3%) and 361 (36.9%) of them were found positive, respectively. It was ascertained statistically (P<0.05) that encephalitic listeriosis affects mostly goats than sheep. All strains, except two, were isolated from adult animals mostly in December and January. Serotyping of 141 strains showed that serovar 4b was predominant (81%) and was distributed among all the areas where listeriosis was detected. Phage typing of 60 strains allowed the clustering of strains, those belonging to the same serotype and phage lysed by the same phage or a series of phages. These groups were found mainly in bordering areas with few exceptions. This fact probably shows the common origin of these strains.

Key words: listeriosis, ruminant brain, serotyping, phagetyping

INTRODUCTION

The first case of listeriosis in sheep was reported in Greece in 1952 as meningoencephalitis (Christodoulou and Tarlatzis 1952). The disease was subsequently described in goats in 1973 as meningoencephalitis, as well (Fragopoulos et al. 1973). Several studies have been

[1] Veterinary Research Institute of Thessaloniki, National Agricultural Research Foundation, Greece

[2] Institute of Infectious and Parasitic Diseases, Centre of Veterinary Institutes of Thessaloniki, Greece

[3] Laboratory of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

Submission date: 05.07.2005
Approval date: 15.03.2007

στα μικρά μηρυκαστικά και διαπιστώθηκε ότι η νευρική της μορφή προσβάλλει κυρίως τις αίγες και λιγότερο τα πρόβατα (Γιαννάτη-Στεφάνου και συν. 1987, 1988, Γιαννάτη-Στεφάνου 1990). Η νοσηρότητα στις μολυσμένες εκτροφές κυμαίνεται μεταξύ 0,6-25,8% με μέσο όρο το 6% και η θνητότητα προσεγγίζει το 100% με μέσο όρο το 83,6% (Γιαννάτη-Στεφάνου 1990).

Στα βοοειδή η λιστερίωση διαγνώστηκε, επίσης, με μορφή μηνιγγοεγκεφαλίτιδας και απομονώθηκε η *Listeria monocytogenes* από τους προσβεβλημένους εγκεφάλους το 1995 (Γιαννάτη-Στεφάνου και συν. 1997).

Η νευρική μορφή της νόσου είναι, από τα όσα μέχρι τώρα γνωρίζουμε, η επικρατέστερη μορφή στην Ελλάδα, με ελάχιστες εξαιρέσεις σηψαιμίας σε νεογέννητα ερίφια, ενώ δεν αναφέρονται περιπτώσεις αποβολής από *L. monocytogenes* (Γιαννάτη-Στεφάνου και συν. 1988, Γιαννάτη-Στεφάνου 1990).

Στην παρούσα έρευνα διερευνήθηκαν μικροβιολογικά τα περιστατικά λιστερίωσης, που διαγνώστηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων και του Κέντρου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης σε μία περίοδο 31 ετών (1968-1998). Καταγράφηκαν σε ετήσια βάση ο αριθμός των εστιών, η γεωγραφική τους προέλευση, το είδος ζώου που προσβλήθηκε, η ηλικία του και η εποχή έξαρσης της νόσου. Περαιτέρω διενεργήθηκε η οροτυπία και η φαγοτυπία στελεχών *L. monocytogenes* και μελετήθηκε η γεωγραφική προέλευση των ορότυπων και των φαγότυπων 141 και 62 στελεχών, αντίστοιχα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά την περίοδο 1968-1998 εξετάστηκαν συνολικά 1.329 εγκέφαλοι, 43 βοοειδών, 310 προβάτων και 976 αιγών από ισάριθμες εκτροφές. Η εξεταζόμενη περίοδος των 31 ετών διαχωρίστηκε σε τρεις υποπεριόδους (ανά δεκαετία). Στην πρώτη δεκαετία (1968-1978) εξετάστηκαν 71 δείγματα εγκεφάλων προβάτων και 174 αιγών. Στη δεύτερη δεκαετία (1979-1988) εξετάστηκαν επτά δείγματα εγκεφάλων βοοειδών, 138 προβάτων και 532 αιγών. Στην τρίτη δεκαετία (1989-1998) εξετάστηκαν 36 δείγματα εγκεφάλων βοοειδών, 101 προβάτων και 270 αιγών. Οι εγκέφαλοι που εξετάστηκαν προέρχονταν από εκτροφές της Μακεδονίας και της Θράκης, που θεωρήθηκαν ύποπτες λιστερίωσης, με βάση μόνο τη νευρική μορφή της νόσου. Η εκδήλωση στα μηρυκαστικά συμπτωμάτων ενδεικτικών νευρικής νόσου, όπως μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, κυκλικές κινήσεις, στροφή της κεφαλής προς μία κατεύθυνση, σιαλόρροια, βλεφαρόπτωση και πτώση των ωτικών πτερυγίων, κρίσεις υπερδιέγερσης και κατάπτωσης, θεωρήθηκε επαρκής αφορμή για την αποστολή παθολογικού υλικού στο εργαστήριο και τη μικροβιολογική εξέτασή του για λιστέρια.

conducted on listeriosis affecting small ruminants and it has been found that encephalitic listeriosis affects mainly goats and less sheep (Giannati–Stefanou et al. 1987; 1988; Giannati–Stefanou 1990). The morbidity rate in affected flocks ranges from 0.6% to 25.8% with an average of 6% and the case fatality rate approaches 100% with an average of 83.6% (Giannati–Stefanou 1990).

Listeriosis in bovines was also detected in Greece as meningoencephalitis in 1995 and *L. monocytogenes* was isolated from the affected brains (Giannati–Stefanou et al. 1997).

The nervous form of the disease in Greece is predominant, as it results from the previous studies, with least exceptions of septicemia in newborn kids, but no case of abortion, due to *Listeria* spp, was reported (Giannati–Stefanou et al. 1988; Giannati–Stefanou 1990).

In this research, the incidents of meningoencephalitis due to *Listeria* spp in ruminants in Northern Greece have been studied. These incidents have been diagnosed in the microbiology laboratory of the Center of Veterinary Institutes and Veterinary Research Institute of Thessaloniki from 1968 to 1998. The microbiological aspects of listeriosis are recorded based on the number of incidents, their geographical origin, the species of the affected animals, the age and the season of outbreaks. Furthermore, the geographical serotype and phage type distribution of 141 and 62 *Listeria monocytogenes* strains, respectively, has been studied.

MATERIALS AND METHODS

During 1968–1998, 1.329 brains were examined in total, 43 from bovine, 310 from sheep and 976 from goat herds. The 31-year investigation was divided into three periods. During the 1st period (1968-1978) 71 sheep and 174 goat brains samples were examined. During the 2nd period (1979-1988) seven bovine, 138 sheep and 532 goat brain samples were examined. During the 3rd period (1989-1998) 36 bovine, 101 sheep and 270 goat brain samples were examined. The examined brains originated from animals suspicious of listeriosis, based only on nervous signs and belonged to herds of Macedonia and Thrace. The signs, suggestive of nervous system involvement as meningoencephalitis, circular movements, tendency to direct the head to one direction, drooling of saliva, eyelid and ear dropping, crisis of over excitation and depression, suggested that the pathological material should be sent to the laboratory and be investigated for listeria.

In all brain samples the same procedure of isolation was applied. One gr of ground spinal bulb, pons and parencephalis was cultured in 10 ml of Listeria Enrichment Broth (Oxford formulation, Oxoid). After

Σε όλα τα δείγματα εγκεφάλων μηρυκαστικών εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία απομόνωσης της λιστέριας. Συνολική ποσότητα 1gr λειοτριβήματος από τον προμήκη μυελό, τη γέφυρα και την παρεγκεφαλίδα ενοφθαλμίστηκε σε 10 ml του εμπλουτιστικού ζωμού λιστέριας LEB (Listeria Enrichment Broth, Oxford formulation, Oxoid). Μετά από 48ωρη επώαση το υλικό του εμπλουτιστικού ζωμού ανακαλλιεργήθηκε σε LSA (Listeria Selective Agar Base, Oxford formulation, Oxoid) (Hitchins 1998). Οι ύποπτες αποικίες απομονώθηκαν σε αιματούχο άγαρ και εξετάστηκαν μικροσκοπικά μετά από τη χρώση τους κατά Gram. Στη βιοχημική ταυτοποίηση που ακολούθησε, χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμές της οξειδάσης, καταλάσης, ινδόλης, ουρεάσης, η υδρόλυση της εσκουλίνης, η παραγωγή οξέων από τα σάκχαρα ξυλόζη, μανιτόλη, ραμνόζη, ραφινόζη και η δοκιμή CAMP με *Staphylococcus aureus* (Rocourt και συν. 1983, Rocourt 1999, Quinn και συν. 2002). Η ορολογική ταυτοποίηση έγινε με τη χρήση πολυδύναμου αντιορού Ο και μονοδύναμων τύπου 1 και 4 (Difco) (Seeliger και Hohne 1979).

Εκατόν σαράντα ένα (141) στελέχη *L. monocytogenes*, που απομονώθηκαν μεταξύ 1981-1998, στάλθηκαν στο Ινστιτούτο Υγιεινής και Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου του Würzburg για πλήρη οροτυπία. Εξήντα δύο (62) από αυτά τα στελέχη, 50 αιγών, 10 προβάτων και δύο βοοειδών, στάλθηκαν επιπλέον στο Ινστιτούτο Παστέρ για φαγοτυπία.

Η στατιστική ανάλυση ANOVA χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν αναλογικά οι εστίες λιστερίωσης που διαγνώστηκαν: α) μεταξύ των ετών 1968-1978, 1979-1988 και 1989-1998 και β) μεταξύ προβάτων και αιγών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τις 1.329 εκτροφές μηρυκαστικών, που εξετάστηκαν ως ύποπτες της νευρικής μορφής της λιστερίωσης, προσβεβλημένες βρέθηκαν οι 423 (31,8%). Ειδικότερα, από τις 43 εκτροφές βοοειδών που εξετάστηκαν, προσβεβλημένες βρέθηκαν οι 2 (4,6%), από τις 310 προβάτων οι 60 (19,3%) και από τις 976 αιγών οι 361 (36,9%).

Μετρήθηκαν κατά έτος οι εστίες λιστερίωσης που διαγνώστηκαν, τόσο συνολικά όσο και ξεχωριστά για τις εκτροφές βοοειδών, προβάτων και αιγών (πίνακας 1).

Στα πρώτα 11 έτη (1968-1978) οι εστίες λιστερίωσης είχαν διακύμανση μεταξύ 3-15 ετησίως. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερα σημαντική αύξηση (7-48) τη δεύτερη δεκαετία 1979-1988, που ήταν στατιστικώς σημαντική ($P<0,05$) σε σύγκριση με τις εστίες λιστερίωσης της πρώτης ($P=0,0025$) και τρίτης δεκαετίας 1989-1998 ($P=0,0341$). Μεταξύ του μέσου όρου του αριθμού των εστιών της πρώτης και της τρίτης δεκαετίας δεν πα-

48 hours of incubation, the broth culture was plated on LSA (Listeria Selective Agar Base, Oxford formulation, Oxoid) (Hitchins 1998). The suspected colonies were isolated on blood agar and identified applying the staining (Gram) method, morphological characteristics and biochemical tests: production of oxidase, catalase, indole, urease, hydrolysis of aesculin, acid from xylose, mannitol, rhamnose, raffinose and CAMP test *Staphylococcus aureus* (Rocourt et al. 1983; Rocourt 1999, Quinn et al. 2002), as well as serological tests by using polyvalent antiserum O and monovalent type 1 and 4 (Seeliger and Hohne 1979).

One hundred forty one (141) strains isolated after 1981 were submitted to the Institute für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg for a complete serotyping and 62 strains of them, 50 goats, 10 sheep and two bovine, were sent to the Pasteur Institute for phage typing.

Anova single factor analysis was used for the comparison of the mean incidents of listeriosis: a) in 1968-1978, 1979-1988 and 1989-1998 and b) among sheep and goats.

RESULTS

Four hundred twenty three out of 1.329 (31.8%) ruminants herds, suspected for the neural form of listeriosis, were found contaminated by *L. monocytogenes*. Particularly, two out of 43 (4.6%) bovine herds suspected for the disease, 60 out of 310 (19.3%) sheep flocks and 361 out of 976 (36.9%) goat herds were found contaminated by *L. monocytogenes*.

The yearly distribution of incidents due to *Listeria* spp within the period 1968–1998, as well as the distribution in relation to the species of animals, is shown in table 1.

It was observed that the incidence of listeriosis presented mildly fluctuations (3-15) during the first 11 years (1968–1978), but excess increase (7-48) during the second decade (1979–1988). This increase is statistically significant ($P<0.05$) in comparison with the first period ($P=0.0025$), as well as with the third decade 1989–1998 ($P=0.0341$). No significant difference ($P=0.0893>0.05$) was observed in the incidence between the first and last period (table 1, figure 1).

All isolated strains originated from adult animals except two of them; one (strain 40/95, table 3b) at which the microorganism was isolated from the brain of a four-month lamb, and the other one (strain 43/95, table 3b) from the brain of a calf, one year old.

According to the data of the monthly distribution of incidents due to *Listeria* spp within the period of 31

Πίνακας 1. Ετήσια καταγραφή των εστιών λιστερίωσης στη Βόρεια Ελλάδα.

Έτος	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	Σύνολο
Εκτροφές αιγών	6	3	4	4	8	12	8	8	11	5	5	7	6	11	14	43	35	25	27	16	17	18	16	4	9	1	1	5	12	15	5	361
Εκτροφές προβάτων			1	1					4	1	5		2	2	5	5	3	3					2			6	4	1	3	6	6	60
Εκτροφές βοοειδών																												2				2
Σύνολο	6	3	5	5	8	12	8	8	15	6	10	7	8	13	19	48	38	28	27	16	17	18	18	4	9	7	5	8	15	21	11	423

Table 1. The yearly distribution of incidents due to Listeria spp in Northern Greece.

Year	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	Total
Goat herds	6	3	4	4	8	12	8	8	11	5	5	7	6	11	14	43	35	25	27	16	17	18	16	4	9	1	1	5	12	15	5	361
Sheep flocks			1	1					4	1	5		2	2	5	5	3	3					2			6	4	1	3	6	6	60
Bovine herds																												2				2
Total	6	3	5	5	8	12	8	8	15	6	10	7	8	13	19	48	38	28	27	16	17	18	18	4	9	7	5	8	15	21	11	423

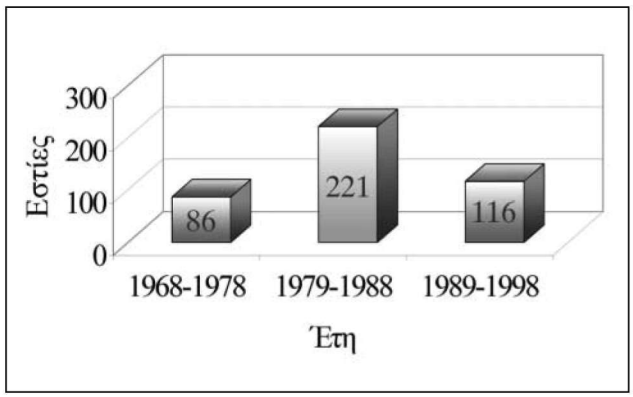
ρουσιάστηκε σημαντική διαφορά (P=0,0893>0,05) (πίνακας1, εικόνα1).

Οι προσβεβλημένες με τη νευρική μορφή της λιστερίωσης εκτροφές αιγών ήταν στατιστικώς σημαντικά περισσότερες (*P=0,0008*<0,05) από εκείνες των προβάτων.

Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν προήλθαν από εγκεφάλους ενήλικων ζώων, εκτός από δύο περιπτώσεις. Στη μία, ο υπεύθυνος μικροοργανισμός (στέλεχος 40/95, πίνακας 3β) απομονώθηκε από εγκέφαλο αμνού, ηλικίας 4 μηνών και στην άλλη (στέλεχος 43/95, πίνακας 3β) από εγκέφαλο μόσχου, ηλικίας ενός έτους.

Όπως διαπιστώθηκε από τη μηνιαία καταγραφή των εστιών λιστερίωσης, λαμβάνοντας υπόψη όλη την περίοδο των 31 ετών (εικόνα 2), το 54,6% (231/423) των εστιών λιστερίωσης εμφανίστηκε τους μήνες Δεκέμβριο και Ιανουάριο.

Όλα τα στελέχη (423) εξετάστηκαν με τις απαιτούμενες βιοχημικές δοκιμές και αποδείχθηκε ότι ανήκουν στο είδος της *L. monocytogenes*. Η πλήρης οροτυπία των 141 στελεχών έδειξε ότι: 114 (81%) ανήκουν στον ορότυπο 4b, 15 (11%) στον ορότυπο 1/2a, 6 (4%) στον ορότυπο 1/2b, 3 (2%) στον ορότυπο 1/2c και 3 (2%) στον ορότυπο 4d (πίνακας 2, εικόνα 3). Στον πίνακα 2 φαίνεται επιπλέον η γεωγραφική προέλευση των ορότυπων από τα 141 στελέχη της *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν την περίοδο 1981-1998.



Εικόνα 1. Εστίες λιστερίωσης στις τρεις υποπεριόδους των 31 ετών.

Figure 1. Incidents of listeriosis during the three subperiods of 31-year investigation.

years (figure 2), 54.6% (231/423) broke out in December and January.

All strains responded to the typical biochemical tests of *L. monocytogenes*. Serotyping showed that 114 out of 141 strains belonged to serovar 4b (81%), 15 to serovar 1/2a (11%), 6 to serovar 1/2b (4%), 3 to serovar 1/2c (2%) and 3 to serovar 4d (2%) (table 2, figure 3). The geographic distribution of the *L.monocytogenes* serovars isolated in period 1981-1998 is also shown in table 2.

Πίνακας 2. Γεωγραφική προέλευση των ορότυπων της *L. monocytogenes*.

Νομός	Ορότυπος				
	4b	4d	1/2a	1/2b	1/2c
Θεσσαλονίκη	57	2	3		1
Χαλκιδική	25	1	3	5	
Κιλκίς	5		2		
Πέλλα	2		1		
Δράμα	7		3		
Σέρρες	1		1		
Καβάλα	1		1	1	
Ξάνθη	3				
Ροδόπη					2
Έβρος	6		1		
Πιερία	3				
Κοζάνη	2				
Καστοριά	1				
Γρεβενά	1				
Σύνολο	**114**	**3**	**15**	**6**	**3**

Table 2. Distribution of serotype origin of *L. monocytogenes*.

County	Serotype				
	4b	4d	1/2a	1/2b	1/2c
Thessaloniki	57	2	3		1
Halkidiki	25	1	3	5	
Kilkis	5		2		
Pella	2		1		
Drama	7		3		
Serres	1		1		
Kavala	1		1	1	
Xanthi	3				
Rodopi					2
Evros	6		1		
Pieria	3				
Kozani	2				
Kastoria	1				
Grevena	1				
Σύνολο	**114**	**3**	**15**	**6**	**3**

Τα αποτελέσματα της φαγοτυπίας 62 στελεχών, καθώς και η αντιστοιχία των ορότυπων με τους φαγότυπους των στελεχών αυτών καταγράφονται στον πίνακα 3.

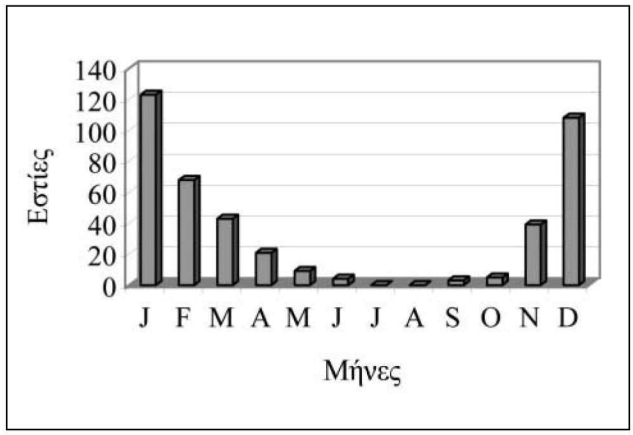
Το 87% (54/62) των στελεχών της *L. monocytogenes* τυποποιήθηκε με έναν ή περισσότερους φάγους, ενώ, όπως διαπιστώνεται από τον πίνακα 3, το 13% (8/62) των στελεχών δεν λύονταν από τους διαθέσιμους, στην έρευνά μας, φάγους.

Η γεωγραφική κατανομή στα παραπάνω 62 στελέχη των ορότυπων και των κοινών ομάδων φαγότυπων στα γεωγραφικά διαμερίσματα της Μακεδονίας και της Θράκης απεικονίζονται στους χάρτες 4 και 5, αντίστοιχα (εικόνες 4 & 5).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

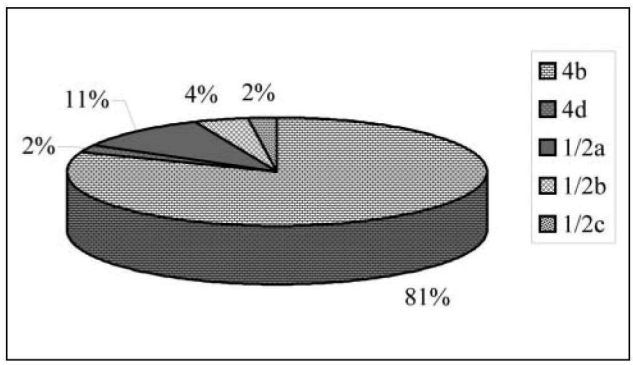
Οι μολυσμένες εκτροφές επιβεβαιώθηκαν με την εργαστηριακή καλλιέργεια και απομόνωση της *L. monocytogenes*. Επιπλέον, το 23% των περιστατικών μεταξύ 1986–1997 διαγνώστηκε και ιστολογικά στα πλαίσια επιδημιολογικής μελέτης των νευρικών νοσημάτων στην Ελλάδα (Leontides και συν. 1999).

Η εμφάνιση των περισσότερων εστιών της νευρικής μορφής της λιστερίωσης κατά τη δεύτερη δεκαετία είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Με βάση την επιδημιολογική εικόνα, η νόσος πιθανώς να οφείλεται σε συνδυασμό πολλών στρεσογόνων παραγόντων, όπως άσχημες καιρικές συνθήκες, κακή ποιότητα τροφής το χειμώνα, διατροφικές αλλαγές, κακές συνθήκες ενσταυλισμού, κατανάλωση ενσιρωμένης τροφής, αλλά και σε πολλούς άλλους παράγοντες, οι οποίοι δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν επακριβώς, αφού ακόμη δεν έχουν διευκρινιστεί στο σύνολό τους οι παράγοντες



Εικόνα 2. Μηνιαία καταγραφή των εστιών λιστερίωσης στην περίοδο των 31 ετών.

Figure 2. Monthly distribution of listeriosis incidents during the 31 year period.



Εικόνα 3. Ποσοστιαία αναλογία ορότυπων της *L. monocytogenes*.

Figure 3. Percentages of isolated serotypes of *L. monocytogenes*.

Πίνακας 3α. Λυτική δράση των φάγων στα απομονωθέντα στελέχη της *L. monocytogenes* του ορότυπου 4b.
Table 3a. Lytic action of the phages of isolated strains of *L. monocytogenes* of serogroup 4b.

Στέλεχος Strain	Είδος ζώου Animal	Ορότυποι Serotype	Φαγότυποι Phage types											
	S-Πρόβατα, G-Αίγες, B-Βοοειδή Sheep, Goat, Bovine													
10/84	G	4b	2425											
11/84	G	4b	2425											
18/84	G	4b	2425											
19/84	G	4b	2425											
38/84	G	4b	2425											
257/91	G	4b	2425											
508/91	G	4b	2425											
2/92	G	4b	2425											
29/93	G	4b	2425	3274	2671									
32/93	S	4b	2425	3274	2671									
64/84	G	4b	2389	2425	47	108	312							
69/84	G	4b	2389	2425	47	108	312							
70/84	G	4b	2389	2425	47	108	312							
505/91	G	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
16a/92	G	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
16b/92	G	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
14a/93	G	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
36/93	S	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
40/93	S	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
12/94	S	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
18/94	S	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
24/95	G	4b	2389	2425	3274	2671	47	108	340					
511/91	G	4b	2389	3552	2425	1444	1317	3274	2671	47	52	108	340	312
1/92	G	4b	2389	3552	2425	1444	1317	3274	2671	47	52	108	340	312
6/92	G	4b	2389	3552	2425	1444	1317	3274	2671	47	52	108	340	312
14/94	S	4b	2389	3552	2425	1444	1317	3274	2671	47	52	108	340	312
3/96	G	4b	2389	3552	2425	1444	1317	3274	2671	47	52	108	340	312
22b/96	G	4b	2389	3552	2425	1444	1317	3274	2671	47	52	108	340	312

που επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου (McLauchlin και συν. 1986, Johnson και συν. 1996, Rocourt και Bille 1997, Nightingale και συν. 2004). Παρόμοια σημαντική αύξηση των κρουσμάτων λιστερίωσης παρατηρήθηκε στην Αγγλία, όπου ο αριθμός των περιστατικών στα πρόβατα αυξήθηκε από 53 το 1976 σε περισσότερα από 230 το 1983 (Low και Linklater 1985). Επισημάνθηκε ότι η έκταση της λιστερίωσης έχει αλλάξει μορφή από τα μεμονωμένα περιστατικά σε ομαδικά κρούσματα στις εκτροφές (Low και Renton 1985, Low και Donachie 1997). Με μειωμένη την πρόσληψη ενσιρώματος από τα πρόβατα και τις αίγες στην Ελλάδα, όπως αυτή προκύπτει από το ιστορικό των μολυσμένων εκτροφών και την εμπειρία μας, η αύξηση των κρουσμάτων δεν μπορεί να οφείλεται στο ενσίρωμα. Η εκτί-

The results of the phage typing of 62 strains and the correspondence between the serovars and phagovars are shown on table 3.

According to the data of our investigation presented in table 3, 87% (54/62) of *L. monocytogenes* strains were phage typed by one or more phages, while 13% (8/62) were non typable.

The geographic distribution of the above serovars and the common groups of phage types in the counties of Macedonia and Thrace are represented in figures 3 and 4, respectively.

DISCUSSION

The infected herds have been detected in the

Πίνακας 3β. Λυτική δράση των φάγων στα απομονωθέντα στελέχη της *L. monocytogenes* των ορότυπων 4b, 1/2 a, 1/2 b, 1/2 c.
Table 3b. Lytic action of the phages of isolated strains of *L. monocytogenes* of serogroups 4b, 1/2 a, 1/2 b & 1/2 c.

Στέλεχος Strain	Είδος ζώου Animal	Ορότυποι Serotype	Φαγότυποι Phage types												
	S-Πρόβατα, G-Αίγες, B-Βοοειδή Sheep, Goat, Bovine														
39/95	G	1/2a	1967	10	43										
40/95	S	1/2a	1967	10	43										
26/95	G	1/2a	1967	575	1652	12029	10	43							
22a/96	G	1/2a	1967	575	1652	12029	10	43							
14/96	G	1/2b	10	43											
17/96	G	1/2b	10	43											
27/96	G	1/2b	10	43											
42/95	B	1/2c	4477												
43/95	B	1/2c	4477												
14/84	G	4b	1444	1317	2761	52	108	312	340						
22/84	G	1/2b	575												
24/84	G	4b	2425	1327	108	340									
26/84	G	4b	2389	47	108	340									
44/84	G	4b	2671												
51/84	G	1/2a	1967	43											
520/84	G	4b	247	3152	1444	1317	2671	108	340						
547/84	S	1/2c	12029												
778/84	G	4b	340												
17/92	G	4b	2425	340											
18/92	G	4b	3274	52	108	340									
38/92	G	4b	1444	1317	108	312									
84/92	G	4b	1317	108	312										
13/93	S	4b	2389	3552	1444	1317	3274	2671	47	52	107	108	340	312	
60/94	G	4b	3552	1444	1317	3274	2671	52	108	340	312				
15/95	G	4b	2389	3552	2425	1444	1317	3274	2671	47	52	107	108	340	312
28/96	G	1/2b	4477	10	43										
23/84	G	4b	Όχι τυποποίηση από φάγους Not typable												
37/84	G	4b	>>												
42/84	G	4b	>>												
47/84	G	4b	>>												
74/84	S	4b	>>												
910/84	G	4b	>>												
14b/93	G	4b	>>												
2/96	G	4b	>>												

μηση όμως αυτή δεν μπορεί να αξιολογηθεί αφού δεν υπάρχουν στοιχεία που να αφορούν στην απομόνωση του βακτηρίου από το ενσίρωμα και μάλιστα σε επαρκή αριθμό θετικών εκτροφών. Αντίθετα, σύμφωνα με στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας, τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης σχετίζονται αποδεδειγμένα με την πρόσληψη ενσιρώματος (Barlow 1983, Wilesmith και Gitter 1986, Gitter και συν. 1986, Takai και συν. 1990, Vazquez-Boland και συν. 1992, Wiedmann και συν. 1994).

laboratory by isolation of *L. monocytogenes*. A part of these (23%) in 1986–1997 had also been detected histologically, within the scope of a neurological disease survey in Greece (Leontides et al. 1999).

The excess increase of incidences due to *Listeria* spp during the second decade is difficult to be explained. According to the epidemiology of listeriosis, the disease is probably due to a combination of stress factors, as bad weather, bad quality of feeds in winter, dietary changes,

Εικόνα 4. Διασπορά των ορότυπων στη Βόρεια Ελλάδα (Μακεδονία και Θράκη).
Figure 4. Distribution of the main serotypes in Northern Greece (Macedonia and Thrace).

Από το σύνολο των μολυσμένων με *L. monocytogenes* εκτροφών η συντριπτική πλειοψηφία ανήκει σε εκτροφές αιγών και ακολουθούν εκείνες των προβάτων. Αυτό φαίνεται στον πίνακα 1, στον οποίο ο αριθμός των προσβεβλημένων εκτροφών αιγών υπερείχε κάθε χρόνο από εκείνον των προβάτων (1968–1998), εκτός από τα έτη 1978, 1993, 1994 και 1998. Η μεγαλύτερη ευαισθησία των αιγών στη L. monocytogenes σε σχέση με τα πρόβατα της Β. Ελλάδας επιβεβαιώθηκε και στατιστικά ($P=0,0008<0,05$), χρησιμοποιώντας τα στοιχεία που αφορούσαν στον αριθμό των προσβεβλημένων εκτροφών αιγών και προβάτων για κάθε έτος της έρευνάς μας. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε προηγούμενες μελέτες μας, στις οποίες το ποσοστό των μολυσμένων εκτροφών αιγών σε σχέση με εκείνο των προβάτων ήταν 95,5% (Γιαννάτη–Στεφάνου και συν. 1987) και 74,2% (Γιαννάτη–Στεφάνου 1990). Αντίθετα, σε άλλες μελέτες, επισημαίνεται ότι τα κρούσματα στις εκτροφές των προβάτων είναι συχνότερα από των αιγών (Buxton και Fraser 1977). Στην Αγγλία έχει αναφερθεί μεταξύ 1971–1982 αύξηση των κρουσμάτων λιστερίωσης στα πρόβατα και διακυμάνσεις στα βοοειδή, αλλά κανένα κρούσμα στις

poor housing conditions, consumption of silage and many other factors that cannot be determined until now (McLauchlin et al. 1986; Johnson et al. 1996, Rocourt and Bille 1997, Nightingale et al. 2004). In United Kingdom a similar rise in the listeriosis outbreaks was observed, where the incidents in sheep have increased from 53 in 1976 to more than 230 in 1983 (Low and Linklater 1985). It was noted that the extent of the listeriosis pattern has changed from isolated cases to larger flock outbreaks (Low and Renton 1985; Low and Donachie 1997). Because of the reduced consumption of silage by sheep and goats in Greece, as it results from the history of infected herds, as well as our experience, the increase of incidents may not be due to the silage. This estimation cannot be evaluated, because there are not any data related to the isolation of Listeria from the silage of contaminated herds. On the contrary, most outbreaks in other countries are associated evidently with the ingestion of silage (Barlow 1983; Wilesmith and Gitter 1986; Gitter et al. 1986; Takai et al. 1990; Vazquez-Boland et al. 1992; Wiedmann et al. 1994).

The majority of suspected cases of listeriosis and the respective incidences were goat herds followed by

Σύμβολο Symbol	Φαγότυποι Phagetypes
4b	2425
4b	2425, 3274, 2671
4b	2389, 2425, 47, 108, 312
4b	2389, 2425, 3274, 2671, 47, 108, 340
4b	2389, 3552, 2425, 1444, 1317, 3274, 2671, 47, 52, 108, 340, 312
1/2 a	1967, 10, 43
1/2 a	1967, 575, 1652, 12029, 10, 43
1/2 b	10, 43
1/2 c	4477

Εικόνα 5. Διασπορά των φαγότυπων και των αντίστοιχων ορότυπων στη Βόρεια Ελλάδα (Μακεδονία και Θράκη).
Figure 5. Distribution of common phage types and respective serotypes in Northern Greece (Macedonia and Thrace).

αίγες (Fenlon 1985). Στις ΗΠΑ η λιστερίωση δεν περιγράφεται συχνά στις αίγες (Johnson και συν. 1996) και σε πολλές περιπτώσεις που αναφέρονται διεθνώς η νόσος φαίνεται να είναι πιο συχνή στα πρόβατα απ' ότι στις αίγες (MacDonald και συν. 1972, Nilsson και

sheep flocks. This is shown in Table 1 in which goat outnumber sheep every year (1968–1998), except the years 1978, 1993, 1994 and 1998. The greater susceptibility to *L. monocytogenes* in goats than in sheep of Northern Greece country was demonstrated statistically

Soderlund 1974, Wilesmith και Gitter 1986).

Όσον αφορά στα περιστατικά της νευρικής μορφής της λιστερίωσης στις εξεταζόμενες εκτροφές βοοειδών ήταν σε ποσοστό μόλις 4,6%, κάτι που ίσως δικαιολογεί το γεγονός ότι η λιστερίωση στα βοοειδή αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα σχετικά πρόσφατα (Γιαννάτη–Στεφάνου και συν. 1997).

Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης παρατηρήθηκε επιπλέον ότι η νόσος σπάνια προσβάλλει τα νεαρά ζώα. Διαπιστώθηκε μόνο σε έναν αμνό ηλικίας 4 μηνών και ένα μόσχο ηλικίας ενός έτους. Θα ήταν σκόπιμο να διευκρινιστεί ότι λίγα από τα νευρολογικά περιστατικά που μελετήθηκαν αφορούσαν σε νεαρά ζώα, δεδομένου ότι είναι πιθανό αυτά να είναι φορείς που εκδηλώνουν το νόσημα αργότερα. Επίσης, είναι πιθανό να εκδηλώνουν λιστερίωση με κάποια άλλη μορφή. Σε άλλες χώρες αναφέρονται κάποιες περιπτώσεις επιζωοτίας της νευρικής μορφής της λιστερίωσης σε νεαρά μηρυκαστικά, αλλά παρόλα αυτά η νευρική μορφή της εξακολουθεί να θεωρείται νόσος των ενήλικων κυρίως μηρυκαστικών. Στη Βουλγαρία έγιναν μελέτες στη μηνιγγοεγκεφαλίτιδα από λιστέρια και περιγράφηκε η νόσος μεταξύ 1977 και 1983 σε 420 αμνούς ηλικίας μεταξύ 10 ημερών και έξι μηνών. Η λιστέρια απομονώθηκε σε 56 από τους 76 εγκεφάλους νεκρών αμνών (Burdarov και Savova–Burdarova 1987). Στη Σκωτία διαγνώστηκαν περιστατικά λιστερίωσης με συμπτώματα μηνιγγοεγκεφαλίτιδας σε αμνούς πέντε εβδομάδων. Συγκεκριμένα, προσβλήθηκαν εννέα αμνοί από τους 240, χωρίς ανάλογα συμπτώματα στα ενήλικα πρόβατα της εκτροφής. Η προσπάθεια συσχετισμού της νόσου με το ενσίρωμα απέβη αρνητική και η νόσος εικάζεται ότι εμφανίστηκε με αυτήν τη μορφή εξαιτίας στρεσογόνων παραγόντων που έλαβαν χώρα στη συγκεκριμένη περίοδο. Ο εξαιρετικά κρύος χειμώνας είχε ως συνέπεια τη μείωση τόσο της γαλακτοπαραγωγής των προβατίνων όσο και της πρόσληψης υγρής τροφής από τους αμνούς, αλλά ταυτόχρονα και την αυξημένη κατανάλωση ενσιρώματος, με αποτέλεσμα την απότομη αλλαγή της διατροφής των αμνών (Wardrope και Macleod 1983).

Περισσότερα δείγματα παθολογικού υλικού προσκομίστηκαν στο εργαστήριο μεταξύ Νοεμβρίου και Μαρτίου και ο μεγαλύτερος αριθμός το Δεκέμβριο και Ιανουάριο, αλλά σποραδικά ή σπάνια τους άλλους εαρινούς και θερινούς μήνες. Αυτό αποκάλυψε μία έντονη εποχικότητα στα κρούσματα της νευρικής μορφής της λιστερίωσης στη Β. Ελλάδα, όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Johnson και συν. 1996, Buxton και Fraser 1977).

Η οροτυπία των στελεχών της *L. monocytogenes* έδειξε ότι το 92% ανήκε στους ορότυπους 4b και 1/2a. Ο

($P=0.0008<0.05$). This finding has been confirmed in our previous studies as well, in which the percentage of the infected goat herds in relation to the sheep flocks was 95.5% (Giannati–Stefanou et al. 1987) and 74.2% (Giannati–Stefanou 1990). On the contrary, in other countries the incidents in sheep flocks are more common than in goat herds (Buxton and Fraser 1977). In Great Britain an increase of incidents in sheep and a fluctuation in bovine, but no incident in goats has been reported in 1971–1982 (Fenlon 1985). Listeriosis is rarely described in goats in the United States (Johnson et al. 1996) and in many outbreaks described world-widely the disease is more common in sheep than in goats (MacDonald et al. 1972; Nilsson and Soderlund 1974; Wilesmith and Gitter 1986).

Regarding the incidence of listeriosis in the examined bovine herds it was only 4.6%, since listeriosis in bovine was detected in Greece recently (Giannati–Stefanou et al. 1997).

In this study, it was also noted that the disease rarely has been observed in young animals. It infected only a four-month lamb and a one year old calf. According to the data of this investigation few neural cases refer to young animals, as it is possible that there are carriers that develop the disease later or they may develop listeriosis in another form. In other countries, serious epidemics occur in young ruminants, however, the neural form of listeriosis continues to affect mainly adult ruminants. In Bulgaria studies were conducted on meningoencephalitis due to *Listeria* spp and the disease was detected from 1977 till 1983 in 420 lambs aged between 10 days and 6 months. The infection was confirmed by isolating Listeria from the brain of 56 out of 76 dead lambs. (Burdarov and Savova–Burdarova 1987). In Scotland the outbreak of listeria meningoencephalitis in young lambs occurred in five–week old lambs. More specifically, nine out of 240 lambs were affected. No case of listeriosis occurred in ewes. Repeated attempts for the isolation of *L. monocytogenes* from silage proved negative. The incidence of clinical disease tended to occur in this form, which was possibly caused by stress factors during that particular period. The winter was severe and the cold weather may have caused a sudden decrease in the ewes' milk production. This, in turn, may have led lambs to decreased fluid intake and ingestion of larger silage quantities, leading to a sudden dietary change (Wardrope and Macleod 1983).

More pathological samples have been submitted to the laboratory from November to March, the maximum being in December and January, but occasionally or rarely during the other months of spring and summer. This revealed a strong seasonality in the outbreak of the

ορότυπος 4b στην έρευνά μας ήταν ο επικρατέστερος (81%) στα μικρά μηρυκαστικά, όπου διαγνώστηκε η νευρική μορφή της λιστερίωσης. Αυτός ο ορότυπος εξαπλώνεται από τη Δυτική Μακεδονία ως τη Θράκη και ανευρίσκεται σε όλους τους νομούς της Β. Ελλάδας από τους οποίους προέρχονται τα απομονωθέντα στελέχη. Στους περισσότερους επίσης νομούς συναντάται ο ορότυπος 1/2a, ενώ οι υπόλοιποι ορότυποι είναι σπάνιοι.

Στο Νότιο Μισούρι των ΗΠΑ, κατόπιν επιδημιολογικής αξιολόγησης, διαφάνηκε ότι ο ορότυπος 4 συνδέεται πολύ συχνά με τη νευρική μορφή της λιστερίωσης στα μικρά μηρυκαστικά (Johnson και συν. 1996). Στην Ουγγαρία, οι Ralovich και συν. (1986) έδειξαν ότι ο ορότυπος 1/2 ήταν ο κυρίαρχος στα στελέχη που απομονώνονταν από τα ζώα. Στην Αγγλία το 67% των στελεχών από πρόβατα ανήκε στον ορότυπο 1/2 και το 22% στον ορότυπο 4 (Audurier και συν. 1986) και σε μία άλλη μελέτη το 64,5% από 76 περιστατικά λιστερίωσης ανήκε στον ορότυπο 1/2a και μόνο το 18,4% στον ορότυπο 4b (Low και συν. 1993).

Οι Low και συν. (1992) θεωρούν ότι στελέχη της *L. monocytogenes* ορότυπου 1/2a με σχεδόν ίδιο ή ταυτόσημο προφίλ, που προκύπτει από φασματοφωτομέτρηση, εμπλέκονται σε διαφορετικά περιστατικά λιστερίωσης σε πρόβατα, ενώ στελέχη του ορότυπου 4b με σχεδόν ίδιο προφίλ από ηλεκτροφόρηση σχετίζονται με επιδημική νόσο σε ανθρώπους σε διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές (Bibb και συν. 1990).

Σε ότι αφορά στη φαγοτυπία, ήταν δυνατή η τυποποίηση στο 87% των στελεχών. Στα στελέχη των ομάδων του ορότυπου 4 και του ορότυπου 1/2 ήταν δυνατή η τυποποίηση στο 83,6% και στο 100% των στελεχών, αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τους φαγότυπους των στελεχών, παρατηρήθηκαν ομάδες από 2-9 στελέχη του ίδιου ορότυπου. Τα στελέχη της κάθε ομάδας λύονταν από τον ίδιο φάγο ή από μία σειρά φάγων. Δημιουργήθηκε, λοιπόν, μία ποικιλομορφία στις ομάδες. Δεν ξεχώριζαν τα στελέχη μέσα σε κάθε ομάδα, αλλά ξεχώριζαν από ομάδα σε ομάδα. Τα αδιαφοροποίητα στελέχη μίας τέτοιας ομάδας προέρχονταν από εκτροφές προβάτων και αιγών. Δεκαεπτά στελέχη λύονταν από διαφορετικούς μεταξύ τους φάγους, ενώ μόνο σε 8 (13%) δεν στάθηκε δυνατή η τυποποίησή τους από κάποιον από τους διαθέσιμους φάγους. Το πρόβλημα των μη λυθέντων από φάγους στελεχών είναι συχνό και αποτελεί αδυναμία της λυσιτυπίας, όπως προκύπτει και από τα ευρήματα άλλων μελετών. Όταν εξετάστηκαν 96 στελέχη *L. monocytogenes*, που απομονώθηκαν από νεκρά κοτόπουλα τεσσάρων πτηνοσφαγείων της Ισπανίας, το ποσοστό των μη λυθέντων από φάγους στελεχών ανήλθε στο 44,8%. Τα αντίστοιχα ποσοστά στα κλινικά δείγματα κυμαίνονται μεταξύ 14,8-48% και στα

neural form of listeriosis in Northern Greece, as it has also been noted by other researchers (Johnson et al. 1996; Buxton and Fraser 1977).

Serotyping of *L. monocytogenes* strains showed that 92% belong to serotype 4b and 1/2a. In our study, serotype 4b predominates (81%) in small ruminants, where the neural form of the disease was diagnosed. This serotype spreads from Western Macedonia to Thrace and is found in all counties of Northern Greece where the strains were isolated. Serotype 1/2a is met in several counties of Northern Greece, while the rest of the serovars are rare.

In South Missouri, USA, serotype 4 is most frequently associated with encephalitic listeriosis in small ruminants, as it results from an epidemiologic evaluation (Johnson et al. 1996). In Hungary, Ralovich et al. (1986) suggested that serovar 1/2 was the predominant strain isolated in animals. In Great Britain 67% of strains from sheep belonged to serovar 1/2 and 22% to serovar 4 (Audurier et al. 1986) and in another study 64.5% of 76 cases of listeriosis belonged to serovar 1/2 and 18.4% to serovar 4b (Low et al. 1993).

Low et al. (1992) consider that the strains of *L. monocytogens* of 1/2a serotype with almost the same or identical profile, resulting from spectrophotometry, are involved in different listeriosis outbreaks in sheep, while strains of serotype 4b with almost the same profile with electrophoresis are related to an epidemic disease in humans in different geographical areas (Bibb et al. 1990).

Concerning phage typing, 87% of the totally submitted strains were typeable. A percentage of 83.6 of serogroup 4 strains and 100% of serogroup 1/2 strains were typeable. Comparing the phage types of the strains, groups of 2 – 9 strains of the same serotype were observed. The strains of each group were phage lysed by the same phage or a series of phages. The strains did not distinguish among each other in each group, but from group to group. The undifferentiated strains of such a group originated from sheep and goats. Seventeen strains were phaged by different phages, while eight strains (13%) were non typeable by any of the available phages. The problem of non-typeable strains with phages is often and consists of a weakness of lysitype, as it results from the findings and of other studies. When 96 *L. monocytogenes* strains, isolated from chicken carcasses from four different slaughterhouses from Spain, were examined, the percentage of non-typeable strains was 44.8%. The respective percentage of typeability in clinical samples ranged between 14.8% and 48% and from food samples between 0% and 85.7% (Capita et al. 2002). In order to compare these results with ours we must take into account that the

δείγματα τροφίμων μεταξύ 0-85,7% (Capita και συν. 2002). Για να συγκρίνουμε τα ευρήματα των άλλων ερευνητών με τα δικά μας πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι όσο πιο μεγάλος είναι ο αριθμός των φάγων τόσο μεγαλύτερο θα είναι και το ποσοστό τυποποίησης. Το ποσοστό, λοιπόν, μπορεί να ανέλθει με τη χρησιμοποίηση πρόσθετων φάγων. Επιπλέον, έχει ιδιαίτερη σημασία και η γεωγραφική προέλευση των στελεχών. Είναι λογικό κάθε χώρα να έχει τη δική της σειρά φάγων ώστε να επιτυγχάνεται και μεγαλύτερο ποσοστό λυσιτυπίας.

Από τη χαρτογράφηση της γεωγραφικής θέσης των ομαδοποιημένων στελεχών που λύονταν από έναν ή περισσότερους κοινούς φάγους διαπιστώνεται ότι τέτοιες ομάδες βρίσκονται σε γειτονικούς νομούς, όπως Κιλκίς, Θεσσαλονίκης και Χαλκιδικής ή Δράμας και Ξάνθης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εύκολα από τη μεγάλη πιθανότητα μετακίνησης ζώων μεταξύ όμορων νομών (αγοροπωλησίες, κοινοί τόποι βόσκησης), τα οποία, είτε ως φορείς είτε ως μολυσμένα, μεταφέρουν το στέλεχος από τον ένα νομό στον άλλο ή ακόμη μπορεί να υπάρχει κοινή πηγή μόλυνσης.

Απ' την άλλη μεριά βρέθηκαν και ομάδες στελεχών που λύονται από κοινούς φάγους και βρίσκονται σε πολύ απομακρυσμένους μεταξύ τους νομούς, όπως Έβρο και Κιλκίς ή Έβρο και Θεσσαλονίκη ή Χαλκιδική (απόσταση 400 Km). Αυτό είναι δύσκολο να εξηγηθεί και πιστεύουμε ότι μπορεί να είναι ένας από τους πολλούς λόγους για τους οποίους η επιδημιολογία της λιστερίωσης δεν θεωρείται απόλυτα διευκρινισμένη (McLauchlin και συν. 1986, McLauchlin 1987, Nightingale και συν. 2004). Επιπλέον, βρέθηκαν και ομάδες στελεχών εντοπισμένες σε ένα μόνο νομό, όπως Ροδόπης ή Δράμας ή Χαλκιδικής, χωρίς να έχουν περάσει τα σύνορα του νομού.

Σε ότι αφορά στη φαγοτυπία των στελεχών των δύο βοοειδών φαίνεται ότι τα στελέχη αυτά ανήκουν στον ορότυπο 1/2c και λύονται από τον ίδιο φάγο (4477). Αυτό εξηγείται, όπως προκύπτει και από προηγούμενη έρευνα (Γιαννάτη–Στεφάνου και συν. 1997), από το γεγονός ότι οι δύο μονάδες βοοειδών από τις οποίες απομονώθηκε η L. monocytogenes βρίσκονταν σε άμεση γειτνίαση και ανήκαν σε συγγενείς κτηνοτρόφους. Ήταν δυνατή, λοιπόν, η μετάδοση του ίδιου στελέχους από τη μία ομάδα στην άλλη. Τα δύο στελέχη δεν έχουν καμία σχέση με οποιοδήποτε άλλο στέλεχος κάθε προέλευσης (βοοειδούς, προβάτου ή αίγας) και το μοναδικό στέλεχος (No 547/84) που ανήκει στον ίδιο ορότυπο (1/2c) με αυτά έχει τελείως διαφορετικό λυτικό φάσμα. Παραμένει, λοιπόν, το ερώτημα σχετικά με την προέλευση των στελεχών από τα οποία μολύνθηκαν τα βοοειδή. Η περιοχή που ζούσαν τα μολυσμένα βοοειδή είναι απομονωμένη στην οροσειρά της Ροδόπης.

larger the number of phages, the larger the percentage of phage typeable strains is. The percentage may be increased by the use of additional phages. In addition, the geographical origin of the strains is very important. It is logical that each country is interested in having its own set of phages, in order to achieve higher percentages of typeability.

Mapping the geographic location of the groups with common phage typed strains revealed the presence of those groups in bordering counties, such as in Kilkis, Thessaloniki and Halkidiki or Drama and Xanthi. This is possibly due to the movements of animals to neighboring counties (purchase, common pastures) leading to the transmission of strains by carriers or infected animals from one county to the other or may represent a common source of contamination.

On the other hand, some groups of strains were found in counties far from each other, as Evros and Kilkis or Evros and Thessaloniki or Halkidiki (distance of about 400 Km). This is difficult to explain and it is believed that it can be one of the several reasons for which epidemiology of listeriosis is not completely clarified (McLauchlin et al. 1986; McLauchlin 1987; Nightingale et al. 2004). Furthermore, single groups were found within the border of only one county, such as Rodopi or Drama or Halkidiki.

Concerning the two bovine strains, these belong to serotype 1/2c and are phage lysed by the same phage (4477). This is explained, as it results from a previous study (Giannati–Stefanou et al. 1997), by the fact that the two herds, from which the above strains have been isolated, were neighboring and their owners were relatives, so they could transmit the microorganism from one herd to the other and vice versa. These strains are absolutely different from any other strains of any species and the only strain (No 547/84) that belongs to the same serotype (1/2c) is phage lysed by a completely different phage. Therefore, the question concerning the origin of the strains from which the bovines were infected remains. The region, where the infected bovine herds lived, is isolated on the mountain chain of Rodopi. This land topology constitutes a barrier for the passage of strains from other neighboring counties. But the mountain chain of Rodopi borders to Bulgaria, thereby it is possible that the bovine strain, that has not been detected elsewhere in Northern Greece, originates from Bulgaria.

Concerning the rare serotype 1/2b, phage typing showed that three out of the five strains were undifferentiated, while two differed. All of them originate from Halkidiki, except one (No22/84) that was isolated in the nearby county of Kavala.

Another observation which results from serotyping

Η διαμόρφωση του εδάφους αποτέλεσε φραγμό για τη δίοδο στελεχών από άλλους όμορους νομούς. Είναι, λοιπόν, πιθανό το στέλεχος από το οποίο μολύνθηκαν τα βοοειδή στη συγκεκριμένη περιοχή και το οποίο δεν διαπιστώθηκε πουθενά αλλού στη Β. Ελλάδα, να προέρχεται από τη γειτονική Βουλγαρία, με την οποία συνορεύει η οροσειρά της Ροδόπης.

Σε ότι αφορά στο σπάνιο ορότυπο 1/2b, από τα πέντα στελέχη που ανήκαν στον ορότυπο αυτό η φαγοτυπία έδειξε ότι τα τρία δεν ξεχωρίζουν μεταξύ τους, ενώ τα δύο διαφέρουν. Προέρχονται όλα από αίγες του νομού Χαλκιδικής, εκτός από ένα (No 22/84) που απομονώθηκε από τη σχετικά κοντινή περιοχή της Καβάλας.

Άλλη μία παρατήρηση που προκύπτει από την οροτυπία και τη φαγοτυπία είναι ότι μέσα στην ίδια εκτροφή αιγών βρέθηκαν διαφορετικά στελέχη του ίδιου ορότυπου (22a/96, 22b/96) και άλλα που διαφέρουν και στον ορότυπο και στο φαγότυπο (14a/93, 14b/93). Διαφορετικοί ορότυποι μέσα στην ίδια εκτροφή έχουν διαπιστωθεί επίσης και από άλλους ερευνητές (Low και συν. 1993, Gudmundsdottir και συν. 2004).

Το συμπέρασμα από αυτήν την τριακονταετή μελέτη είναι ότι μία έρευνα σε βάθος θεωρείται απαραίτητη για όλους τους παράγοντες που προδιαθέτουν, ώστε τα κρούσματα της νόσου να μπορούν όχι μόνο να εξηγηθούν εξ' ολοκλήρου, αλλά κυρίως να αντιμετωπιστούν και να αποτραπούν.

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε το Ινστιτούτο Υγιεινής και Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου του Würzburg για την οροτυπία και το Ινστιτούτο Pasteur για τη φαγοτυπία των στελεχών της *L. monocytogenes.* ❑

and phage typing is that different strains with the same serotype (22a/96, 22b/96) and others that differed both in sero type and phage type (14a/93, 14b/93) were detected at a goat herd. Similarly, different serotypes were found in the same flock by other researchers (Low et al. 1993, Gudmundsdottir et al. 2004).

Conclusively, it is believed that a research in depth is necessary for all predisposing factors, so that the outbreaks of the disease are not only to be explained in whole, but mainly must be treated and prevented.

Acknowledgements

We should like to acknowledge the help of the Institute für Hygiene und Microbiologie der Universität Würzburg for the serotyping and the Pasteur Institut for the phagetyping of *L. monocytogenes* strains. ❑

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

Audurier A, Gitter M, Raoult A (1986) Listeriose, Listeria, Listeriosis. Proceedings of the 9th International Symposium, (eds) AL Courtieu, EP Espaze, AE Reynaud, Universite de Nantes:410

Barlow RM (1983) Listeriosis. In: Diseases of sheep (eds) WB Martin. Blackwell Scientific Publications, London:79-81

Bibb WF, Gellin BG, Weaver R, Schwartz B, Plikaytis BD, Reeves MW, Pinner RW, Broome CV (1990) Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. Appl Environ Microbiol, 56:2133-41

Burdarov I, Savova–Burdarova S (1987) Seasonal dynamics and prophylaxis of the meningoencephalitic form of listeriosis in lambs. Vet Med Nauki, 24:23-27

Buxton A, Fraser G (1977) Animal Microbiology. Blackwell Scientific Publication, London, (Vol 1):189-193

Capita R, Alonso-Clleja C, Mereghetti L, Moreno B, del Camino M (2002) Evaluation of the international phage typing set and some experimental phages for typing of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. J Appl Microbiol, 92:90-96

Christodoulou TH, Tarlatzis K (1952) Sheep listeriosis in Greece. Bul Hel Vet Med Soc, 6:65-83

Fenlon DR (1985) Wild birds and silage as reservoirs of Listeria in the agricultural environment. J Appl Bacteriol, 59:537-553

Fragopoulos A, Papadopoulos H, Simos E, Geralexis B (1973) An outbreak of caprine listeriosis in Epirus (Greece). Bul Hel Vet Med Soc, 24:216-224

Giannati–Stefanou A (1990) Epidemiological data on small ruminant listeriosis in Greece. In: Proceeding of the 5th Hellenic Veterinary Medical Congress, Thessaloniki:202-203

Giannati–Stefanou A, Dimareli–Malli Z, Xenos G, Laspidis C (1987) A report on the latest findings of listeriosis in Greece. In: Proceedings of the 4th Hellenic Veterinary Medical Congress, Athens:139-140

Giannati–Stefanou A, Leontides S, Psychas V, Mavrides Th (1997) Listeriosis: Meningoencephalitis in bovine. Bul Hel Vet Med Soc, 48:188-197

Giannati–Stefanou A, Xenos G, Dimarelli–Malli Z (1988) Epidemiological data on sheep and goat listeriosis in Greece. In: Proceeding of the 13th National Microbiology Congress, Thessaloniki:148

Gitter M, Stebbings RS, Morris JA, Hannam D, Harris C (1986) Relationship between ovine listeriosis and silage feeding. Vet Rec, 118:207-208

Gudmundsdottir KB, Aalbaek B, Sigurdarson S, Gunnarsson E (2004) The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms. J Appl Microbiol, 96:913-921

Hitchins AD (1998) Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, chap 10. In: Bacteriological Analytical Manual, 8th ed, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, U. S. Food and Drug Administration

Johnson GC, Maddox CW, Fales WH, Wolff WA, Randle RF, Ramos JA, Schwartz H, Heise KM, Baetz AL, Wesley IV, Wagner DE (1996) Epidemiologic evaluation of encephalitic listeriosis in goats. J Am Vet Med Assoc, 208:1695-1699

Leontides S, Pcychas V, Argyroudis S, Giannati-Stefanou A, Paschaleri-Papadopoulou E, Manousis T, Sklaviadis T (1999) A survey of more than 11 years of neurologic diseases of ruminants with special reference to transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in Greece. J Vet Med B, 46:1-7

Low C, Linklater K Listeriosis in sheep (1985) "In Practice" (Supplement to the Veterinary Record), March

Low JC, Chalmers R, Donachie W, Freeman R, McLauchlin J, Sissons P (1992) Pyrolysis mass spectrometry of Listeria monogytogenes isolates from sheep. Res Vet Sci, 53:64-67

Low JC, Donachie W (1997) Review: A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Vet J, 153:9-29

Low JC, Renton CP (1985) Septicaemia, encephalitis and abortions in a housed flock of sheep caused by *Listeria monocytogenes* type 1/2. Vet Rec, 116:147-150

Low JC, Wright F, McLauchlin J, Donachie W (1993) Serotyping and distribution of Listeria isolates from cases of ovine listeriosis. Vet Rec, 133:165-166

MacDonald DW, Wilton GS, Howell J, Klavano GG (1972) *Listeria monocytogenes* isolations in Alberta 1951–70. Can Vet J, 13:69-71

McLauchlin J (1987) *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J Appl Bacteriol, 63:1-11

McLauchlin J, Audurier A, Taylor AG (1986) Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britains 1967–1984; the use of serotyping and phage typing. J Med Microbiol, 22:367-377

Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, McDonough PL, Wiedmann M (2004) Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl & Envir Microbiol, 70:4458-4467

Nilsson O, Soderlund O (1974) *Listeria monocytogenes* isolated from animals in Sweden during 1958 – 1972. Nord Vet, 26:248-255

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ and Leonard FC (2002) Listeria species Chapter 13. In: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science Ltd

Ralovich B, Audurier A, Hajtos I, Berkessy E, Pitron-Szemeredi M (1986) Comparison of Listeria serotypes and phage types isolated from sheep, other animals and humans. Acta Microbiol Hung, 33:9

Rocourt J (1999) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 2nd ed, ET Ryser, EH Marth (Eds), Marcel Dekker, Inc, New York,:1-20

Rocourt J, Bille J (1997) Foodborne listeriosis. World Health Stat Q 50:67-73

Rocourt J, Schrettenbrunner A, Seelinger HPR (1983) Differenciation biochimique des groupes genomiques de *Listeria monocytogenes* (sensu lato). Ann Microbiol (Institut Pasteur), 134A :65-71

Seeliger HPR, Hohne K (1979) Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In Méthods in Microbiology 13 eds Bergan, T. and Norris, J.R. pp. 31-49. New York: Academic Press

Takai S, Orii F, Yasuda K, Inoue S, Tsubaki S (1990) Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk and its environment at dairy farms in Japan. Microbiol & Immunol, 34:631-634

Vazquez-Boland JA, Dominguez L, Blanco M, Rocourt J, Fernandez-Garayzabal JF, Gutierrez CB, Tascon RI, Rodriguez-Ferri EF (1992) Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new Listeria-selective enumeration medium and phage typing. Am J Vet Res, 53: 368-371

Wardrope DD, Macleod NSM (1983) Outbreak of Listeria meningoencephalitis in young lambs. Vet Rec, 113:213-214

Wiedmann M, Czajka J, Bsat N, Bodis M, Smith MC, Divers TJ, Batt CA (1994) Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreaks of listerial encephalitis in small ruminants. J Clin Microbiol, 32:991-996

Wilesmith JW, Gitter M (1986) Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain. Vet Rec, 119:467-470