

# Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Listeria monocytogenes* in Combination with New Sample Preparation and Data Analysis



Robert S. Tebbs, Priya Balachandran, Lily Wong, Paolo Vatta, Maxim G. Brevnov, Manohar R. Furtado and Olga V. Petrauskene  
Applied Biosystems/Life Technologies Corporation, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA, 94404

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is a human pathogen that is ubiquitous in the environment and can be found in soil, wastewater, animals and vegetation. *L. monocytogenes* is robust and can survive extremes of temperature, pH, and salt concentrations. Detection of *Listeria monocytogenes* is of great importance to the food industry to protect their business and, more importantly the health of their customers. We created a complete system for the detection of *Listeria monocytogenes* by Real-Time PCR that includes a lyophilized assay mix, sample preparation kits, instrumentation, and data analysis software.

## ABSTRACT

This study evaluated the inclusivity and exclusivity of a Real-Time PCR assay for *Listeria monocytogenes*, as well as the effectiveness of a complete detection system when the assay is combined with newly developed sample preparation protocols and data analysis software. Two new sample preparation protocols were used, the PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit and the PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit. RapidFinder™ Express software is a plus/inus software program for automated analysis of Real-Time PCR data. All 30 inclusivity strains tested positive, while the 40 exclusivity strains tested negative by the assay. Evaluation of the complete system showed 10 of 10 *Listeria monocytogenes* strains (concentration is ~10<sup>5</sup> cfu/ml) tested positive, while 5 of 5 non-*Listeria monocytogenes* strains (concentration ~10<sup>9</sup> cfu/ml) tested negative.

## MATERIALS AND METHODS

An inclusive panel of *Listeria monocytogenes* strains were cultured in BLEB and evaluated within 1 log of the products claimed sensitivity of 104 cfu/mL. An exclusive panel of non-*Listeria monocytogenes* strains were cultured in BHI and evaluated at the concentration achieved at growth saturation (~10<sup>9</sup> cfu/mL).

Whole milk, Brie cheese, sliced roast beef, and smoked salmon were spiked with (or without) 1-3 cfu per 25 g food and enriched in 225 ml BLEB (EMD Chemicals, Inc, NJ) at 37C for 24 hrs (Listeria selective enrichment supplements were added at t=4 hr). Enriched samples were prepared for PCR using 2 sample preparation methods: the PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit and the PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit. Real-Time PCR was run on the Applied Biosystems 7500Fast instrument using the MicroSEQ® *Listeria monocytogenes* Detection Kit, and analyzed using RapidFinder™ Express software.

## RESULTS

Table 1. Inclusivity / Exclusivity panels for *Listeria monocytogenes* assay

Inclusivity Testing (+)		Exclusivity Testing (-)	
Organism	Strain/Source	Organism	Strain/Source
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS24 (1b)	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10707
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS113 (12a)	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 13032
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS80 (12b)	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS119 (12c)	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 29420
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS111 (13a)	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 15224
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS225 (14)	<i>Citrobacter parvulus</i>	ATCC 12915
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS225 (14a)	<i>Citrobacter parvulus</i>	ATCC 43300
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS225 (14b)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 297
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS244 (14a)	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51209
<i>Listeria monocytogenes</i>	LS21	<i>Enterobacter faecalis</i>	ATCC 39214
<i>Listeria monocytogenes</i>	091 (1)	<i>Enterobacter coli</i>	ATCC 43888
<i>Listeria monocytogenes</i>	096 (11)	<i>Fluorobacterium auriferum</i>	ATCC 43165
<i>Listeria monocytogenes</i>	0101 (4)	<i>Leuconostoc bulgaricus</i>	ATCC 11642
<i>Listeria monocytogenes</i>	0136 (1)	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120
<i>Listeria monocytogenes</i>	0139 (4)	<i>Listeria grayi</i>	RF 478
<i>Listeria monocytogenes</i>	0158 (4b)	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 26401
<i>Listeria monocytogenes</i>	0159 (2b)	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33000
<i>Listeria monocytogenes</i>	0160 (13a)	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	0161 (17a)	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 4961
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7544	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 19119
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 16313	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111 ser. 1	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112 ser. 2	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113 ser. 4a	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4b	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4c	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4d	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4e	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4f	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4g	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4h	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4i	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4j	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4k	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4l	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4m	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4n	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4o	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4p	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4q	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4r	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4s	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4t	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4u	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4v	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4w	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4x	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4y	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4z	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4aa	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ab	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ac	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ad	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ae	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4af	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ag	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ah	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ai	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4aj	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ak	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4al	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4am	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4an	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ao	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ap	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4aq	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ar	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4as	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4at	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4au	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4av	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4aw	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ax	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ay	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4az	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ba	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bb	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bc	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bd	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4be	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bf	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bg	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bh	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bi	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bj	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bk	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bl	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bm	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bn	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bo	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bp	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bq	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4br	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bs	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bt	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bu	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bv	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bw	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bx	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4by	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4bz	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ca	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cb	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cc	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cd	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ce	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cf	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cg	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ch	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ci	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cj	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ck	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cl	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cm	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cn	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4co	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cp	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cq	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cr	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cs	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ct	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cu	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cv	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cw	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cx	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cy	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4cz	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4da	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4db	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dc	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dd	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4de	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4df	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dg	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dh	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4di	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dj	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dk	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dl	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dm	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dn	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4do	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dp	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dq	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dr	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ds	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dt	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4du	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dv	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dw	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dx	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dy	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4dz	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ea	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4eb	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ec	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ed	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ee	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ef	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4eg	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4eh	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ei	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ej	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser. 4ek	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 35291
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115 ser		

## Slide 1

---

t1 tebbsrs, 4/20/2009