Extraction and purification Listeriolysin O of bacteria Listeria monocytodenes isolated from different Food materials

استخلاص و تنقية Listeriolysin O من بكتريا Listeria monocytogenes و المعزوله من مواد غذائيه مختلفه

*محمد موسى جعفر * خميس حبيب مطلك * فلاح عبد الحسن حيدر * عمار فوزي محمد
وزارة العلوم اوالتكنلوجيا ,دائرة البحوث الزراعيه
Email: mohammed.reem1@yahoo.com

الخلاصة

عزلت بكتريا *Listeria monocytogenes* من عينات غذائيه و بنسب عزل مختلفه و على النحو التالي3.33 %) من لحم الدجاج المتجمد (10 % من أحواض تربية الأسماك ؛ 10 % من خياشيم الأسماك الحية . و تم تشخيص العزلات كيموحيويا و زرعت على الأوساط الانتقائية و التفريقية و أختبرت حساسيتها للمضادات الحيوية المختلفة ، إذ ظهر إن جميع العزلات مقاومة بنسبة 100 %) لمضادات الباسترازين و الترايموكسازول و حامض الناليديكسيك ، و حساسة بنسبة 100 %) لمضادات الكلورامفينيكول ولأموكسلين و للمضاد الحيوي بنسلين G بنسبة (30 %) .

Abstract

The bacteria *Listeria monocytogenes* were isolated from food samples different proportions of isolation as following:; 3.33% from freezing chicken meat; 10% in fish breeding aquarium and 10% from living fish gills.

The isolates were diagnosed by biochemical tests and cultured on differential culture media.The sensitivity of isolates to different antibiotics were tests,it was appeared that all isolates were resist in prportion(100% to bacitracin; trimoxazole and nalidixic acid and sensitive in proportion 100% to chloramphenicol and amoxicillin and (30%) to pencillin G.

المقدمة

يعود جنس *Listeria* إلى مجموعة العصيات الموجبه لملون غرام ، و من مميزات خلايا جنس *Listeria* إنها خلايا متحركة عند درجة حرارة 25 درجة مئوية و غير مكونة للأبواغ ، و يتطلب في تغذيتها أوساطاً غنية حاوية على دم إنسان بنسبة 5%و عموماً تسبب حل خلايا الدم الحمر (1) ، كما يتطلب استخدام أوساطا انتقائية لعزلها من العينات السريرية والبيئية . ومن مميزات جنس الليستريا المستخدمة في التشخيص كونها سلبية لاختبار الاوكسيديز وإيجابية لاختبار الكاتاليز ، محللة للاسكيولين (2)(3) .

تعد جرثومة *Listeria monocytogenes* من الجراثيم الممرضة غير الشائعة ، إلا أنها تسبب أمراضا خطرة للإنسان في كل أنحاء العالم مثل الإجهاض المتكرر عند النساء الحوامل ، والتهاب السحايا (Meningitis) ، وأنتان الدم في الأطفال حديثي الولادة (4) . وتنتقل جرثومة *L. monocytogenes* بشكل رئيس عن طريق الغذاء الملوث بها إلى جانب العدوى من الإنسان و الحيوان () ، وتنتشر جرثومة الليستريا بصورة واسعة في النباتات المتحللة ، والتربة ، وبراز الحيوانات ، والأعلاف ، والمياه (5) (6) (7).

تمتلك جرثومة *Listeria monocytogenes* العديد من عوامل الفوعة ، إلا أن ذيفان Listeriolysin O يستخدم بوصفه مستضداً في الكشف عن جرثومة *L. monocytogenes* لدوره المهم في الغزو والانتشار الداخل الخلوي Intracellular spread، كما انه ينتج من جرثومة *L. monocytogenes* فقط وليس من الأنواع الأخرى العائدة إلى جنس *Listeria* ؛ لذا أصبح لهذا الذيفان دور بالغ الأهمية في الاختبارات المصلية للكشف عن الأجسام المضادة المتكونة ضده (Anti – Listeriolysin O antibody) في مصول الإنسان والحيوانات المجهضة (8) . ولأهمية ذيفان Listeriolysin O في أمراضية جرثومة *L. monocytogenes* ، عمد الكثير من الباحثين إلى استخلاصه وتنقيته(9) ( )(11)(10)

وقد هدفت الدراسه الى:

1- الحصول على عزلات من بكتريا *Listeria. monocytogenes* معزولة من من مواد غذائيه مختلفه وقادرة على إنتاج ذيفان Listeriolysin o

2- تعيين الظروف المثلى لانتاج ذيفان Listeriolysin

3- اجراء اختبار الحساسيه الدوائيه لبكتريا Listeria monocytogenes

طرق العمل

2 عزل بكتريا *L. monocytogenes* من مصادر أخرى

في محاولة لعزل جرثومة *L. monocytogenes* من بعض المواد الغذائيه، تم أخذ 75 كيلوغراماً لحم دجاج مجمد و 20 مليلتر من الماء المجمد داخل 25 كغم من الدجاج المجمد الذي ترك ليذوب بدرجة حرارة الغرفة (20 – 25) م^o في أنبوبة معقمة لمدة 10 دقائق ، و ماء أحواض تربية الأسماك (من عمق 10 سنتمترات و PH للماء (6 – 6.5) و الحرارة 10 – 15 م^o، و مسحات من خياشيم (Gills) الأسماك الحية و عربات بيع الأسماك .

لعزل بكتريا *Listeria monocytogenes* من لحم الدجاج المجمد أتبعت طريقة (12) على النحو الآتي:

وزن 20 غراماً من لحم الدجاج المجمد (بدون تذويبه) باستخدام الميزان الكهربائي ، ثم وضعت قطعة اللحم الموزونة في خلاط كهربائي يحتوي على 0 18 مليلتر من الحلول الملحي المعقم بتركيز 0.85 % و بسرعة 100 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق، اعطي هذا المحلول تخفيف مقداره 10^{-1}. أجريت بعدها سلسلة من التخافيف العشرية 10^{-2},..........., 10^{-6} و باستخدام المحلول الفسلجي المعقم ، ثم أضيف 0.1 مليلتر من كل تخفيف الى وسط أغار الدم الأساس المضاف إليه دم انسان بنسبة 5% و وسط أغار تربتون الصويا و وسط PALCAM agar و بمعدل طبقين لكل نوع من الأوساط الزرعية ، ثم حضنت الأطباق بدرجة 35 و30,م^o لمدة 24 ساعة على التوالي . أخضعت بعدها المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية المذكورة للفحوصات الكيموحيويه الخاصة بالكشف عن بكتريا اللستيريا ، كما نقلت المستعمرات البكتيرية النامية على وسط PALCAM agar الى وسط CHROM agar Listeria medium ، و حضنت الأطباق بدرجة 37م^o لمدة 48 ساعة .

و لحساب عدد البكتريا لكل غرام من اللحم ، أستخدمت المعادلة الآتية :

$$\text{عدد البكتريا / غرام} = \frac{\text{عدد المستعمرات} \times \text{معكوس التخفيف} \times 10}{\text{وزن النموذج}}$$

أما عزل جرثومة *L. monocytogenes* من الماء المجمد داخل الدجاج ؛ فقد تم أخذ (0.1) مليلتر من السوائل المترشحة المجمدة الممزوج مع قليل من دم الدجاج، و بعد عمل سلسلة من التخافيف الثنائية بإستخدام المحلول الملحي %(0.85) ، ثم نشر (0.1) مليلتر من كل تخفيف على وسط أغار الليستيريا الإنتقائي (Listeria selective agar base) المحضر

حضنت الأطباق بدرجة حرارة37,30م^o لمدة (24) ساعة و 48ساعة ، ثم حسبت أعداد البكتريا في العينة على النحو الآتي :

$$\text{عدد البكتريا / مليلتر} = \text{عدد المستعمرات} \times \text{معكوس التخفيف} \times 10$$

أتبعت الطريقة ذاتها لعزل جرثومة *L.monocytogenes* من ماء أحواض تربية الأسماك من عمق 10سنتيمتراً تحت سطح الماء و بدرجة حرارة 10م^o ، أما المسحات المأخوذة من خياشم الأسماك الحية و عربات بيع الأسماك فقد زرعت على الأوساط الزرعية جميعها الخاصة بعزل و تشخيص جرثومة *L.monocytogenes* .

التشخيص :

شخصت جرثومة *Listeria monocytogenes* بإستخدام الإختبارات (12)(13) الكيموحيوية و الفسلجية على وحسب) (14)و(12).

إختبار الحركة Motility test

زرعت البكتريا في وسط الحركة Motility medium بطريقة الطعن Stab ، ثم حضنت الأنابيب الملقحة بالبكتريا بدرجة حرارة 25 م^o لمدة 24, 48, 72 ساعة ، لدراسة نمط نمو بكتريا *Listeria monocytogenes* المماثل للمظلة (Umberlla like growth) .

2. إختبار الأوكسيديز Oxidase

أستخدم لتشخيص جرثومة *L. monocytogenes* ، إذ تم أخذ جزء من المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية و وضعها على ورقة ترشيح نظيفة و أضيف لها قطرة من كاشف الأوكسيديز (1% من Tetramethyl paraphenyl – diamine) .يعد الاختبار موجب عند تلون المستعمرات على ورقة الترشيح باللون البنفسجي .

3. إختبار الكاتاليز Catalase test

نميت البكتريا على وسط أغار تربتون الصويا (Trypton soy agar) المضاف إليه 0.6% مستخلص الخميرة ، و حضنت بدرجة 37 م^o لمدة 24

تقدير فعالية ذيفان Listeriolysin O :

أعتمدت طريقة(15) لتقدير فعالية ذيفان (Listeriolysin O – LLO) و على النحو الآتي:

1- أضيف 0.5 مليلتر من محلول الداريء الملحي Buffered saline في ثلاثة عشر انبوبا إختباريا .
2- أضيف 0.5 مليلتر من ذيفان (Listeriolysin O) أو حال الدم (Hemolysin) الى الانبوب الأول الحاوي على (0.5) مليلتر من محلول الداريء الملحي ، ثم أجريت تخافيف ثنائية (Doubl dilutions) مع رمي 0.5 مليلتر من آخر إنبوب تخفيف .
3- أضيف 1 مليلتر من محلول الداريء الملحي الحاوي على 0.2% (Sodium thiosulfate) لكل تخفيف .
4- أضيف 0.5 مليلتر من % 3عالق خلايا الدم الحمر المغسولة لكل تخفيف .
5- حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م^o لمدة 45دقيقة .
6- أجري النبذ بسرعة 2000 دورة بالدقيقة و لمدة 10 دقائق .
7- قرئت الإمتصاصية على الطول الموجي 540 نانوميتر و أستخدم المحلول (Blank) حسب المخطط (شكل رقم 1) ، كما تم تحضير المحلول الأساس (Standared) للحصول على (100 %) تحلل دموي (Hemolysis) لأغراض المقارنة .

1مليلتر من محلول الداريء الملحي

1مليلتر من محلول الداريء الملحي الحاوي على 0.2% Sodium thiosulfate

0.5 مليلتر من محلول الداريء الملحي
0.5 مليلتر Listeriolysin O
1مليلتر من محلول الداريء الملحي الحاوي على 0.2% Sodium thiosulphate

1 مليلتر من3% خلايا الدم الحمر المغسولة

1 مليلتر من 3%خلايا الدم الحمر المغسولة

0.5 مليلتر من 3%خلايا الدم الحمر المغسولة

↓

حضن بدرجة حرارة 37 م^{o} و لمدة 45 دقيقة

↓

النبذ بسرعة 2000 دورة بالدقيقة و لمدة 10دقائق

↓

قراءة الإمتصاصية عند الطول الموجي (540) نانوميتر

شكل (1) مخطط استخلاص Listeriosyin O وتقدير فعاليته

تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج ذيفان Listeriolysin O :

حضر وسط الإنتاج و بعد التعقيم لقح الوسط بإضافة 1 مليلتر بتركيز (10^{8}) cfu/ مليلتر من بكتريا *L. monocytogenes* عزلة المنشطة ، و حضن الوسط الملقح بدرجات حرارية مختلفة (4, 10, 20, 37, 40, 50, 60) م^{o} و بواقع مكررين لكل درجة حرارة لمدة 24 ساعة ، ثم قرا ت نسب التحلل على الوسط.

النتائج و المناقشه

العزل

نتائج العزل من العينات الغذائيه

أساساً (Standard)، وأعطيت الرموز (Lis.S2, Lis.S1) والمعزولة من الحليب الخام والجبن على التوالي. وبذلك نسبة العزل تم الحصول على عزلتين من بكتريا *L. monocytogenes* من عينات لحم الدجاج المجمد من مجموع 90 عزله من بكتريا *L. monocytogenes* وأعطيت الرموز (Lis.T2, Lis.T1)، وعزلتين من الماء المتجمد داخل الدجاج المجمد وأعطيت الرموز (Lis.T4, Lis.T3) وعزلة واحدة من حوض تربية الأسماك وأعطيت الرمز (Lis.T5)، وعزلة واحدة من عربات بيع الأسماك، وأعطيت الرمز (Lis.T6) وعزلة واحدة من المسحات المأخوذة من خياشيم الأسماك الحية، وأعطيت الرمز (Lis.T7). وتم الحصول على عزلتين من بكتريا *Listeria monocytogenes* من (مختبر الصحة المركزي / بغداد) ، و عدت هاتان العزلتان اات الغذائيه3.33% من لحم الدجاج المجمد و 10% من الماء المتجمد داخل الدجاج المجمد و 10% من أحواض تربية الأسماك و 6.66% من خياشيم الأسماك و 10% من عربات بيع الأسماك

\جدول (1): عدد العزلات والنسبة المئوية لبكتريا *Listeria monocytogenes* من مصادر غذائيه مختلفه.

مصدر العزل	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزل
لحم دجاج مجمد	60	2	%3.33
الماء المتجمد داخل الدجاج المجمد	20	2	%10
أحواض تربية الأسماك	10	1	%10
خياشيم الأسماك الحية	15	1	%6.66
عربات بيع الأسماك	10	1	%10

وجد عدد بكتريا *L.monocytogenes* في لحم الدجاج المجمد ما بين 10^3x2.5-10^4x3 cfu /غرام، أما عدد جرثومة *L. monocytogenes* في الماء المتجمد داخل الدجاج فكان 3.5 × 10^4 - 6.6 × 10^4 cfu/ مليلتر. بينما سجلت أعلى أعداد لجرثومة *L. monocytogenes* في العينات المأخوذة من أحواض تربية الأسماك وعربات بيع الأسماك فكانت 7 × 10^5 cfu/ مليلتر و 8.8 × 10^5cfu/ مليلتر على التوالي.

مما سبق لوحظ أن نسبة العزل من الدجاج المجمد شكلت أعلى نسبة لعزل بكتريا *L.monocytogenes*، وهذا يفسر وجود هذه البكتريا بوصفها نبيتاً طبيعياً (Normal flora) في أمعاء و فضلات الدجاج.

إن استخدام المنتجات الغذائية المجمدة قد يكون سبباً في انتشار بكتريا *L. monocytogenes* مما يؤدي إلى إصابة النساء الحوامل بتلك الجرثومة ، وقد وجدت بعض الدراسات أن نمو جرثومة الليستريا في درجات الحرارة الواطئة ينتج زيادة في تكوين أحد عوامل الفوعة الرئيسة المسمى حال الدم بيتا (Beta-Haemolysin) أو المسمى بذيفان (Listeriolysin O - LLO) (17) (16) وقد بينت إحدى الدراسات أن 33% من الدواجن تطرح جرثومة *L. monocytogenes* في برازها، وإن كانت لا تبدي أعراضاً مرضية(18.) (19) (20)(21) وتوجد دراسة واحدة في الأردن تم فيها عزل بكتريا *L. monocytogenes* وبواقع 30% في عينات الدجاج المجمد.أما نسبة عزل*بكتريا* *L monocytogenes*من الأسماك في اليابان فتصل إلى 90% (20) ، أما في تركيا فقد بينت الدراسات إن نسبة عزل جرثومة *L. monocytogenes* من الأسماك المطبوخة تصل الى 0.22 % و بأعداد تتراوح مابين 10^3 – 10^4 خلية /غرام من لحم السمك ، وتعد *L. monocytogenes* من الجراثيم الخطرة على صحة الإنسان، إذ تسبب تقريباً 2,500 حالة إصابة وموت 500 شخص في الولايات المتحدة لوحدها نتيجة لتناول الأطعمة الملوثة بتلك البكتريا. (FDA,2001).

جدول(2) قابلية نمو بكتريا *L. monocytogenes* عند درجات حرارية مختلفة باستخدام وسط أغار تربتون الصويا مضافاً إليه دم إنسان بنسبة 5%

درجة الحرارة (م°)	النمو البكتيري
4	-
10	-
15	W
25	+
30	++
37	++
40	+
45	W

- : لا يوجد نمو.
W : نمو ضعيف (عدد المستعمرات أقل من 5).
+ : نمو متوسط Moderate (عدد المستعمرات أعلى من 5 وأقل من 15)
++ : نمو كثيف (عدد المستعمرات أعلى من 20 و.ت.م).

أظهرت بعض الدراسات أن معدل نمو بكتريا *L. monocytogenes* بدرجة حرارة 25 م° أقل من معدل النمو بدرجة حرارة 37 م°، وعند خزن جرثومة الليستريا بدرجة 4 م^{O} لمدة 4 أسابيع في محلول دارئ الفوسفات الملحي (Phosphate buffer saline) ذي PH (5.5) وآخر 7 فإن العدد الحي للخلايا لم يتغير خلال مدة الخزن بهذه الدرجة الحرارية وPH، بيد أن حيوية الخلايا تقل تدريجياً مع مرور مدة الخزن، وعند نقل جرثومة الليستريا الى وسط نقيع القلب-الدماغ (Brain Heart Infusion) وتنميتها بدرجة حرارة 37 م^{O} فإن حيويتها تزداد ، كما أن لبكتريا *L. monocytogenes* القدرة على التضاعف في بيئة رطبة PH (7.6-4.8) (22) ، بينما أكدت دراسات أخرى قدرة جرثومة *L. monocytogenes* على النمو في وسط Tryptic soy Broth مضافاً إليه 0.6% من مستخلص الخميرة بدرجة حرارة 30 م^{o} وفي مدى PH يتراوح ما بين 4.5- 7 وينعدم النمو البكتيري في PH (4) والأقل من ذلك.

(Parish and Higgins,1989 and Cheroutre – Vialette and Lebert ,2000)

حساسية العزلات للمضادات الحيوية

اختبرت حساسية عزلات *Listeria monocytogenes* للمضادات الحيوية وأظهرت النتائج أن أغلب العزلات كانت حساسة للمضادات الحيوية، إذ كانت العزلات حساسة بنسبة 100% للمضاد الحيوي كلورامفينكول والأموكسيسلين، في حين أن العزلات كانت حساسة للمضاد الحيوي ستربتومايسين بنسبة 90% ، يليه الأمبسلين والتتراسايكلين والأريثرومايسين والجنتامايسين على التوالي إذ كانت نسبة الحساسية 80% لكل مضاد، وللمضاد الحيوي بنسلين G 30%. وتبين أن العزلات كانت مقاومة بنسبة 100% للبستراسين والترايموكسازول وحامض النالدكسيك ، و 80% للمضاد الحيوي لينكومايسين تثبط العديد من المضادات الحيوية لبكتريا *L. monocytogenes* مثل المضاد الحيوي الأمبسلين ، والأريثرومايسين ، والسلفاميثوكسازول ,من جهة أخرى تقاوم بكتريا الليستريا حوالي (2-9) مضاد حيوي ، فقد وجد أن بكتريا *L.monocytogenes* حساسة للمضاد الحيوي البنسلين ، والكلورامفينكول ، والترايمثبريم ، والأريثرومايسين ، والجنتامايسين ، والريفامبسين ، والتتراسايكلين ومقاومة للسيفالوسبورينات. (23). ويكون العلاج الأمثل بأخذ المضاد الحيوي جنتامايسين مع الامبسلين أو الاموكسيسلين وقد ظهرت عدة سلالات عائدة الى بكتريا *Listeria monocytogenes* مقاومة للعديد من المضادات الحيوية منها مضاد التتراسايكلين ، والترايمثبريم الذي يعطى للمرضى الحساسين للمضاد الحيوي البنسلين، كما وجد أن *L. monocytogenes* مقاومة لحامض الناليدكسيك.(24)

جدول (3) يبين النسبه المؤيه لحساسية ومقاومة بكتريا L.monocytogenes للمضادات الحيويه

المضاد الحيوي	S%	R%
كلورونفنيكول الاموكسيسيلين	100	
ستربتومايسين	90	
الامبيسيلين تتراسايكلين الايرثرومايسين الجنتامايسين	80	
بنسلين	30	
البستراسين الترايموكسازول حامض الناليديكسيك		100
لينكومايسين		80

*S sensitivity **R resist

Refrence

1-Groves , R. D. and Welshimer , H. J. (1977) . Separation of Pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions.**J.Clin. Microbiol. 5:559-563**

2- Mclauchlin , J. and Low , J. C. (1994) . Primary cutaneous listeriosis in adults ; an occupational disease of veterinarians and farmers . **The veterinary record . 135:615-617.**

3-Fraber , J. M. and Peterkin ,P. I. (1991). *Listeria monocytogenes* , a food –borne pathogen . **Microbiol. Rev. 55:476-511 .**

4-Low , J. ; Davies , R. and Donachine , W. (1992) . Purification of listeriolysin O and development of immunoassay for diagnosis of listeric infections in sheep. **J. Clin .Microbiol. 10:2705-2708.**

5-Beuchat , L. and Ryu , J. (1997). Produce handling and processing practices . **Emerg. Infect . Dis . 3: 459-465 .**

6-Mahmood , M.; Ahmed , A . and Hussain , I. (2003). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat products and other related inanimates of Faisalabad . **Pakistan Journal of Nutrition. 2:346-349.**

7-Zaki , M.; Daoud , A. S. ; AL-Saleh , Q ; and Abd-AL-Rasool. M. M. (1990). Bacterial meningitis in the newborn : a kuwaiti experience. **J. Trop. Pediatr. 36:63-65**.[Abstract].

8-Berche , P. ; Reich , K. ; Bonnichon , M. ; Beretti, J.; Ceoffory , C. ; Raveneau , J. ; Cossart , J. ; Gaillard , L. ; Greslin , P.; Kreis H. and Veron , M. (1990) . Detection of anti – listeriolysin O for serodiagnosis of human listeriosis . **Lancet . 335:625-627 .**

9-Jenkins , E . ; Njoku –Obi , A. and Adams , E. (1964) . purification of the soluble hemolysin of *Listeria monocytogenes*. **J. Bacteriol . 88:418-424.**

10-Karpova , L. ; Belyi , I. ; Tartakovskii , I. and Prozorovskii , S. (1994) . The Purification and characteristics of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **Zh. Mikrobiol . Epidemiol. Immunobiol. 4:3-7**.[Abstract]

11-Oladepo , D. K. , Candlish , A. A. and Stimson , W. H. (1992) . Detection of *Listeria monocytogenes* using polyclonal antibody . **Letters in Applied Microbiology . 14:26-29.**

12-Harley , J. and Prescott , L. (1996).In Laboratory Exercises in Microbiology . 3thed . , U. S. A.

13-Cruickshank , R. ; Duguid , J. ; Marmion , B. and Swain , R. (1975). Medieal Microbiology . 12th ed . Churchil Living stones , London.

14-USFDA /Center for Food Safety and Applied Nutrition , USDA /Food safety and inspection Service Centers for Disease Control and Prevention . January ,(2003) .Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* .

15-Girard , K. ;Sbarra , A. and Bardwil , W. (1963). Serology of *Listeria monocytogenes*: Characteristics of the solube hemolysin . **J. Bacteriol . 85:349-355.**

16-WHO working group . Food borne listeriosis. **WHO/EHE/FOS 88.5. Geneva.1980** [Abstract].

17-Troutt , H. F. and Osburn , B. I. (1997) .Meat from dairy cows : Possible microbiological hazards and risks . **Rev. Sci. Tech. 16:405.**

18-Weber , A.; Potel , J.; Schafer , S.R. ; Prell, A. and Datzmann , C. (1995). Studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic companion animals. **Zentralbal . Hyg. Umweltmed. 198:117**.[Abstract].

19-AL-Haj Ali ,A. (1995).Isolation and serological characterization of *Listeria monocytogenes* from chikens in Jordan .**M.Sc. Thesis ,University of Jordan** . [Abstract]

20-Iida , T. ; Kanzaki , M. ; Nakama , A. ; Kokubo , Y. ; Maruyama , T. and Kaneuchi , C. (1998) . Detection of *Listeria monocytogenes* in humans , animals and foods .**J.Vet.Med.Sci. 60:1341-1343 .** [Abstract].

21-FDA/ Center for Food safety and Applied Nutrition . March , (2001) . Processing parameters needed to control pathogens in cold – smoked fish , potential hazards in cold –smoked fish : *Listeria monocytogenes* .

22-Weis, J. and Seeliger , P. R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. **Appl. Microbiol. 30:29-32**

23-EL- Sherbini , M. ; AL-Agili , S. and Garbaj , A. (1998) . Isolation of *Listeria* from farm milk and abortion cases of women .**Estern Mediterranean Health Journal , WHO. 4:589-592.**

24-Charpentier , E and Courvalin , P.(1999) .Antibiotic resistance in *Listeria* spp. .**Antimicrobial agents and chemotherapy .43 : 2103 – 2108.**