

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 07 K 14/195 C 07 K 16/12**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1988 04428**

(22) Indleveringsdag: **1988-08-08**

(24) Løbedag: **1988-08-08**

(41) Alm. tilgængelig: **1989-02-11**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2003-02-17**

(30) Prioritet: **1987-08-10 US 083619**

(73) Patenthaver: **Akzo N.V., Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, Holland**

(72) Opfinder: **Bryan Timothy Butman, 9366 Highlander Boulevard, Walkersville MD 21793, USA**
Jerome Arnold Mattingly, 11609 Branby Hall Lane, Gaithersburg MD 20878, USA

(74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Slægtspecifikt Listeria-antigen, monoklonalt antistof mod antigenet, immunoanalysefremgangsmåde og immunoanalyseforsøgssæt til påvisning af Listeria samt immunreagens omfattende antigenet eller antistoffet**

(57) Sammendrag:

Antigener, som er karakteristiske for alle Listeria-arter bortset fra L. denitrificans omfattende proteiner, der findes i Listeria-varmeekstrakter, hvor hovedantigenet har en molekylvægt på fra cirka 30 til cirka 38 kD og omfatter tre immunogent forskellige epitoper og andre omfattende proteiner med et molekylvægtsområde på fra cirka 17 kD til hovedantigenets molekylvægt og omfattende en epitop, som er immunreaktiv med antistoffer, der også er reaktive med en af de tre epitoper på proteinet på 30 til cirka 38 kD. Desuden monoklone museantistoffer, som er specifikt reaktive med de identificerede epitoper på disse antigener.

Opfindelsen angår et *Listeria*-specifikt antigen, antistoffer over for disse, monoklonale antistoffer produceret fra specifikke hybridomcellelinier, en immunanalysefremgangsmåde til påvisning af *Listeria* i en prøve og immunanalyseforsøgssæt og komponenter deraf til brug i et immunreagens ved en sådan immunanalysefremgangsmåde.

5 *Listeria monocytogenes* har fået stigende opmærksomhed som et humant patogen. Der er blevet rapporteret om adskillige dokumenterede udbrud af listeriosis i U.S.A., hvor der er blevet identificeret *Listeria*-forurenede fødevarer som infektionskilden. I 1981 var der et større udbrud forbundet med kål, i 1983 med mælk og i 1985 var der flere end 100 tilfælde, der tilskrives forurenede ost.

10

U.S. FDA har angivet, at der er en tolerance på nul for *Listeria* i fødevarer. Der har været adskillige nylige tilbagekaldelser fra U.S. FDA af produkter indeholdende *Listeria*, generelt bestående af mejeriprodukter, især ost og is, hvoraf nogle var importerede. Der har også været talrige fødevareprodukter, der er blevet tilbagekaldt af virksomheder.

15

Skønt der helt klart er et behov for en pålidelig fremgangsmåde til identifikation af *Listeria*-forurenede fødevareprodukter, er der for tiden ingen nem og universelt accepteret fremgangsmåde til dyrkning eller bekræftelse af *Listeria*. The Association of Official Analytic Chemists (AOAC), den organisation, som godkender analysemetoder til fødevareindustrien, skal endnu godkende enhver fremgangsmåde til dyrkning af *Listeria* fra fødevareprodukter. Den af FDA foreslåede metode kræver langvarig, kold berigelsesdyrkning før afprøvning. Andre fremgangsmåder kræver omstændelig instrumentering til dataanalyse.

20

25

Listeria er en grampositiv, ikke-sporedannende, bevægelig stav, som har evnen til at vokse over et bredt temperaturområde (4°C til 45°C). Den er blevet rapporteret til at være antigenet beslægtet med andre grampositive organismer, såsom *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus fecalis*. Derfor kræver en immundiagnostisk metode til *Listeria*-identifikation meget spe-

cifikke antistoffer og/eller et antigen, som er meget specifikt for denne organisme. Der er blevet fremstillet og karakteriseret en serie monoklone museantistoffer, der identificerer et slægtspecifikt *Listeria*-antigen, som begge med held
5 kan anvendes til udvikling af en diagnostisk analyse for *Listeria*.

Der er blevet produceret monoklone museantistoffer, som reagerer med *Listeria*-varmeekstrakter fra alle *Listeria*-arter
10 bortset fra *L. denitrificans*. Disse monoklone antistoffer er alle reaktive med et bestemt protein, som har et molekylvægtsområde på fra cirka 30 til cirka 38 kD, målt under både reducerende og ikke-reducerende betingelser. Dette antigen blev
15 identificeret i alle arter med en ringe molekylstørrelsesvariation mellem arterne. Dette antigen er karakteriseret ved at have mindst tre immunogene epitoper. De dannede antistoffer var således specifikt reaktive med enhver af de tre epitoper. Antigener med lavere molekylvægt blev identificeret, som havde
20 et molekylvægtsområde på fra cirka 17 kD til cirka 30 kD, og som karakteriseres ved at indeholde en epitop, som har samme immunreaktivitet som én af de tre epitoper i 30-38 kD-proteinet.

Figur 1 er en Western-aftryksprofil af reaktivitet med varmeekstraktproteiner fra *Listeria monocytogenes*. Søjlen længst
25 til højre illustrerer profilen for hele varmeekstrakten. Søjlerne 1 til 15 illustrerer immunreaktiviteterne for de angivne antistoffer med varmeekstrakten.

30 Figur 2 illustrerer immunreaktiviteten af monoklont antistof 10-12C med varmeekstrakter af den angivne *Listeria*-art og andre bakterier.

Figur 3 illustrerer immunreaktiviteten af det monoklone antistof 10-12C med den angivne *Listeria*-art.
35

Figur 4 illustrerer immunreaktiviteten af 3 af de monoklone antistoffer, der genkender bestemte epitoper på hovedantigenet, idet *Listeria*-arten er angivet med numrene 1-7:

1. *Listeria monocytogenes* (type 1);
2. *Listeria monocytogenes* (type 2);
3. *Listeria monocytogenes* (type 4a);
4. *Listeria monocytogenes* (type 4c);
- 5 5. *Listeria monocytogenes* (type 4d);
6. *Listeria monocytogenes* (type 4e);
7. *Listeria grayi* (type 5).

10 Den for tiden af U.S. FDA godkendte påvisningsmetode for *Listeria* i mange fødevarerprodukter kræver kulde-berigelsesdyrking i mindst syv dage før afprøvning. Dette er arbejds- og tidsforbrugende og forsinker frigivelsen af det færdige produkt. For tiden er der ikke nogen hurtig og præcis test for *Listeria* tilgængelig, såsom én, hvori der anvendes monoklone antistoffer.

20 Mod målet, udvikling af en hurtig immunanalyse til *Listeria*-påvisning, er der blevet udviklet og karakteriseret monoklone antistoffer, som viser specificitet over for *Listeria*. Disse monoklone antistoffer er blevet omfattende afprøvet ved enzymbundne immunsorbentanalyser (ELISA) for reaktivitet i et bredt område med et panel af *Listeria*-serotyper (1-5). Der er blevet identificeret seksten monoklone antistoffer (tabel 1), som reagerer med varmeeekstrakter fra alle *Listeria*-arter, herunder

25 *L. monocytogenes* (serotyperne 1-4), *L. Grayi* (serotype 5), *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri* og *L. innocua*, med én undtagelse, nemlig *L. denitrificans*. *L. denitrificans*, som blev opnået fra ATCC, er blevet rapporteret som værende "uoverensstemmende med beskrivelsen af slægten *Listeria*" [ATCC Catalogue of Bacteria, Phages, and rDNA Vectors, 16. udgave, 1985,

30 side 96]. Ikke-reaktiviteten af de monoklone antistoffer mod *Listeria* med denne varmeeekstrakt kan derfor skyldes, at *L. denitrificans* ukorrekt er klassificeret i slægten *Listeria*.

Tabel 1

Screening af ELISA-reaktivitet hos monoklone antistoffer

5	Hybridombetegnelse	Monoklont antistof-isotype
	2-1C	IgG ₁
	2-3H	IgG ₁
	3-1D	IgG ₁
10	7-5H	IgG ₁
	7-6H	IgG ₁
	7-8H	IgG _{2a}
	8-7A	IgG _{2a}
	8-8A	IgG ₁
15	8-6D	IgG _{2a}
	8-9D	IgG ₁
	8-4H	IgG ₁
	9-5E	IgG ₁
	10-2A	IgG _{2a}
20	10-11A	IgG ₁
	10-7C	IgG ₁
	10-12C	IgG ₁

25 Specificiteten for *Listeria* ved hjælp af ELISA blev bekræftet ved afprøvning af de monoklone antistoffer mod et omfattende panel af relevante grampositive og gramnegative organismer, hvoraf mange ofte vokser ud af præberigede medier ved dyrkning for *Listeria*. Da ingen af de 16 monoklone antistoffer reagerede signifikant med nogen af ikke-*Listeria*-varmeekstrakterne, kan det konkluderes, at de genkender et slægtspecifikt *Listeria*-antigen.

35 Af de monoklone antistoffer, som er specifikke for *Listeria*, viste det sig, at de monoklone IgG_{2a}-antistoffer også viser reaktivitet med *S. aureus* (tabel 2). Dette viste sig imidlertid at skyldes tilstedeværelsen af cellevægsmateriale i varmeekstrakten, der bandt antistofferne.

Tabel 2

Protein A, ikke-specifik binding

5	Hybridom	Listeria monocyto- genes suspenderet	Listeria monocyto- genes centrifugeret	Staphylococ- cus aureus suspenderet	Staphylococ- cus aureus centrifugeret
10	2-1C	+2	+2	-	-
	2-3H	+3	+3	-	-
	3-1D	+3	+3	-	-
	7-5H	+2	+2	-	-
	7-6H	+2	+2	-	-
15	7-8H	+4	+4	+2	-
	8-7A	+4	+4	+2	-
	8-8A	+2	+2	-	-
	8-6D	+4	+4	+3	-
	8-9D	+3	+3	-	-
20	8-4H	+2	+2	-	-
	9-5E	+3	+3	-	-
	10-2A	+3	+3	+3	-
	10-11A	+2	+2	-	-
	10-7C	+2	+2	+4	+3
25	10-12C	+3	+3	-	-
	IgG ₁ kontrol	-	-	-	-
	IgG _{2a} kontrol	-	-	+2	-

Nøgle: - = < 0,2

- 30 +1 = 0,2 til 0,5
 +2 = 0,5 til 1,0
 +3 = 1,0 til 2,0
 +4 = > 2,0

35 Da dette blev fjernet ved centrifugering, blev det konklude-
 ret, at bindingen af de monoklone IgG_{2a}-antistoffer til S. au-
 reus formidledes af protein-A i cellevæggen, som vides at
 binde IgG_{2a} gennem deres Fc-del [J. Goding (1987), J. Immunol.

Meth. 20:241]. Konklusionen blev understøttet af den kendsgerning, at ingen af de *Listeria*-specifikke monoklone IgG₁-antistoffer, der generelt binder protein-A med mindre affinitet end IgG_{2a} [Goding, (1987)], gav en positiv reaktion med *S. aureus*. Der blev også identificeret et monoklont antistof, 10-7C, som så ud til at genkende alle grampositive organismer. 10-7C fortsatte med at reagere med både *Listeria*- og *S. aureus*-varmeeekstrakter på trods af centrifugering.

Der er blevet karakteriseret antigener, med hvilke de foreliggende *Listeria*-specifikke monoklone antistoffer reagerede ved Western-aftryksanalyse. Alle 16 *Listeria*-specifikke monoklone antistoffer genkendte et protein i molekylvægtsområdet fra 30 til 38 kD under både reducerende og ikke-reducerende betingelser. De monoklone IgG_{2a}-antistoffer og nogle af de monoklone IgG₁-antistoffer bandt også antigener med lavere molekylvægt, som varierede i størrelse fra cirka 17 kD til størrelsen af hovedantigenet. Hovedantigenet blev fundet i to molekylvægtsområder, afhængigt af den afprøvede *Listeria*art. I *L. monocytogenes* (serotyperne 1-4), *L. ivanovii*, *L. seeligeri* og *L. innocua* er dette antigen cirka 30 til 34 kD. I *L. grayi* og *L. murrayi* er det cirka 34 til 38 kD.

Der ser ud til at være mindst tre grupper *Listeria*-specifikke monoklone antistoffer baseret på underisotypeanalyse- og ELISA- og Western-aftryksresultater. Én gruppe (gruppe I) består af monoklone IgG₁-antistoffer, der generelt fremkaldte mindre ELISA-signaler og kun så ud til at reagere med det slægtsspecifikke antigen i området 30 til 38 kD (se figur 1, for eksempel monoklont antistof 9-5E). Den anden gruppe (gruppe II) består af monoklone IgG₁-antistoffer, som generelt fremkaldte middelstore ELISA-signaler og primært blev bundet til 30-38 kD antigenet, men også genkendte 2 til 4 antigener med lavere molekylvægt (se figur 1, for eksempel monoklont antistof 10-12C). Den tredje gruppe (gruppe III) består af monoklone IgG_{2a}-antistoffer, der generelt fremkaldte større ELISA-aflæsninger og primært blev bundet til 30-38 kD-antigenet, men som også genkendte mindst 4 antigener med lavere molekyl-

vægt (se figur 1, for eksempel monoklont antistof 10-2A). Eksistensen af mindst tre epitopspecificiteter blev yderligere understøttet af den vellykkede anvendelse af flere af disse monoklone antistoffer i en 2-stedssandwich-ELISA, som viste
5 den identiske specificitet som beskrevet her for de individuelle monoklone antistoffer. Desuden blev det grampositivspecifikke monoklone antistof, 10-7C, karakteriseret som klart bindende til et andet antigen end de Listeriaspecifikke, monoklone antistoffer, baseret på både ELISA- og Western-aftryks-
10 resultater.

Ifølge den foreliggende opfindelse kan *Listeria* påvises med høj specificitet i en prøve ved anvendelse af antistoffer, som er rettet mod det ovennævnte antigen. Der kan fordelagtigt anvendes monoklone antistoffer, og der kan især anvendes mono-
15 klone antistoffer hørende til de ovenfor angivne grupper I, II og/eller III.

Nærmere bestemt kan der anvendes ét eller flere af de 16 *Listeriaspecifikke*, monoklone antistoffer, som definerer et slægtsspecifikt proteinantigen i området 30 til 34 kD eller 34 til 38 kD, afhængigt af arten.

20

Til denne *Listeria*-påvisning kan anvendes ethvert egnet format for immunanalyser. Et meget egnet format til dette formål er den såkaldte sandwichanalyse, mest bekvemt under anvendelse af enzymer, radioaktive atomer eller grupper, fluorescerende forbindelser, kromoforer, eller metal- eller farvesolpartikler som mærker. Alternativt kan der anvendes en såkaldt inhiberingsanalyse, hvori *Listeria*antigenet i prøven konkurrerer med *Listeria*antigenet ifølge opfindelsen om binding til et fælles antistof. I dette format bindes enten *Listeria*antigenet ifølge opfindelsen eller antistoffet der imod til en fast fase, og den anden forbindelse bindes til et mærke som tidligere beskrevet. I endnu en anden alternativ analysemetode påvises *Listeria* i prøven ved agglutineringsinhibering. Ved agglutineringsinhibering bringes *Listeria*prøven i kontakt med antistoffer, hvorefter der sker aggregering af *Listeria*anti-
25
30
35

gener og antistoffer, som til slut resulterer i dannelsen af et sediment. Sedimentation af aggregatet kan forøges ved anvendelse af antistoffer, som er bundet til partikler såsom latices, erythrocytter, solpartikler af farvestoffer, metaller eller metalforbindelser etc. På den anden side bringes i agglutineringsinhiberingsanalyser ifølge opfindelsen prøven, der skal undersøges, i kontakt med en blanding af Listeriapartikelbundet antigen og antistoffer der imod, hvilken blanding aggregerer og til slut sedimenterer i fravær af Listeria i prøven. Denne agglutinerings vil blive inhiberet i nærværelse af frie Listeria-antigener i prøven.

I enhver af disse ovenfor beskrevne analysemetoder kan der som en prøve anvendes et fødevareprodukt eller en fraktion deraf, der eventuelt kan være forbehandlet for at frigøre Listeria-antigenerne.

Forsøgssæt til udførelse af de ovenfor beskrevne analyser samt hidtil ukendte komponenter til brug i et sådant forsøgssæt hører også til den foreliggende opfindelse.

Hidtil ukendte forsøgssætkomponenter ifølge opfindelsen er de ovenfor nævnte antigener eller fragmenter deraf eller antistoffer der imod bundet til en fast bærer, til et mærke eller til en partikel. Egnede faste bærere i denne forbindelse er prøverør, brønde i mikrotitreringsplader, kugler, stave, stænger etc.

Hensigtsmæssigt kan forsøgssæt til sandwichanalyser omfatte som essentielle komponenter:

a. fast bærer-bundet antigen ifølge opfindelsen eller antistof der imod, og

b. mærket antistof mod antigenet,

eller:

a. fast bærer-bundet antistof ifølge opfindelsen, og

b. mærket antigen ifølge opfindelsen.

- 5 Forsøgssæt til agglutineringsanalyser omfatter mest hensigtsmæssigt antistoffer ifølge opfindelsen bundet til partikler.

Antigenet ifølge opfindelsen kan oprenses fra Listeriaarten ved biokemiske teknikker, der er kendte inden for fagområdet.
10 Der kan især anvendes immunsorbentteknikker, hvor antigenet indfanges af søjlebundne antistoffer (fortrinsvis monoklone antistoffer af grupperne I, II og III eksemplificeret ved henholdsvis antistofferne 9-5E, 10-12C og 10-2A) og derefter elueres fra søjlen ved brydning af antigen-antistof-bindingen.

15

Eksempler

Bakteriekulturer

- 20 Kulturer (se tabel 3) af Listeria og andre organismer blev bi-beholdt på agarskråkulturer eller som stikkulturer ved 4°C på medier indeholdende Tryptic Soy Broth (TSB) (BBL) + 0,6% gær-ekstrakt (YE) (BBL) + 1,5% bacto-agar (Difco).

25

30

35

Tabel 3

Bakteriekulturer

Benævnelse	Organisme	Type	Stamme
L1	<u>Listeria monocytogenes</u>	--	--
L5	<u>L. innocua</u>	--	--
L8	<u>L. monocytogenes</u>	1a	V-7
SB1	<u>L. ivanovii</u>	5	KC1714
SB2	<u>L. ivanovii</u>	--	ATCC 19919
SB3	<u>L. monocytogenes</u>	3b	SE35
SB4	<u>L. monocytogenes</u>	3a	KC 1708
SB5	<u>L. monocytogenes</u>	1a	V-7
SB6	<u>L. monocytogenes</u>	--	F3406
SB7	<u>L. monocytogenes</u>	4b	F9061
SB8	<u>L. monocytogenes</u>	1/2a	F9014

Benævnelse	Organisme	Type	Stamme
SB9	<u>L. monocytogenes</u>	3b	SE31
SB10	<u>L. monocytogenes</u>	1b	Brie 1
SB11	<u>L. monocytogenes</u>	4b	KC1710
SB12	<u>L. monocytogenes</u>	1/2a	F9190
SB13	<u>L. monocytogenes</u>	--	F2379
SB14	<u>L. monocytogenes</u>	4b	F9089
SB15	<u>L. monocytogenes</u>	1/2b	F8964
SB16	<u>L. monocytogenes</u>	1a	Brie 18
SB17	<u>L. monocytogenes</u>	3	ATCC 19113
SB18	<u>L. monocytogenes</u>	3a	F8828
SB19	<u>L. monocytogenes</u>	4b	Scott A
SB20	<u>L. monocytogenes</u>	3b	F9035
SB21	<u>L. monocytogenes</u>	1/2b	F9069
SB22	<u>L. innocua</u>	--	ATCC 33091
A1	<u>L. denitrificans</u>	--	ATCC 14870
A2	<u>L. grayi</u>	--	ATCC 25400
A3	<u>L. monocytogenes</u>	1	ATCC 19111
A4	<u>L. monocytogenes</u>	2	ATCC 19112
A5	<u>L. monocytogenes</u>	4a	ATCC 19114
A6	<u>L. monocytogenes</u>	4c	ATCC 19116
A7	<u>L. monocytogenes</u>	4d	ATCC 19117
A8	<u>L. monocytogenes</u>	4e	ATCC 19118
A9	<u>L. denitrificans</u>	--	ATCC 14870
A10	<u>L. grayi</u>	5	ATCC 25400
A11	<u>L. murrayi</u>	--	ATCC 25401
A12	<u>L. seeligeri</u>	--	ATCC 25967
L6	<u>Streptococcus sp</u>	--	--
A13	<u>S. cremoris</u>	--	ATCC 19257
A14	<u>S. bovis</u>	--	ATCC 27960
A15	<u>S. pyogenes</u>	--	ATCC 19615
A16	<u>S. thermophilus</u>	--	ATCC 14485
A17	<u>S. fecalis</u>	--	ATCC 828
L7	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	--	--
A18	<u>P. fluorescens</u>	--	ATCC 949
A19	<u>Micrococcus varians</u>	--	ATCC 15306
A20	<u>Staphylococcus aureus</u>	--	ATCC 12598
A21	<u>S. epidermidis</u>	--	ATCC 155
A22	<u>S. haemolyticus</u>	--	ATCC 29970
A23	<u>Enterobacter aerogenes</u>	--	ATCC 13048
A24	<u>Escherichia coli</u>	--	ATCC 4157
A25	<u>Lactobacillus casei</u>	--	ATCC 393
A26	<u>Actinomyces pyogenes</u>	--	ATCC 8104
A27	<u>Erysipelothrix rhusiopathiae</u>	--	ATCC 15306
J1	<u>Staphylococcus aureus</u>	--	ATCC 12598

Fremstilling af bakterievarmeekstrakter

Rør med 10 ml TSB + 0,6% YE blev podet fra agarskråkulturer eller stik, og organismerne fik lov til at vokse i 4 dage ved 22°C. Rørene blev derefter centrifugeret ved 1000 o/m ved 25°C i 10 minutter. Supernatanterne blev aspireret og pellet gensuspenderet i 1,0 ml steril, fosfatpufret saltopløsning (PBS). De gensuspenderede pellets blev opvarmet i kogende vandbad i 30 minutter og lagret ved 4°C indtil brug.

Dyrkede celler

P3X63Ag8.653 musemyelomceller og L929-musefibroblaster (ATCC, Rockville, MD, USA) blev dyrket i Iscove's modificerede Dulbecco's medium (Iscove's), (Mediatech Inc., Herndon, VA, USA) indeholdende 10% føtalt bovint serum (FBS), (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA). Kulturerne blev bibeholdt i 75 mm² dyrkningskolber (Corning Glassworks, Corning, NY, USA) i en fugtet CO₂-inkubator (Queue Systems, Inc., Parkersburg, WV, USA) ved 37°C i en atmosfære med 93% luft/7% CO₂. Til fusioner anvendtes myelomceller i log-vækstfase (< 5x10⁵ celler/ml). Til fremstilling af konditioneret medium blev L929-celler dyrket som et monolag i 3 til 4 dage. Mediet blev derefter høstet, sterilfiltreret (0,22 µ) og lagret frosset (-20°C).

Dyr

BALB/c-hunmus (Charles River, Cambridge, Mass., USA) eller CD2F1-hunmus (CBA x BALB/c) anvendtes i en alder på 8 til 12 uger. Til ascitesproduktion blev CD2F1-mus primerbehandlet med 2,6,10,14-tetramethylpentadecan (Pristane), (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA) i 10 til 14 dage før celleinjektion.

Immuniseringer

BALB/c-mus fik administreret 100 µl af en varmeekstrakt fra *Listeria monocytogenes* (L1, Dr. R. Flowers, Silliker Lab.,

Chicago Heights, IL, USA) ved subkutan injektion og blev derefter boosterbehandlet ved intraperitoneal injektion med det samme antigen i ugerne 4, 10 og 15. Milten fra den bedste immunreaktionsgivende mus som bestemt ved ELISA-reaktivitet blev fjernet 3 dage efter den sidste boosterbehandling og anvendt til en hybridomfusion.

Cellefusion

Musemyelomceller og immune splenocytter blev sammensluttet i 50% polyethylenglycol (PEG 1000) (Kodak) i et forhold på 1:5 under anvendelse af en modifikation af teknikken beskrevet af Kohler og Milstein [G. Köhler og C. Milstein (1975) Nature 256:495]. Sammensluttede celler blev gensuspenderet i 100 ml Iscove's +20% FBS og fordelt i ti 96-brændes mikrotitreringsdyrkningsplader (Corning) i en densitet på $2,2 \times 10^5$ celler/brønd. Efter 24 timers forløb tilsattes HAT-selektivt medium [Iscove's +20% FBS indeholdende hypoxanthin (H), aminopterin (A) og thymidin (T)], og mediet blev skiftet hver 3. til 4. dag, indtil makroskopisk vækst var synlig. Kulturer, som viste positiv vækst i HAT, blev screenet for monoklone antistoffer mod Listeria som beskrevet nedenfor. Positive kulturer blev udstrakt til dyrkningsplader med 24 brønde (Corning) og derefter klonet to gange ved begrænsning af fortynding i Iscove's indeholdende 50% L929-konditioneret medium, 20% FBS og HT, idet cellerne blev vænnet fra aminopterin.

ELISA-screening af hybridomer

Primær screening

Hybridomkulturer, som viste makroskopisk vækst, blev screenet for reaktive, monoklone antistoffer ved hjælp af ELISA under anvendelse af varmeeekstraherede Listeria-antigener bundet til mikrotiterplader. Til dette formål blev Immulon 2-polystyrenplader (flad bund), (Dynatech Laboratories, Inc. Alexandria, VA, USA) belagt natten over (4°C) med en varmeeekstrakt af L1 fortyndet 1:100 i PBS (100 µl/brønd). Pladerne blev blokeret

med PBS indeholdende 3% fiskegelatine i 60 minutter (22°C) og derefter inkuberet med hybridom-supernatanter (100 µl/brønd) i 60 minutter (37°C). Efter 3 ganges vask blev pladerne inkuberet i 60 minutter (37°C) med 0,1 µg/ml peberrodsperoxidasekonjugerede, polyklone gedeantistoffer over for muse-IgG+IgM+IgA (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA). Efter fem ganges vask blev pladerne fremkaldt i 30 minutter (22°C) med tetramethylbenzidinsubstratopløsning (100 µl/brønd), (Organon Teknika Corp., Durham, NC, USA), og den kromogene reaktion blev afsluttet med 4 N H₂SO₄ (100 µl/brønd). Optiske densitetsværdier (OD) blev bestemt ved en bølgelængde på 450 nm under anvendelse af en automatiseret pladeaflæser (model EL309, BioTek Instruments, Inc., Burlington, VT, USA) med luft som blindværdi. Et positivt resultat blev fortolket til at være en OD-aflæsning på mere end 0,2.

Anden screening af hybridomer

Kulturer, som viste positiv reaktivitet i den primære screening, blev afprøvet igen mod et panel af *Listeria*- og ikke-*Listeria* varmeeekstrakter som beskrevet ovenfor. Panelet bestod af *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Streptococcus*-art, *Pseudomonas*-art, *Salmonella typhi* og *Escherichia coli*.

Specificitetsafprøvning af monoklone antistoffer mod *Listeria*

Positive monoklone antistoffer fra den anden screening blev afprøvet mod et omfattende panel af *Listeria*-varmeeekstrakter under anvendelse af det samme ELISA-format. De afprøvede organismer omfattede 26 forskellige præparater af *L. monocytogenes*, 2 af *L. ivanovii* og 1 af hver af *L. innocua*, *L. grayi*, *L. denitrificans*, *L. murrayi* og *L. seeligeri*.

Et omfattende panel af grampositive organismer, der kan vokse i den samme suppe og forårsage bekymring om krydsreaktivitet, blev afprøvet ved hjælp af ELISA under anvendelse af hybridom-supernatanter ved at følge den ovenfor beskrevne procedure. Dette panel bestod af *Micrococcus varians*, *Streptococcus cre-*

moris, *S. pyogenes*, *S. bovis*, *S. thermophilus*, *S. fecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus*, *Actinomyces pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei* og *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

5

I nogle tilfælde blev varmeeekstrakter af *S. aureus* og *L. monocytogenes* først centrifugeret ved 12.000 x g i 5 minutter ved 22°C (Microfuge, Beckman Instruments) for at fjerne bakteriecellerester. Supernatanten anvendtes derefter til pladebelægning (1:100) og inkubation med hybridomsupernatanter som beskrevet ovenfor.

10

Et panel af varmeeekstrakter fra gramnegative organismer blev afprøvet under anvendelse af det samme ELSA-format og omfattede *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* og *Salmonella typhi*.

15

Fremstilling og oprensning af monoklone antistoffer

Ascitesvækst af hybridomkloner til fremstilling af milligrammængder af monoklone antistoffer blev opnået ved injektion af $3,0 \times 10^6$ celler i pristan-primerbehandlede CD2F1-mus og høst af fluida 10 til 14 dage senere. Monoklone antistoftiters blev bestemt ved hjælp af ELISA under anvendelse af *L. monocytogenes*-varmeeekstrakt (L1) bundet til mikrotitreringsplader som beskrevet ovenfor. Monoklone antistoffer blev affinitetsoprensede ved protein-A-sepharosekromatografi (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, USA) og lagret ved -70°C indtil brug.

25

Immunkemisk karakterisering af monoklone antistoffer

30

Monoklont antistof-underisotypeanalyse blev udført under anvendelse af et kommercielt dobbeltimmundiffusionssæt (ICN Immunobiologicals, Lisle, IL, USA). Identifikation af målantigener blev opnået ved Western-aftryksanalyse af *L. monocytogenes*-varmeeekstrakt (L1) fra SDS-PAGE-geler. Proteiner blev elektroforesebehandlede på en diskontinueret SDS-gradientpolyacrylamidgel (5 til 15%) [U.K. Laemmli, (1970),

35

- Nature 227:680] og derefter overført til nitrocellulose ved elektroaftryk [H. Towbin, T. Staehelin og J. Gordon, (1979), P.N.A.S. 76:4350]. Aftrykkene blev blokeret i 2 timer (37°C) i PBS indeholdende ikke-fed tømælk, skyllet to gange i PBS + 0,05% Tween® 20 og derefter mærket som følger: 1 cm strimler af det præparative aftryk blev inkuberet med individuelle hybridomklonsupernatanter i 2 timer (37°C) under omrøring og derefter skyllet to gange som ovenfor og yderligere inkuberet i 60 minutter ved 37°C med 0,25 µg/ml HRP-konjugerede gedefantistoffer mod muse-IgG + IgM (H+L) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Efter to ganges vask blev aftrykkene farvet (22°C) med PBS indeholdende 0,06% diaminobenzidin (Sigma) + 0,03% H₂O₂.
- Adskillige paneler af varmeeekstrakter fra flere *Listeria*- og ikke-*Listeria*organismer blev underkastet analytisk SDS-gradient-PAGE- og Western-aftryksanalyse som beskrevet ovenfor. Panelerne bestod af *L. monocytogenes* (serotyperne 1-4), *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. denitrificans*, *L. seeligeri*, *L. murrayi*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhi* og *Citrobacter freundii*. Udvalgte oprensede monoklone antistoffer (5 µg/ml) anvendtes derefter til immunfarvning af dette panel som beskrevet ovenfor.

Oprensning og konjugering af antistoffer

- 10-15 ml ascites blev blandet 1:2 med bindingspuffer, pH-værdi 9,0, (Affi-Gel Protein A MAPS II Buffers, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) og påført på en 30 ml Protein A-søjle (Sephacrose 4B-CL-protein A, Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA). Antistof blev elueret under anvendelse af elueringspufferen, pH-værdi 3,0 (Bio-Rad). Proteinet blev registreret ved 280 nm og fraktioner opsamlet.

I nogle tilfælde blev disse antistoffer yderligere konjugeret til peberrodsperoxidase (Sigma type VI, St. Louis, MO, USA)

under anvendelse af metoden ifølge P.K. Nakane og A. Kawaoi [(1974) J. Histochem. Cytochem. 22:1084].

ELISA-procedure med indfangning i et trin

5 Immulon Microtiter®-plader (Dynatech) blev belagt natten over (4°C) med protein A-oprenset 10-12C (gruppe II) (100 µg/brønd), fortyndet til 10 µg/ml i 0,05 M natriumcarbonat/-bicarbonatpuffer (pH-værdi 9,6). Pladerne blev blokeret med en
10 proteinpuffer i 30 minutter ved stuetemperatur. Efter aspire-ring af blokeringsopløsningen tilsattes 100 µl af varmeekstrakten og 100 µl af HRP-konjugatet 10-2A (gruppe III) (0,25 µg/ml) på samme tidspunkt (éttrins-ELISA) og der inkuberedes i 60 minutter ved 37°C. Efter inkubationen blev pladerne vasket
15 6 gange, og 100 µl/brønd tetramethylbenzidin (KPL)-substrat tilsattes. Pladen blev inkuberet ved stuetemperatur i 30 minutter, hvorpå der tilsattes 100 µl/brønd 2 N H₂SO₄. Den optiske densitet blev målt ved 450 nm i en automatiseret pladeaflæser (Bio-Tek) med luft som blindværdi. 100 µl PBS anvendes
20 som en negativ kontrol.

Modifikationer af denne procedure blev udført i nogle tilfælde ved anvendelse af et andet monoklont antistof på pladerne til
indfangning af antigenet, eller ved anvendelse af en kombina-
25 tion af monoklone antistoffer fra to eller tre forskellige grupper. Tilsvarende modifikationer blev ofte udført under anvendelse af andre HRP-konjugerede monoklone antistoffer enten individuelt eller i kombination.

30 Resultater

Screening af hybridomkulturer

35 Af 511 afprøvede hydromer viste 37 positiv ELISA-reaktivitet med L. monocytogenes-(L1)-varmeekstrakten. Positive materialer blev derefter udvidet og afprøvet igen mod et lille panel af Listeria- og ikke-Listeria-varmeekstrakter for at bestemme deres specificitet. Seksten af de 37 monoklone hybridomanti-

stoffer viste specificitet for *Listeria*. Alle 16 reagerede med både *L. monocytogenes* og *L. innocua*. De resterende 21 monoklone antistoffer viste forskellige reaktivitetsprofiler med ikke-*Listeria*-varmeekstrakter (*Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia*). Et af disse (10-7C), som reagerede med både *Listeria* og *Streptococcus*, blev tilbageholdt til yderligere undersøgelse.

Et omfattende panel af *Listeria*-varmeekstrakter anvendtes til ELISA-afprøvning af de 16 monoklone antistoffer mod *Listeria* for reaktivitet i et bredt område. Alle serotyper af *L. monocytogenes* (1-4) og alle andre *Listeria*-arter bortset fra *L. denitrificans* blev påvist af de 16 monoklone antistoffer.

Et panel af varmeekstrakter fra grampositive organismer, som sædvanligvis er til stede i forberigede supper fra fødevarerprøver, blev afprøvet for ELISA-krydsreaktivitet med de 16 monoklone antistoffer mod *Listeria*. Ingen af de 16 reagerede specifikt med disse varmeekstrakter. De monoklone IgG_{2a}-antistoffer, herunder en irrelevant IgG_{2a}-kontrol, viste imidlertid en positiv reaktion med *S. aureus*-varmeekstrakten. Denne reaktion blev elimineret ved centrifugering af varmeekstrakten til fjernelse af cellevægsmateriale før anvendelse til ELISA-pladebelægning. Centrifugering af *Listeria*-varmeekstrakten påvirkede imidlertid ikke bindingen af monoklont antistof (tabel 2). Det er også interessant at bemærke, at 10-7C (IgG₁) bandt til alle undersøgte grampositive organismer, herunder *S. aureus*. Reaktiviteten af 10-7C med *S. aureus* blev ikke ophævet ved præcentrifugering af varmeekstrakten.

Et panel af varmeekstrakter fra gramnegative organismer blev også afprøvet for ELISA-krydsreaktivitet under anvendelse af de 16 monoklone antistoffer mod *Listeria*. Ingen af de monoklone antistoffer mod *Listeria* gav en positiv reaktion med nogen af disse organismer.

Isotype- og Western-aftryksanalyse

Isotypeanalyse af klonede hybridomsupernatanter afslørede, at alle 16 producerede monoklone IgG-antistoffer. Tolv var IgG₁ og 4 var IgG_{2a}. Oprensede monoklone antistoffer fra hver af de 16 hybridomkloner anvendtes til afprøvning af *Listeria monocytogenes* (L1)-varmeekstrakten i Western-aftryk. De 16 *Listeria*-specifikke monoklone antistoffer genkendte et proteinantigen med en molekylvægt i området fra 30 til 38 kD under både reducerende og ikke-reducerende betingelser. Desuden genkendte de monoklone IgG_{2a}-antistoffer (gruppe III) og nogle af de monoklone IgG₁-antistoffer (gruppe II) også bånd med lavere molekylvægt (figur 1).

For yderligere at analysere antigenfordelingen og -størrelsen blev varmeekstrakter fra både *Listeria* og ikke-*Listeria* elektroforesebehandlede, aftrykt og undersøgt med udvalgte monoklone antistoffer mod *Listeria*. Kun *Listeria*-varmeekstrakterne viste sig at indeholde det antigen, der genkendtes af de monoklone antistoffer (figur 2). Interessant observeredes en let variation i molekylvægt af hovedantigenet (30 til 38 kD) mellem de forskellige serotyper af *L. monocytogenes* (figur 3). Det er yderligere interessant at bemærke, at *L. grayi*- og *L. murrayi*-antigenerne var cirka 5 kD større end ethvert af *L. monocytogenes*-antigenerne. I overensstemmelse med ELISA-resultaterne indeholdt *L. denitrificans* ikke det antigen, der genkendes af de monoklone antistoffer mod *Listeria* (figurerne 2 og 3). Desuden indeholdt ingen af ikke-*Listeria*-varmeekstrakterne dette antigen (figur 2). Disse resultater var ensartede, uafhængigt af, hvilket monoklont antistof mod *Listeria*, som blev afprøvet. 10-7C, som har en anden ELISA-reaktivitetsprofil, reagerede imidlertid ikke med nogen af *Listeria*-polypeptidantigenerne i Western-aftrykkene (figur 1).

30-34 kD- og 34-38 kD-hovedantigenet, idet molekylstørrelsen varierede let men reproducerbart med arten, indeholder altid tre epitoper. Hvert monoklont antistof, som identificeres som immunspecifikt for dette antigen, reagerer med én af disse 3 epitoper. To af de således definerede tre epitoper fremkommer også i antigener med en molekylstørrelse, som varierer mellem 17 kD og molekylvægten for hovedantigenet.

Typiske ELISA-resultater er vist i tabel 4.

Tabel 4

5 ELISA-resultater med ettrins-indfangning

	Organisme	Fortynding	OD ₄₅₀
	Negativ kontrol (PBS)	-	0,084
10	L. monocytogenes (L1)	1:100	>3,0
	L. monocytogenes (L1)	1:1.000	1,245
	L. monocytogenes (L1)	1:10.000	0,386
	L. grayi	1:100	>3,0
	L. grayi	1:1.000	0,645
15	L. ivanovii	1:100	2,205
	L. ivanovii	1:1.000	0,482
	L. innocua	1:100	>3,0
	L. innocua	1:1.000	1,487
	L. innocua	1:10.000	0,405
20	L. seeligeri	1:100	1,769
	L. seeligeri	1:1.000	0,496
	L. murrayi	1:100	1,512
	L. murrayi	1:1.000	0,468
	Staphylococcus aureus	1:10	0,144
25	Staphylococcus faecalis	1:10	0,138
	Lactobacillus casei	1:10	0,149
	Actinomyces pyogenes	1:10	0,131
	Erysipelothrix rhusiopathiae	1:10	0,091
30	Når et antistof af gruppe II (10-12C) anvendes på pladen som en indfanger og et andet antistof af gruppe III (10-2A) HRP-mærkes og anvendes som konjugatet, identificeres varmeeekstrakter af alle afprøvede Listeria nemt som positive ved denne analyse, og varmeeekstrakter af alle afprøvede ikke-Listeria		
35	identificeres nemt som negative. I de fleste tilfælde kunne Listeria-varmeeekstrakterne fortyndes 2-4 log 10-fortyndinger og forblive positive.		

Deponeringer af F61/9-5E (9-5E), F61/10-12C (10-12C) og F6/10-2A (10-2A) blev foretaget ved ATCC i Rockville, USA under numrene henholdsvis HB 9493, HB 9494 og HB 9492 den 7. august 1987.

5

10

15

20

25

30

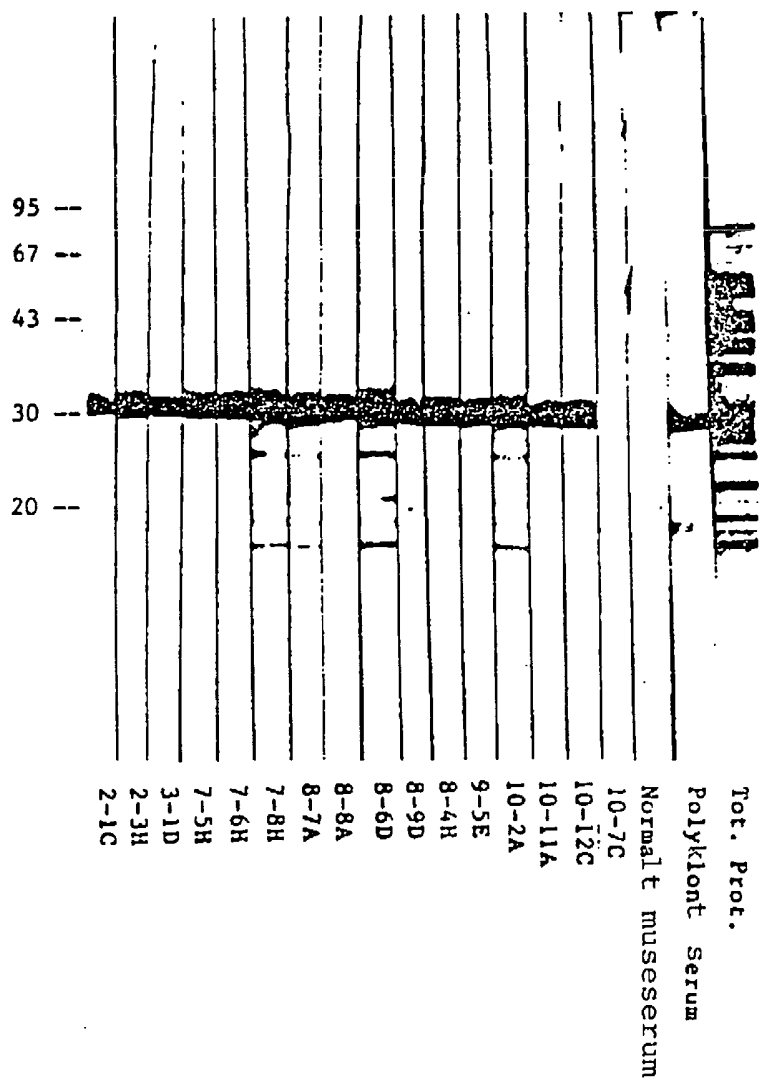
35

P A T E N T K R A V

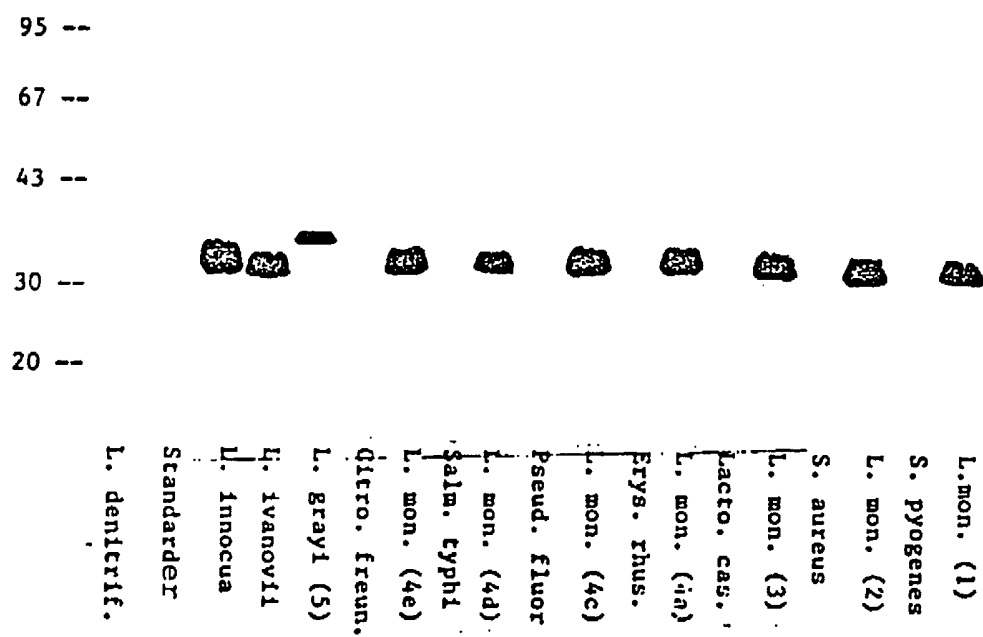
1. Antigen, k e n d e t e g n e t ved, at det er karakteristisk for Listeria-arter og er reaktivt med mindst ét af de monoklonale antistoffer valgt blandt 9-5E, 10-12C og 10-2A
5 deponeret ved ATCC med de respektive accessionsnumre HB9493, HB9494 og HB9492, og idet antigenet omfatter et protein, som findes i Listeria-varmeekstrakter, og som har en molekylvægt på fra ca. 30 til ca. 38 kD, idet antigenet omfatter tre immunologisk forskellige epitoper, hvortil antistoffer produceret af miltceller fra mus immuniseret med Listeria-varmeekstrakterne er specifikt reaktive, og idet antigenet findes i varme-
10 ekstrakter af alle Listeria-arter bortset fra L. denitrificans.
2. Antistof, k e n d e t e g n e t ved, at det er immunreaktivt med Listeria-antigenet ifølge krav 1.
3. Monoklont antistof mod antigenet ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved en epitop-specificitet af et monoklonalt antistof valgt blandt 9-5E, 10-12C og 10-2A deponeret ved
15 ATCC med de respektive accessionsnumre HB9493, HB9494 og HB9492.
4. Monoklonalt antistof ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at det er fremstillet ved immunisering af et dyr med Listeria-varmeekstrakter, udødeliggørelse af antistofproducerende celler fra dyret, dyrkning af de udødeliggjorte celler til fremstilling af antistoffer og udvælgelse af udødeliggjorte celler, der fremstiller antistoffer, som er immunre-
20 aktive med antigenet.
5. Immunanalysefremgangsmåde til påvisning af Listeria i en prøve, k e n d e t e g n e t ved, at prøven inkuberes med mindst et antistof, som er immunreaktivt med antigenet ifølge krav 1.

6. Immunanalyseforsøgssæt til påvisning af *Listeria*, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter mindst et antistof, som er immunreaktivt med antigenet ifølge krav 1.
 7. Immunreagens, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter et antigen ifølge krav 1 eller et antistof, som er immunreaktivt med antigenet bundet til en fast bærer, et mærke eller
- 5 en partikel.

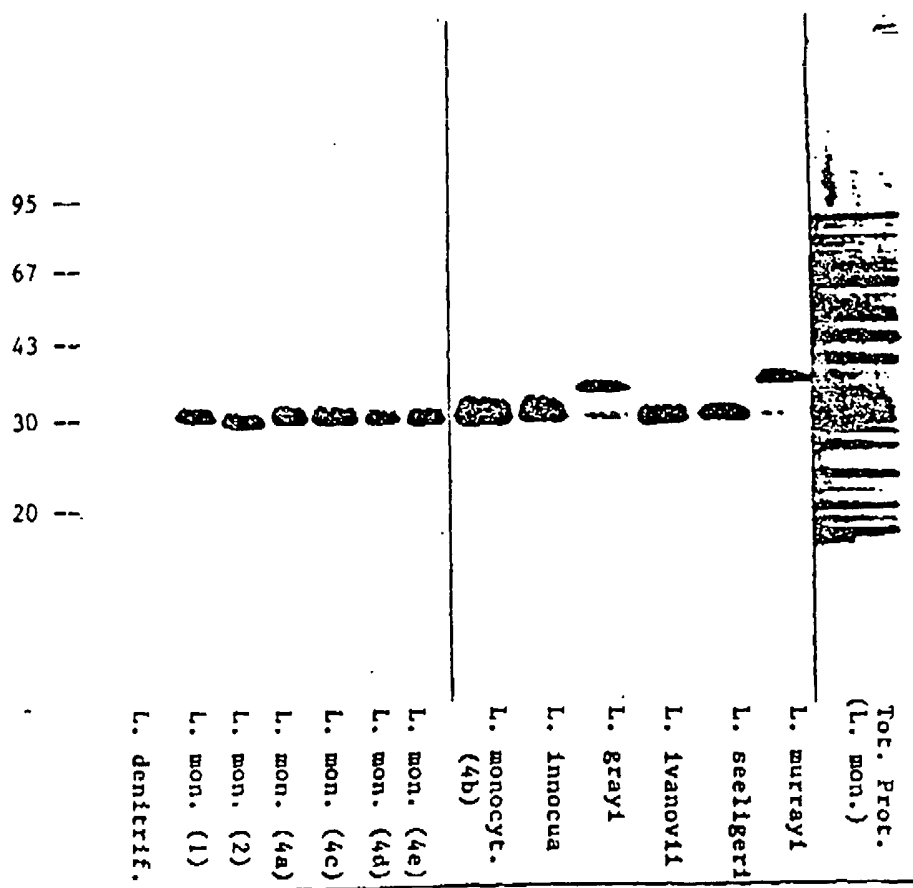
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

Gruppe I (3-1D) Gruppe II (10-12C) Gruppe III (10-2A)

