

Afslutningsrapport

Udvikling af flowcytometriske metoder til påvisning og kvantificering af *Listeria monocytogenes* i mælk

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1996-7

Januar 1996



mejeriforeningen

danish dairy board

Udvikling af flowcytometriske metoder til påvisning og kvantificering
af *Listeria monocytogenes* i mælk, mejeriprodukter og mejerimiljø.

KVL

Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet

Levnedsmiddelmikrobiologi

Rolighedsvej 30

1958 Frederiksberg C

Marts 1997

Udvikling af flowcytometriske metoder **til** påvisning og kvantificering af *Listeria monocytogenes* i mælk, mejeriprodukter og mejerimiljø.

1. Projektleder

Professor Niels Skovgaard 1/9-92 til 31/ 12-93

Professor Mogens Jakobsen Fra 1/1-93

2. Medarbejdere

Dyrlæge, Ph.D.-studerende Charlotte Nexmann Jacobsen

Laborant Heidi Rasmussen

KVL, Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet

Rolighedsvej 30

1958 Frederiksberg C

3.a Resumé

Indledende blev et *Listeria* specifikt substrat udviklet med henblik på en 24-timers to-trins opformeringsmetode. Anvendelsen af fem forskellige farvestoffer til viabilitetsfarvning af *Listeria monocytogenes*, efterfulgt af flowcytometrisk detektion, blev dernæst undersøgt. Højeste fluorescensintensitet af *L. monocytogenes*, med god reproducérbarhed samt god korrelation mellem de flowcytometriske tællinger og pladespredninger, blev observeret med farvestofferne CFDA og Chemchrome B. For begge farvemetoder observeredes den højeste fluorescensintensitet under den eksponentielle vækstfase, med en detektionsgrænse for *L. monocytogenes* på 10^4 celler/ml. Tillige sås ingen reduktion i fluorescensintensitet efter vækst i medier indeholdende selektive stoffer som nalidixinsyre, acriflavin og fosfomycin. Enstemmende resultater blev observeret for fem stammer af *L. monocytogenes*.

Sideløbende blev 55 monoklonale antistoffer samt et polyklonalt antistof screenet for specificitet.

Det blev besluttet at anvende det polyklonale antistof samt tre monoklonale antistoffer til videre forsøg.

Immunomagnetisk separation af *L. monocytogenes* baseret på paramagnetisk mærkning med jernpartikler (str. 0.05 µm) bundet til *Listeria-specifikke* antistoffer, fulgt af separation på en gradient-kolonne, blev herefter evalueret. *L. monocytogenes* blev således separeret, med en genfindelsesprocent mellem 60 % og 100 %. Efter vitalfarvning, kunne *L. monocytogenes* nemt detekteres på flowcytometeret. I blandingskulturer bl.a. med *Lactococcus lactis* som viser immunologisk krydsreaktion til det anvendte antistof, kunne *L. monocytogenes* tydeligt skelnes fra den anden kultur, på den flowcytometriske profil.

Den udviklede metode omfatter en 24 timers opformering af den undersøgte prøve, efterfulgt af immunomagnetisk separation og påvisning af tilstedeværende *Listeria* ved vitalfarvning og flowcytometri, med en meget høj følsomhed svarende til ca. $3 \cdot 10^4$ celler/ml opformeringsbouillon. Metoden er udviklet for det polyklonale antistof, men den er gennemført med henblik på en direkte anvendelse af specifikt antistof overfor *Listeria monocytogenes*, når dette bliver tilgængeligt.

3.b English summary

Initially a *Listeria-specific* enrichment broth was developed with regard to a day to day two-step enrichment procedure. Viability staining and flow cytometric detection of viable *L. monocytogenes*, using five different fluorescent dyes, then were investigated. The highest fluorescence intensity of *L. monocytogenes*, showing high reproducibility as well as good correlation between flow cytometric counts and colony forming units (CFU), was obtained using CFDA and Chemchrome B. For both staining reagents it was observed, that the fluorescence intensity increased during the exponential growth phase. The detection limit observed with these reagents in enrichment broths, was in the order of 10^4 cells/ml and no reduction of fluorescence intensity was observed after addition of *Listeria* selective agents such as nalidixic acid, acriflavine and phosphomycin. Similar results were obtained for five different strains of *L. monocytogenes*.

Fifty five monoclonal *anti-Listeria* antibodies and 1 polyclonal antibody were screened in relation to specificity. Three monoclonal antibodies and the polyclonal antibody were chosen for further experiments.

Immunomagnetic separation of *L. monocytogenes* using *Listeria-specific* antibodies, was then investigated. By this technique *L. monocytogenes* was successfully separated, with a recovery rate

between 60-100 %. Following separation and vitalstaining, *L. monocytogenes* was easily detected by flow cytometry. Using mixed cultures of *L. monocytogenes* and related species including *Lactococcus lactis* showing immunological cross reactions to the *Listeria* antibody, it was found, that the foreign bacteria were either eliminated by the immunomagnetic separation, or could be distinguished from *L. monocytogenes* by the flow cytometric profile. The combined use of immunomagnetic separation, based upon paramagnetic labeling with iron particles (size 0.05 µm) and separation on a high gradient column, vital staining and flow cytometry, made specific detection of *L. monocytogenes* in enrichment broth possible down to $3 \cdot 10^4$ cells per ml.

4. Formål

Det har været projektets mål, at udvikle en hurtig metode til specifik påvisning og kvantificering af *Listeria monocytogenes* i mælk, mejeriprodukter og mejerimiljø ved hjælp af flowcytometri.

5. Baggrund

Listeria monocytogenes er en patogen bakterie hvis tilstedeværelse i levnedsmidler medfører risiko for alvorlig levnedsmiddelbåren listeriose. Bakterien har lav morbiditet, men høj mortalitet specielt hos immunsvækkede personer. Fra mejerimiljø og bløde oste i Danmark, er isoleret serotyper svarende til typer, som har givet anledning til levnedsmiddelbårne epidemier i udlandet. *L. monocytogenes* hæmmes under syrningen af ostemælken, men dræbes ikke nødvendigvis. Organismen er desuden i stand til at vokse ved temperaturer ned til ca. 1 °C ved forholdsvis høje saltkoncentrationer og i atmosfære med nedsat iltspænding som f.eks. vacuum- eller gaspakning. Ved en senere pH stigning, som det sker i overflademodnede oste, vil *L. monocytogenes* derfor have mulighed for at opformere sig og hermed udgøre en potentiel risiko, specielt i oste med lang modningstid, eller med forlænget holdbarhed. Traditionel, specifik påvisning af *L. monocytogenes* er tidskrævende, min. 3-5 dage. Der er derfor behov for at udvikle en specifik, hurtigmetode, som kan detektere selv et ringe antal *L. monocytogenes* i såvel råvarer og færdige mejerivarer som i mejerimiljøet, for at undgå store økonomiske tab forbundet med kassation af færdigmodnede oste. Eksisterende hurtigmetoder, som ELISA, til påvisning af *L. monocytogenes* er endnu ikke tilstrækkeligt følsomme eller specifikke, ligesom det ikke er muligt at skelne mellem levende og døde celler.

Flowcytometri er en hurtig metode til kvantificering og analyse af individuelle celler i suspension. Cellerne mærkes med fluorescerende stof og injiceres i en strøm af bærevæske, hvor de enkeltvis føres til et måleområde, hvor egenskaber som størrelse, form, antistofreaktion, enzymaktivitet, intracellulært pH og nukleinsyresammensætning o. a. kan måles. En antistofbaseret flowcytometrisk metode til påvisning af *L. monocytogenes* er beskrevet, uden dog at være hverken følsom eller specifik nok.

Listeria monocytogenes er en meget lille bakterie. Mærkning af denne med fluorescerende antistof, giver ikke nødvendigvis fluorescens nok til at blive detekteret. Amplifikation af fluorescenssignalet kan foretages på flere måder.

Udviklingen af en flowcytometrisk hurtigmetode til specifik påvisning af *L. monocytogenes* i mælk, mejeriprodukter og mejerimiljø, kræver udvikling af et medium, som tillader specifik opformering af endog ganske få, svækkede *L. monocytogenes* i en massiv blandingsflora af nærtbeslægtede organismer.

6. Resultater

6.1 Bifag i immunologi

Efterår - vinter 1992, gennemgik Charlotte Nexmann Jacobsen bifag i Immunologi, ved Professor Bent Aasted. Faget blev afsluttet med eksamen i januar 1993.

6.2 Udvikling af opformeringsmedium

Væksten af *L. monocytogenes* blev undersøgt i BHI indeholdende 10 forskellige selektive forbindelser (lithium chlorid, acriflavin, nalidixinsyre, colistin, phenylethanol, moxalactam, ceftazidime, cycloheximid, fosfomycin, polymyxin B) alle tidligere anvendt i *Listeria-medier* samt 9 berigende stoffer (glukose, d-mannitol, Mg-sulfat, gær, Na-pyruvat, Na₂HPO₄, proteose pepton, trypton, æggeblomme) i forskellige koncentrationer og kombinationer. I undersøgelsen indgik 10 stammer af *Listeria monocytogenes* samt 15 ikke-*Listeria* stammer (*Micrococcus luteus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter anitratus*, *Enterococcus cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* samt *Klebsiella aerogenes*.

Den endelige opformering blev en to-trins opformering, med 6 timers indledende non-selektiv opformering ved 37°C i BHIÆMg, efterfulgt af tilsætning af nalidixinsyre, acriflavin og magnesiumsulfat og yderligere inkubation i 18 timer ved 37°C. Herved blev opnået en god hæmning af samtlige undersøgte non-*Listeria* med undtagelse af *Micrococcus luteus*.

6.3 Afprøvning af specifikke antistoffer

I samarbejde med Chemunex S.A. blev fremstillet 50 kloner anti-*Listeria monocytogenes* antistoffer ved Pasteurinstituttet i Paris. Et ELISA-assay blev sat op til at screene disse med hensyn til specificitet og styrke, overfor 7 stammer af *Listeria monocytogenes*, 4 *Listeria innoeua*, 3 *Listeria seeligeri*, 3 *Listeria ivanovii*, 2 *Listeria welshimeri*, 1 *Listeria grayi* og 1 *Listeria murayi*, 2 *Staphylococcus aureus*, 2 *Lactobacillus brevis* og 2 *Lactobacillus salivarius*. Flere af antistofferne udviste stor affinitet til *Listeria monocytogenes*, men desværre også krydsreaktion til specielt *Listeria welshimeri*. Idet det var vores mål at udvikle *Listeria monocytogenes*-specifikt antistof, blev antistofferne i første omgang forkastet. Vi modtog da to kommercielt anvendte antistoffer fra en dansk producent, samt tre fra Transia-Diffchamb SA (Lyon, Frankrig). Disse blev tilsvarende screenet, men viste sig alle at reagere meget svagt. De tre antistoffer fra Transia-Diffchamb blev videreført til senere undersøgelser og vi besluttede at stoppe videre arbejde med udvikling af et *Listeria monocytogenes*-specifikt antistof. Sluttelig screenede vi et kommercielt tilgængeligt genus specifikt polyklonalt antistof (Kirkegaard & Perry), som reagerede godt med *L. monocytogenes*. Dette blev ligeledes anvendt til videre forsøg.

6.4 Flowcytometri herunder udvikling af specifikke fluorochromer samt forstærkningsmetoder

De screenede antistoffer blev mærket med fluorescens, dels ved hjælp af en biotin-streptavidin-binding, dels ved hjælp af et fluorescerende sekundært antistof mod det primære antistof. Herefter blev *Listeria monocytogenes* forsøgt påvist ved flowcytometri. Ingen af disse mærkninger udviste dog fluorescens nok til at blive detekteret på flowcytometeret.

Idet den flowcytometriske påvisning ved hjælp af fluorescerende antistoffer ikke synes at virke, blev det besluttet at udvikle en immunomagnetisk separationsmetode. Prøven mærkes med det biotinylerede *Listeria*-specifikke antistof, som igen mærkes med streptavidinbundne små jernpartikler (<50 nm). Kulturen påsættes nu en immunomagnetisk kolonne, som befinder sig i et stærkt magnetfelt. Ved gennemløb tilbageholdes de jernmærkede bakterier, mens de umærkede vaskes ud. De tilbageholdte bakterier elueres ved at fjerne kolonnen fra magnetfeltet, og skylle den

igennem med buffer. Således opnås en specifik separation af *L. monocytogenes*. Resultaterne blev evalueret ved pladespredning. Kolonnens kapacitet blev bestemt til at ligge mellem 10^4 og 10^7 celler/ml. Inden for dette område genfandt vi op mod 70 % af de påsatte bakterier i den separerede fraktion. Kolonnen blev også afprøvet med *Lactococcus laetis*, *Lactobacillus plantarum* og *Leuconostoc cremoris*. *Lactococcus lactis* udviste tendens til krydsreaktion med antistoffet, og blev separeret i samme forhold som *Listeria monocytogenes*. *Lactobacillus plantarum* viste svag tendens til krydsreaktion og *Leuconostoc cremoris* næsten ikke.

Sideløbende blev en metode til vitalfarvning og flowcytometrisk detektion af *Listeria monocytogenes* udviklet. Fem vitalfarvningsmetoder, 5(6)-carboxyfluoresceindiacetat (CFDA, Sigma), 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethylester, (BCECF-AM, Sigma), Chemchrome B (Chemunex SA, France), Rhodamine 123 (Sigma) og *BACLight* (Molecular Probes Europe BV, Holland), blev optimeret og evalueret for evne til at farve *L. monocytogenes* før flowcytometrisk detektion. Indledende blev samtlige farvemethoder optimeret med hensyn til ultralydsbehandling (for at opnå enkeltliggende celler), inkubationstid og -temperatur, antal centrifugeringer efter farvninger samt koncentration af farvestof. Den højeste fluorescensintensitet, i forhold til en standard blev vurderet som den bedste farvning. Følgende farvningsmetoder blev udvalgt:

L. monocytogenes blev centrifugeret 8500·g i 10 min og resuspenderet i Tris HCl buffer pH 7.4, ultralydsbehandlet ved 20 kHz i 20 sekunder før farvning.

CFDA. Cellerne blev tilsat 10 µl CFDA (10 mM i Acetone) til 1 ml og inkuberet 30 min ved 37°C. Efter inkubation, blev prøven centrifugeret og resuspenderet i Tris-HCl. Prøven blev opbevaret på is i mørke indtil flowcytometrisk analyse.

BCECF-AM. Den ultralydsbehandlede cellesuspension blev tilsat 10 µl af 1 mM BCECF-AM i DMSO pr ml. Efter 30 min inkubation ved 37°C blev pH justeret til 4, mikset og vasket 2 gange i buffer før flowcytometri. Opbevaring som CFDA.

Chemchrome B. Farvning blev foretaget som for CFDA, bortset fra at inkubationstiden blev reduceret til 10 min.

Rhodamin 123. Cellerne blev fortyndet i Tris-HCl og centrifugeret. Cellerne blev resuspenderet i Tris-HCl buffer tilsat 0.013 mM Rhodamin 123, ultralydsbehandlet og inkuberet i 30 min ved 37°C. Efter inkubation blev prøven centrifugeret og resuspenderet i buffer før flowcytometrisk analyse. Opbevares som for CFDA.

BACLight. De to reagenter, a og b, blev blandet med DMSO i forholdet 1:1:2. Forbehandlede prøver af *L. monocytogenes*, blev tilsat 4 µl af denne opløsning til 1 ml, og inkuberet i 10 min. ved 37°C, før flowcytometriske undersøgelser. Opbevaring som for CFDA.

Hver enkelt farvningsmetode blev dernæst evalueret med hensyn til fluorescensintensitet, stabilitet, detektionsgrænse, farvningsevne efter opformering i selektiv bouillon, overensstemmelse med pladespredninger samt reproducérbarhed.

CFDA viste sig at farve *L. monocytogenes* gennem hele vækst forløbet, med højeste fluorescensintensitet under eksponentialfasen. Grænsen for detektion lå på 10^4 celler/ml og der var god overensstemmelse mellem de flowcytometriske tællinger og pladespredninger, med en korrelationskoefficient på 0,90. Fluorescensintensiteten af farvede *L. monocytogenes* var særdeles stabil med en standardafvigelse på 0,01. Alt i alt viste CFDA sig således at være et særdeles stabilt farvestof til *L. monocytogenes*.

Chemchrome B farvede stort set analogt til CFDA.

BCECF-AM farvede generelt dårligere end CFDA og Chemchrome, med en lav fluorescensintensitet, en detektionsgrænse på 10^6 celler/ml, dårlig reproducérbarhed samt manglende overensstemmelse mellem flowcytometriske målinger og pladespredninger.

Rhodamin 123 farvede stort set ikke *L. monocytogenes*.

BACLight farvede *L. monocytogenes* med høj fluorescensintensitet undtagen under cellernes eksponentialfase samt efter opformering i selektivt substrat, hvilket er uacceptabelt. Stabilitet, reproducérbarhed og detektionsgrænse var som for CFDA.

Således fandt vi, at CFDA samt Chemchrome B var særdeles velegnede til flowcytometrisk påvisning og tælling af *L. monocytogenes* efter 6-24 timers inkubation i selektivt opformeringsmedium.

Sluttelig blev de to metoder kombineret, således at kulturen først blev mærket med antistof og jernpartikler, separeret på immunomagnetisk kolonne, dernæst vitalfarvet og detekteret flowcytometrisk. Vi undersøgte også *L. monocytogenes* i kombination med den krydsreagerende *Lactococcus lactis*. Selvom den blev separeret i samme forhold som *L. monocytogenes*, kunne kulturerne nemt adskilles på flowcytometeret.

Det er således muligt at påvise og tælle antallet af levende *L. monocytogenes* ned til $3 \cdot 10^4$ / ml, ved hjælp af immunomagnetisk separation samt vitalfarvning og flowcytometri i løbet af 3-4 timer, efter en forudgående flydende opformering af den undersøgte prøve i 24 timer.

Applikation til mejeriprodukter

I indledende forsøg blev *Listeria monocytogenes* i kendt koncentration tilsat henholdsvis Brie og Danablue. Dette gav problemer med at *Listeria monocytogenes* blev massivt overvokset af andre grampositive bakterier, selvom opformeringen blev foretaget i det selektive opformeringsmedium. Separationskolonnen havde således ikke kapacitet til at separere *L. monocytogenes* fra de andre bakterier, hvorved det flowcytometriske billede af *L. monocytogenes* blev camoufleret. Problemet kan formentlig løses dels ved anvendelse af større kolonner i stærkere magnetfelt, og derved med bedre kapacitet, samt ved at anvende et mere specifikt antistof. Som følge af tidsmangel blev den endelige applikationsudvikling ikke udført. Dette basale problem vil også gøre sig gældende for de traditionelle analysemetoder, hvor resultatet vil være en falsk negativ prøve.

7. Konklusion

Projektet har vist, at *Listeria monocytogenes* kan bestemmes fra dag til dag ved hjælp af selektiv opformering, immunomagnetisk separation, vitalfarvning efterfulgt af flowcytometrisk påvisning og tælling, ned til $3 \cdot 10^4$ celler/ml opformeringsmedium. Metoden skal ved videreudvikling tilpasses hver enkelt mejeriprodukt. Den kombinerede brug af immunomagnetisk separation og flowcytometri er ikke tidligere beskrevet. Den tegner lovende som et generelt princip, som hurtigmetode for påvisning af patogene bakterier i levnedsmidler. Set som separat teknik er flowcytometrisk undersøgelse af bakterier, en stabil, hurtig og reproducérbar metode, så længe farvningsmetoden bliver tilpasset individuelt til de ønskede bakterier.

Publikationer

C.N. Jacobsen, J. Rasmussen and M. Jakobsen. (1997) Viability staining and flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes*. Journal of Microbiological Methods. In Press.

C.N. Jacobsen, C. Fremming and M. Jakobsen. (1997) Detection of *Listeria monocytogenes* by immunomagnetic separation and flowcytometry. Under udarbejdelse til offentliggørelse i "Journal of Microbiological Methods".

C.N. Jacobsen og M. Jakobsen. (1997) Flowcytometri og dens anvendelse indenfor mikrobiologien. Mælkeritidende.

Internationale møder

C. N. Jacobsen. (1995) Flow cytometry for the detection of specific microorganisms based on the use of specific probes. *Rapid methods in meat microbiology '94. EC\CE/AMST*. Copenhagen, Denmark. Proceedings, 37-45.

C.N. Jacobsen, Fremming, C. Jakobsen, M. (1996) Immunomagnetic separation in combination with flow cytometry for the detection of *Listeria monocytogenes*. food Micro '96, Budapest, August 27-30. Mundtlig præsentation.

Ph.d.-afhandling

Under udarbejdelse. Forventes afsluttet oktober, 1997.

Frederiksberg den 21. Marts, 1997

Charlotte Nexmann Jacobsen

Mogens Jakobsen

