

**BALIKESİR YÖRESİNDE SİNİRSEL SEMPTOM  
GÖSTEREN KOYUNLARDA LİSTERİA ENCEPHALİTİS  
TEŞHİSİ**

**DIAGNOSIS OF LISTERIA ENCEPHALITIS  
CHARACTERISED BY NERVOUS SYMPTOMS IN  
SHEEP IN BALIKESİR REGION**

Emine AKSOY\*

Kabul Tarihi: 07.04.1999

---

**1. ÖZET**

Bu çalışma Balıkesir ilinde koyunlarda, sinirsel semptomlarla seyreden hastalığın incelenmesi amacıyla yapıldı. Formolde tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış beyin dokusunda, histopatolojik ve immunoperoksidaz boyama teknikleri kullanılarak, *Listeria encephalitis* tespit edildi. Histopatolojik olarak karakteristik lezyonlar, pons cerebri, cerebellum, m. oblongatada görüldü. Streptavidin-biotin immunoperoksidaz boyamalarda; mikroapselerin şekillendiği odaklarda, lökositlerin ve az olarak da makrofajların sitoplazmaları içinde, *Listeria monocytogenes* antijeni tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** *Listeria encephelitis*, koyun

**SUMMARY**

In this study the disease which is characterised by nervous symptoms in sheep in Balıkesir province was investigated. *Listeria encephalitis* was detected in formaline fixed and paraffin embedded brain tissues using by histopathologic and immunoperoxidase methods. Typical histopathological lesions were observed in pons cerebri, cerebellum, m.oblongata. *L. monocytogenes* antigens were determined in leucocytes and macrophages in the microabscesses foci. In streptavidin-biotin immunoperoxidase stained slides bacterial antigens were less in macrophages than leucocytes.

**Key words:** *Listeria encephalitis*, sheep

---

\* Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Patoloji Laboratuvarı, ETLİK

## GİRİŞ

*Listeria monocytogenes* fakültatif intrasellüler bir bakteridir. Tropik bölgeler dışında tüm dünyada; hasta ve sağlıklı, insan ve hayvanlardan izole edilmektedir (1,10,11).

Enfeksiyon üç ayrı hastalık veya sendrom şeklindedir. Her sendromun farklı bir patogenesisi vardır. Bunlar gebe uterusu abortus, visseral organlarda apse formasyonu ile karakterize septisemi ve ensefalitis formlarıdır (7,10) Bazı araştırmacılar mastitis ve prulent konjunktivitisi de ilave ederek, bu sendromları beş kategoride incelemektedirler (11). Göz bulguları bazı yazarlarca abort formunun içinde değerlendirilmekte ve silaj tozundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Neonatal enfeksiyon ise uterus enfeksiyonunun devamı olarak kabul edilmektedir (10 ).

*L. monocytogenes*'in beyin stemine affinitesi vardır. Lezyonlar daha çok medulla ve ponda daha az olarakta talamusun anterior'ü, ve spinal cort'un servikal bölümünün posterior'ündedir (3,4,5,9,16). İntravenöz, intraperitoneal, intra gastrik ve oral inokülasyonlarla, lenfoid dokularla (dalak, lenf yumruları), karaciğer ve bağırsaklar etkilenmekte, ancak beyinde her zaman encephalitis şekillenmemektedir (10,12,13). Deneysel enfeksiyonlarda: *Listeria encephalitis* tipik dağılımını, konjunktival ve intranasal insitilasyon veya fasial dokuya enjeksiyon durumunda gösterir. Etkenin beyin stemi fibrilleri, medullar nöyonlar yanında, trigeminal sinirin myelinize aksonunda demostre edilmesi, giriş yolu hakkında bilgi vermektedir. Bu durumda, mukoza ve derideki fiziksel yaralanmaların (bitki sapları ile dış etlerinin zedelenmesi gibi) hazırlayıcı sebep olabileceği düşünülmektedir (3,4,10).

*Listeria encephalitiste* şekillenen klinik bulgular; mental konfuzyon, depresyon ve paralizler şeklindedir. Karakteristik olarak kafa rotasyon olmadan bir tarafa deviasyon gösterir. 7 ci sinirdeki paralizden dolayı gözkapağı ve dudaklarda düşme görülür. Ayrıca maskülatör kas ve farinksde paraliz şekillenebilir (8,10).

*Listeria encephalitiste* genellikle makroskopik lezyon görülmez (3,4,8,10,11). Nadiren medullar meningslerde kalınlaşma (yeşilimsi jelatinöz ödeme bağlı) ve yumuşama odakları görülebilir (5,10).

Histopatolojik olarak karakteristik primer lezyonlar mikroapselerdir. Mikroapseler birkaç nötrofil birikimi ile başlayabildiği gibi, bu

dönemde şekillenen glial reaksiyon odaklarına nötrofillerin sızması sonucu da oluşabilir. Daha sonra bu odakların merkezlerinde erime başlar ( 10,11,16 ). Lezyonlu bölgedeki beyaz maddede fibrinli eksudat ve ödem vardır. Parankimal odakların drenajı sırasında vaskulitis şekillenir (3,5,10) ve meningeal infiltrasyon gelişir. Şiddetli perivasküler infiltrasyona bağlı manşonlar oluşur. Bu kuşak lenfosit, histiosit, az sayıda nötrofil ve eozinofillerden oluşur (3,4,5,7,8,9, 11,16).

Klinik bulgular ve lezyonlar Listeriosis teşhisinde patognomonik özellik göstermez. Histopatolojik olarak Listerialar beyin steminde şekillenen mikroapselerle karakterize bulgular meydana getirir, ancak nihai ve kesin teşhis için etken izolasyonuna ihtiyaç vardır. Ancak *L. monocytogenesis*'in izolasyonu zaman almakta, pahalıya mal olmakta ve bazı vakalarda başarısız kalmaktadır. Bu nedenle hızlı, hassas bir teste ihtiyaç duyulmuş ve immunohistolojik metotlara yönelinmiştir (10,16). Fare, tavuk, koyun ve sığırlarda bu yönde yapılmış çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (9,12,14). *Listeria encephalitis*li koyunlar üzerinde yapılan çalışmalarda; mikroapse odakları ve malazik lezyonların şekillendiği bölgelerde, daha çok nötrofillerin ve makrofajların sitoplazmalarında antijen lokalizasyonunun tespit edildiği bildirilmektedir (11,12,13). Etken elektronmikroskopik çalışmalarda; nötrofillerin içindeki fagositik vakuollerde ve daha az olarakta normal ve dejenere nöyronlarda görülebilmektedir (3). Deneysel olarak intragastrik, intraperitoneal ve supcutan olarak enfekte edilmiş hayvanların tüm lenfoid dokularında immunohistolojik boyamalarla bakteriyel antijen tespit edilebilmektedir (13,14)

Bu çalışmada; teşhis amacıyla formolde tespit edilerek gönderilmiş doku örnekleri histopatolojik olarak muayene edilmiş ve *Listeria encephalitis* bulguları görülmüştür. Histopatolojik bulguların, formolde tespit nedeni ile, mikrobiyolojik muayenelerle teyidi imkanı bulunmadığından, doku kesitlerinde immunoperoksidaz boyamalar yapılarak, etiyolojik teşhisin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

## **MATERYAL METOT**

1998 yılı Nisan ayı içinde Balıkesir İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğünden %10'luk nötral formalin içinde tespit edilmiş şekilde gönderilen, dört hayvana ait, beyin, beyincik, dalak, karaciğer, kalp, böbrek, akciğer materyal olarak kullanıldı. Histopatolojik muayeneler için marazi maddeler akarsu altında yıkanarak formolden arındırıldı.

Telencephalon (hypocampus), diencephalon (thalamus), mesencephalon (corpora quadrigemina), metencephalon (pons cerebri, cerebellum), myelencephalon (m. Oblongata) bölgelerinden parçalar alındı. Alkol ve ksilol serilerinden geçirildi, parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotomla 4-6 mikron kalınlığında alınan kesitler H&E tekniğine göre boyanarak (2), ışık mikroskobunda incelendi.

Listeriaların antijenik lokalizasyonunu belirlemek amacı ile hazırlanan (6,15) doku kesitlerinde, kit protokolüne uyularak, streptavidin-biotin peroksidaz tekniğine göre immunolojik boyamalar yapıldı. Bu amaçla; Shandon marka Standart Omnitags Peroksidaz kit, AEC kromojen ve *L.monocytogenes* hiperimmun serumu (DYFCO,1/1000 sulandırmada) kullanıldı. Negatif kontroller primer serumun uygulandığı basamakta fosfat buffer salin (PBS) ile inkübe edildi. Preparatlar ışık mikroskobunda incelenerek sonuçlar değerlendirildi.

## **BULGULAR**

### **MAKROSKOPİK BULGULAR**

Materyaller Balıkesir İl Kontrol Laboratuvarından %10 nötral formalin içinde tespit edilerek gönderilmişti. Muayene istek protokolünde klinik anemnez olarak, sallantılı yürüyüş, dudak ve kulaklarda felç, tremörler, dönme hareketi ve körlük belirtilmiş, viral, bakteriyel ve paraziter etiyolojinin belirlenmesi istenmişti. Tespite alınmış beyin ve beyinciklerde makroskopik olarak bir bulgu görülmedi. İç organ numuneleri de normal görünümde idi.

### **HİSTOPATOLOJİK BULGULAR**

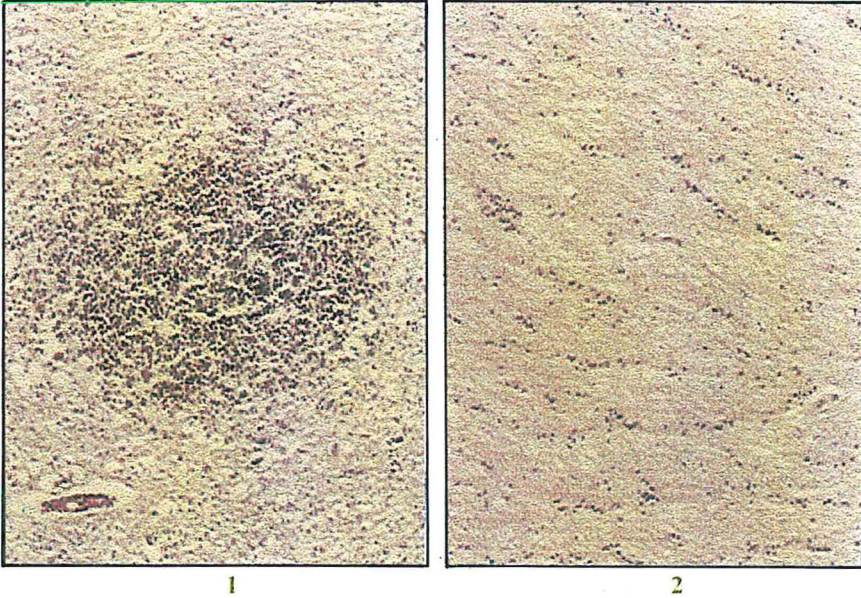
Yapılan histopatolojik muayenelerde; pons cerebri, cerebellum ve m. oblongatada, parankimde, çok sayıda polimorfonükleer lökosit yığınaklarından oluşan mikro apse odakları (Resim-1) ve mikrogliyalarda artış tespit edildi (Resim-2). Bu odaklar m. oblongatada çok yoğundu. Pons cerebri ve cerebellumda bu odakların yanısıra, damarlar çevresinde lenfosit, plazma hücreleri ve tek tük lökositlerden oluşan manşon şeklinde hücre infiltrasyonları (Resim-3) ile nöyronal dejenerasyonlar görüldü (Resim-4). Aynı bölgede meningeal damarlar çevresinde; yoğunlukla lenfositler ile az sayıda histiosit ve tek tük lökositlerden oluşan, hücre infiltrasyonlarının şekillenmesi ile ortaya çıkan, meningitis tablosu tespit edildi (Resim-4). Ayrıca özellikle pons

bölgesinde, hafifden, orta dereceye kadar değişen derecelerde malasik lezyonların varlığı görüldü ( Resim-5).

İncelemeye alınan karaciğer, kalp, dalak ve böbrek numunelerinde histopatolojik bir bulgu görülmedi.

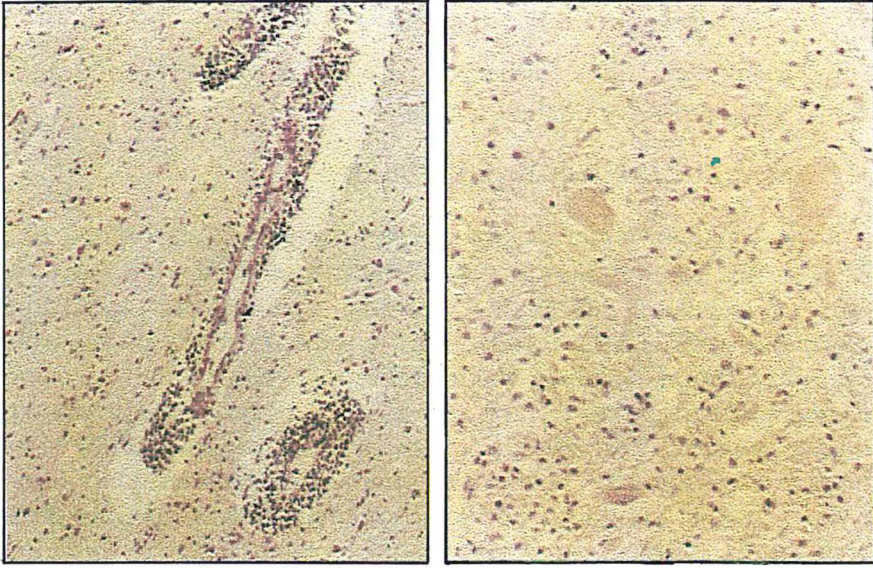
### İMMUNOHİSTOLOJİK BULGULAR

Histopatolojik olarak karakteristik bulguların görüldüğü doku örneklerinde yapılan immunoperoksidaz boyamalarda; bakteriyel antijen lokalizasyonu belirlendi. Çoğunluğu lökositlerin oluşturduğu mikroapse odaklarında; lökositlerin ve daha az olarak da makrofajların sitoplazmaları içinde bakteriyel antijen tespit edildi. *L. monocitogenes* antijeni parlak kırmızı renkte, tek veya birleşmiş noktacıklar halinde görüldü (Resim-6). Dejenere nöyronlarda, parankim ve meningeslerde perivasküler manşonlar oluşturmuş mononükleer hücrelerde, malasik odaklarda ve damar endotellerinde antijen lokalizasyonu tespit edilmedi. Antijenik lokalizasyonun yalnızca mikroapse odakları ile sınırlı kaldığı görüldü.



**Resim 1:** Cerebellumda, lökositlerden oluşan mikroapse odağı. H-E x200

**Resim 2:** Pons cerebride, mikroglial proliferasyon H.E. x 200.

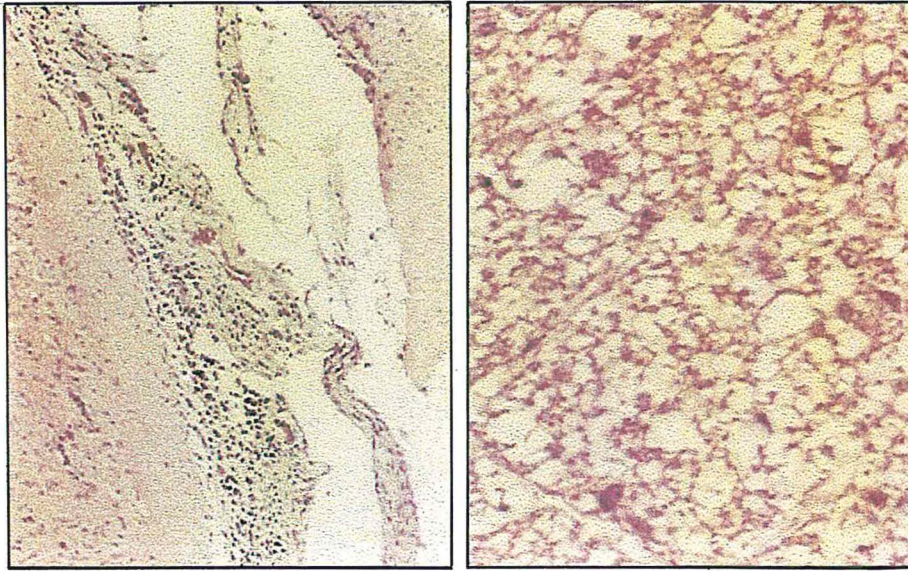


3

4

**Resim 3:** Cerebellumda, mononükleer hücre infiltrasyonları, H-E x200

**Resim 4:** Ponscerebride, nöyronal dejenerasyon, H-E x400

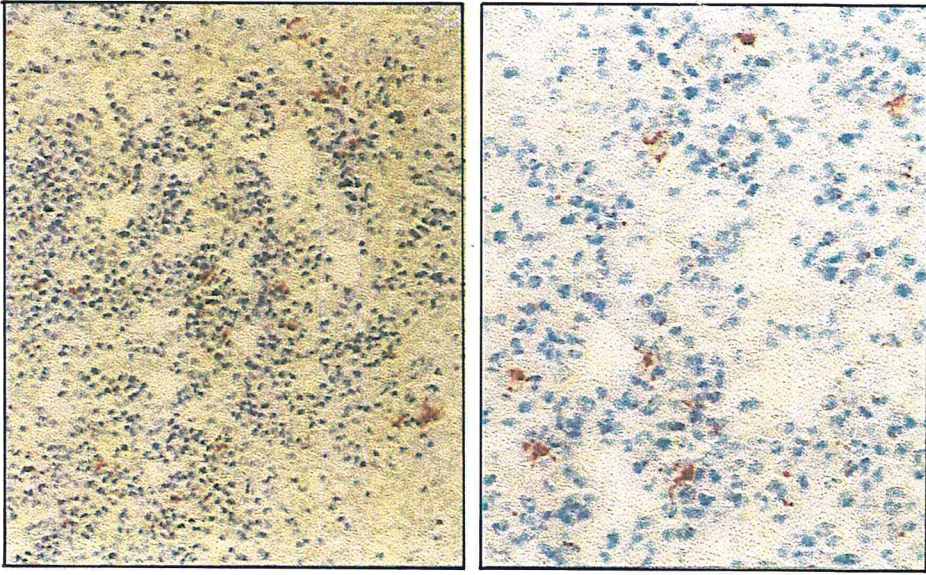


5

6

**Resim 5:** Cerebellumu örten meningslerde, mononükleer hücre infiltrasyonları, H-E x200

**Resim 3:** Pons cerebride, malazik odaklar H.E. x 400.



**Resim 7:** Mikroapse odaklarında lökosit ve makrofajların sitoplazmalarında *L. monocytogenes* antijeni lokalizasyonu. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen x200

**Resim 8:** *L. monocytogenes* antijeni lokalizasyonu İmmunoperoksidaz-Hematoksilenx400

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Supletal dozlarda tavşan ve domuzlara verildiğinde monositozi-se sebep olması nedeni ile *L. monocytogenes* olarak isimlendirilen etken çeşitli memeli ve kanatlı türleri ile insandan izole edilmektedir (1-9). Bu çalışmanın materyalini oluşturan numuneler %10 nötral formalinde tespit edilmiş olarak laboratuvarımıza ulaştığından, izolasyon ve identifikasyon çalışmaları yapılmamıştır.

Literatür bilgileri hastalığın genellikle kış ayları ve ilkbahar başlarında ortaya çıktığını, ancak bu sezonal seyrin sebebinin tam olarak açıklanamadığını göstermektedir (5,9). Bu çalışmada incelenen materyallerin laboratuvara gelişi Nisan ve Mayıs aylarındadır. Bu durumu aydınlatmak için bölgedeki hayvanların, stres, barındırma ve özellikle beslenme şartlarının incelenmesi gerekmektedir.

Çalışmada kullanılan materyallerin makroskopik muayenelerinde, patolojik bir bulgu görülmemiştir. Bu durum *Listeria encephalitis*lerde bildirilen genel bilgilere uygunluk göstermektedir (4-5,9,16).

Araştırmacılar hastalıkta şekillenen karakteristik, histopatolojik lezyonların, beyin steminde özellikle pons ve m.oblongatada şekillendiğini bildirmektedir.(3-4, 11-12,16) Ne var ki bu lokalizasyon hematogen yayılım için çok uygun görülmemektedir. Bu nedenle patogeneze çalışmalarında N. Trigemini özellikle incelenmektedir. Charlton yaptığı çalışmada *L. encephalitis*'li onyediyedi koyundan dokuz tanesinde karakteristik lezyonlarla birlikte, unilateral trigeminal neuris tespiti etmiştir (5). Bu çalışmada sistemik otopsi yapma imkanı olmadığından, N. trigeminus incelenmemiştir. Pons cerebri, cerebellum ve m.oblongata dan yapılan doku kesitlerinde; çoğunluğu lökositlerden oluşan mikroapse odakları, mikrogliyal proliferasyonlar, perivas-küler mononükleer hücre infiltrasyonları, malazik lezyonlar ve non-suppuratif karakterde meningoensefalit tespit edilmiştir. *L. encephalitis* için karakteristik olarak kabul edilen bu bulgular, diğer araştırmacıların sonuçları ile aynıdır (4,5,7,8,9,11,12,16).

Hamir ve ark. (1998) bir lama üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada beyin lezyonlarının yanı sıra lenfoid dokuda da değişiklikleri rapor etmektedir. Mide içi *L. monocytogenes* inokülasyonu ile enfekte edilen bir lamada, histopatolojik olarak suppuratif meningoensefalit bulgularının yanı sıra, dalakta lezyon tespiti etmişlerdir. Araştırmacılar, immunoperoksidaz boyamalarda dalak ve meningeslerde antijenin varlığını ortaya koymuşlardır. Ancak bu durum inokülasyondan sonra oluşan bakteriyemi devresinde, etkenin meningeslere ulaşması olarak yorumlanmıştır (7). Benzer şekilde Marco ve ark.nın (1991) farelerde oluşturdukları enfeksiyonda; lenfoid dokulardaki bulgulardan bahsedilmiş, ancak merkezi sinir sistemi ile ilgili bir tespit açıklanmamıştır (13). Bu çalışmada diğer iç organlarla birlikte, incelemeye alınabilen tek lenfoid doku olan, dalak numunelerinde patolojik bir bulgu görülmemiştir.

Listeriosisin kesin teşhisi için bakteriyel izolasyon gerekmektedir. Ancak bazı durumlarda, kültürasyonda başarısız olunmaktadır. Bunun dışında tespiti alınan materyallerde bakteriyolojik muayene yapma imkanı olmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı doku kesitlerinde immunoperoksidaz tekniği yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Cornel Üniversitesinde yapılan bir çalışmada; histolojik lezyon görülmüş ve *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmış 14 ve histolojik olarak listeriosis şüphesi olan, fakat bakteriyel kültürasyonda negatif bulunan 8 hayvana ait beyinler incelenmiştir. Yapılan immunoperoksidaz boyamalarda; konfirme edilmiş 14 beyinin tamamında, şüp-



heli olan 8 beyinden ise 3 tanesinde antijenin varlığı tespit edilmiş ve testin güvenilirliği bir kez daha teyit edilmiştir (16). Formolde tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış doku kesitlerinde, immunoperoksidaz boyamaları uygulayan diğer araştırmacılar da listeriosisin teşhisinde, bu metodu güvenilir bir teknik olarak tavsiye etmişlerdir (5,7,10,11,12,13,14,16). Bu çalışmada alınan sonuçlar; formolde tespit edilerek laboratuvara ulaştırılan materyallerde, immunoperoksidaz tekniğiyle yapılan boyamalarla etiyolojik teşhisin mümkün olduğunu göstermiş ve diğer araştırmacıların bu konudaki görüşlerini teyit etmiştir.

Weinstock ve ark. (1995) encephalitisli hayvanlarda *Listeria* antijeninin tespiti amacı ile yaptıkları çalışmada; antijeni yoğunlukla nötrofillerin, daha seyrek olarak da makrofajların sitoplazmaları içinde tespit etmişlerdir. Nekroze bölgelerde ise birkaç hücrede boyanma olduğunu bildirmişlerdir (16). Marco ve ark. (1988) bu bulgularla birlikte, malazik lezyonların şekillendiği odaklarda da antijenik lokalizasyonun varlığını görmüşlerdir (12). Lectin kullanılarak gerçekleştirilen bir başka immunohistolojik araştırmada, nötrofil ve makrofajların yanı sıra damar endotelinde de *Listeria* antijeninin varlığı ortaya konmuştur (11).

Bu çalışmada incelenen encephalitisli beyin dokularında *L. monocytogenes* antijeni, yalnızca mikroapselerin şekillendiği odaklardaki nötrofil lökositlerin ve az olarak da makrofajların sitoplazmalarında tespit edilmiştir. Seri kesitlerde yapılan çalışmalarda bunun dışındaki bölgelerde boyanma olmadığı görülmüştür. Araştırmacılar mikroapse odaklarının dışında şekillenen farklı lokalizasyonların tam olarak açıklanamadığını, bu durumun lezyonların gelişim süreci ile ilgili olabileceği görüşünü benimsemektedirler (11,12,16).

Yapılan bu çalışmada ; teşhis amacı ile gönderilen dört koyuna ait beyin ve beyinciklerde, histopatolojik olarak; mikro apselerinde bulunduğu bir meningoencephalitis tablosu tespit edilmiştir. Etiyolojik sebebin belirlenmesi maksadı ile, immunoperoksidaz boyamaları yapılmış ve *L. monocytogenes* antijeninin varlığına dayanılarak, *Listeria encephalitis* teşhisi konulmuştur. Bu çalışma ülkemizde; formolde tespit edilip, parafinde bloklanmış doku kesitlerinde immunoperoksidaz tekniğiyle, *Listeria encephalitis*in teşhis edildiği ilk saha çalışmasıdır.

Bu çalışmanın sonuçları göstermiştir ki; Balıkesir'de bir *Listeria encephalitis* problemi yaşanmıştır. Elimizdeki bilgilere göre, işle-

nen materyallerden iki tanesi aynı şahsa ait hayvanlardan alınmıştır. Yeni vakaların ortaya çıkmasını önlemek için; bundan sonraki aşamada, epidemiyolojik çalışmaların yapılması, özellikle bölgede uygulanan bakım ve besleme şartlarının gözden geçirilmesi, hazırlanan silaj yemler üzerinde bakteriyolojik çalışmaların başlatılması uygun olacaktır.

### **TEŞEKKÜR**

Sistemli çalışmaları ile marazi maddelerin enstitümüze ulaşmasını sağlayan Balıkesir İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğüne, immunoperoksidaz boyamalarda kullanılan *L. monocytogenes* hiperimmun serumu'nun temininde yardımcı olan, Gıda Kontrol Laboratuvarı şefi Uzman Veteriner Hekim Yıldız AYZAZ'a teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

1. **Arda M**, (1982). *Listeria enfeksiyonları*. 274-287, Arda M, Minbay A, Aydın N, Özel Mikrobiyoloji Bakteriye İnfeksiyöz Hastalıklar Ankara Üniversitesi Basımevi Ankara,
2. **Brown DW**, (1969). *Hematoxylin and eosin method*. Primer of histopathologic technique Appleton Century Corfts Educational Division Meredith Corporatin New York p.123-124
3. **Charlton KM**, (1977). *Spontaneous listeric encephalitis in sheep- Electron microscopic studies*. Vet. Pathol.,14, 429-434.
4. **Charlton KM, Garcia MM**, (1977). *Spontaneous listeric encephalitis and neuritis- Light microscopic studies*. Vet. Pathol., 14, 297-313.
5. **Cordy DR, Osebold JW**, (1959). *The neuropathogenesis of listeria encephalomyelitis in sheep and mice*. J.İnfect. Dis., 104,164-173.
6. **Falini B, Clive MD, Taylor R, Olphin MD**, (1993). *New developments in immunoperoxidase techniques and their application*. Arch. Path. Lab. Med., 107, 105-227.
7. **Hamir AN, Moser G**, (1998). *İmmunohistopathological findings in an adult llama with listeriosis* Vet.Rec.,143, 477-479.
8. **Jones TC, Hunt RD**, (1983). *Listeriosis*. Veterinary Pathology Fift Edition Lea & Febbler Philadelphia, p. 631-634.
9. **Johnson GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA**, (1995). *Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants*. J. Vet. Diag. Invest. 2., 223-228
10. **Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N**, (1993). *Listeriosis*. Pathology of Domestic Animals Fourth Edition. Academic Press İnc. Ltd. London. p. 393-397.
11. **Krueger N, Low C, Donachie W**, (1995). *Phenotypic characterization of the cells of the inflammatory response in ovine encephalitic listeriosis*. J. Comp. Path., 113, 263-275.
12. **Marco A, Ramos JA, Dominguez L, Domingo M, Gonzalez**, (1988). *Immuno- cytochemical detection of Listeria monocytogenes*

in tissue with the peroxidase-antiperoxidase technique Vet. Pathol., 25, 385-387.

**13. Marco AJ, Domingo M, Prats M, Briones V, Pumarola M, Dominguez,** (1991). *Pathogenesis of lymphoid lesions in murine experimental listeriosis* J. Comp. Path., 105, 1-15.

**14. Marco AJ, Prast N, Ramos A, Broines V, Blanco M, Dominguez L, Domingo M,** (1992). *A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of Listeria monocytogenes in mice.* J. Comp. Path., 107, 1-9.

**15. Taylor CR,** (1978). *Immunoperoxidase techniques.* Arch Pathol. Lab. Med, 102, 113-121

**16. Weinstock D, Horton SB, Rowland PH,** (1995). *Rapid diagnosis of Listeria monocytogenes by immunohistochemistry in formalin fixed brain tissue.* Vet. Pathol., 32, 193-195.