

<平成24年度助成>

## 迅速(3時間以内)で正確な食品細菌検査法の開発

仁井見 英 樹

(富山大学附属病院検査部遺伝子・先進医療支援部門)

### はじめに

食中毒の発症は細菌によるものが殆どで、食品の細菌汚染を制御することが必要不可欠である。食品微生物検査とは、原材料や加工食品がどれだけ細菌に汚染されているかを知ることが出来る検査である。また、調理場や調理器具などの汚染に対しては、拭き取りによる細菌検査が必要である。但し、現行の食品細菌検査法では培養法を用いており、細菌培養には少なくとも24～72時間はかかるため、検査結果の報告までに通常2～8日かかるのが現状である。その結果、食品の微生物汚染に対する迅速な対応が行われず、その間にも食品汚染が広がるリスクが存在する。

従って、社会的にも、そして食品加工の現場からも、食品汚染早期に汚染細菌を迅速同定する検査方法の確立が求められている。調理器具や食品検体からスタートして2～3時間で汚染細菌を同定するシステムの構築が可能ならば、食品汚染早

期に同定結果に基づいた適切な微生物汚染対策が可能となり、食品の衛生管理と食の安全への大きな貢献となる。

そこで、我々は3時間以内に汚染細菌の同定を可能とする新たな方法(T<sub>m</sub> mapping法)を考案し、誰でも簡便に実施できる食品汚染細菌検査システムとして構築した。

### 1. 食品汚染細菌迅速同定システムの概要

食品汚染細菌迅速同定システムの概要を図1に示す。本システムでは調理器具や原材料、食品検体等から直接抽出した微生物DNAを鋳型とし、複数のuniversal primerを用いてnested PCRを行い、melting解析(HRM解析とは異なる)で得られた複数のmelting temperature(T<sub>m</sub>)値を二次元にmappingして、その“形状”をデータベースと照らし合わせることで迅速に同定する。PCRにおいては、1<sup>st</sup> PCR、2<sup>nd</sup> nested PCR共に増幅曲線がplateauになった時点でストップさせる。この方法により、食品検体から3時間以内で、

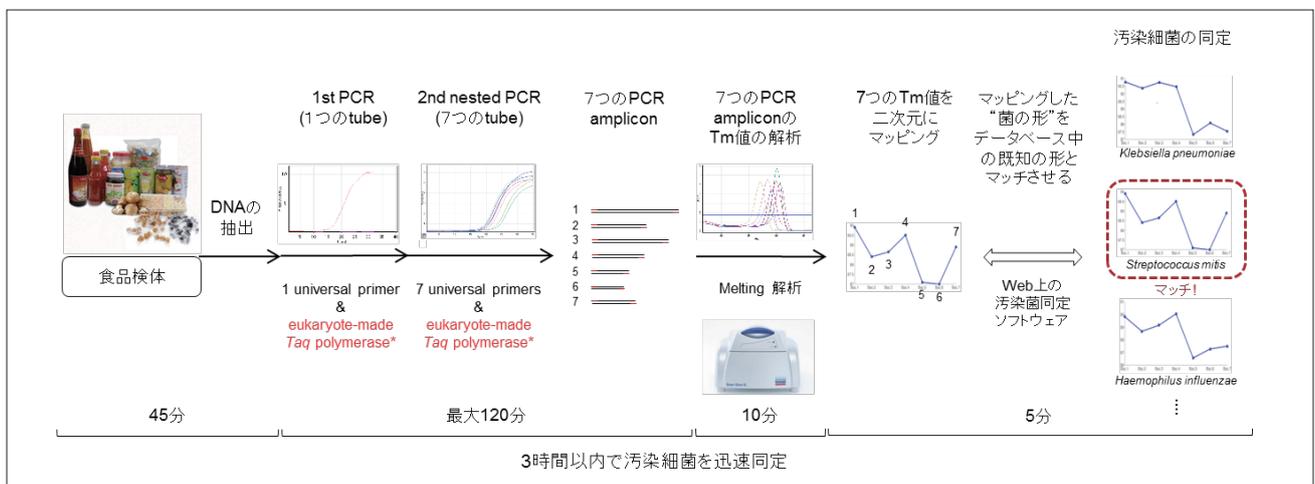


図1 食品汚染細菌迅速同定システムの概要

検体中に最も多く存在する汚染細菌が同定される。データベースとの照合・同定には、食品汚染細菌同定ソフトウェアを Web 上で使用する。また、bacterial universal primer を用いた起炎菌の PCR 検出には、(株)北海道三井化学と共同開発した eukaryote-made *Taq* polymerase<sup>1)</sup> (真核生物を宿主細胞として作成した *Taq* polymerase) を用いる。これは bacterial DNA contamination-free を初めて実現した *Taq* polymerase であり、食品検体より直接、高感度で正確なバクテリア DNA の検出を可能とする。また、感度・特異度を更に高め、夾雑物による Tm 値への影響を排除するために、本システムでは nested PCR を採用した。nested PCR への移行時に 500 倍希釈の工程が加わる為、夾雑物などの影響が無視できるレベルにまで下がるのである。

現在のシステムでは 7 つの bacterial universal primer、1 つの fungal universal primer の計 8 つの primer を用いている。これによりバクテリアの有無と種属の同定、および真菌の有無とが迅速に判定できる。これらの primer はバクテリアおよび真菌にそれぞれ特異的に反応し、ヒトの genomic DNA や mitochondrial DNA とは全く反応しない。このようなプライマーの特異性は、ヒトが加工に関わる食品検体からの直接検出において重要である。

## 2. 新たな起炎菌迅速同定方法 ; Tm mapping 法

複数の Tm 値を二次元に mapping し、その mapping した Tm 値が描く“形 (Tm mapping shape)”を菌種特異的な形として同定する新たな方法を、我々は Tm mapping 法と命名した。この方法は培養や sequencing<sup>2)</sup> を用いないため、迅速・簡便・安価な同定が可能である。本システムでは、7 つの Tm 値が 2 次元に描く Tm mapping shape が星座のように菌種毎に異なることを利用して同定する。以下、Tm mapping 法について具体的に説明する。

まず、16S ribosomal RNA 遺伝子<sup>3)</sup>の 8 か所の conserved region に、7 つの bacterial universal primer (全てのバクテリア DNA を検出する primer) セットを設計した (図 2a)。これらの primer を用いた nested PCR の結果、7 つの amplicon が得られる。amplicon は 7 つ以上でも、またそれ以下であってもシステム構築は可能である。しかし、多菌種の同定には amplicon の数が生み出す多様性が必要であり、とって多過ぎても系が煩雑かつコスト高となるため、実用的に 7 つを適当と判断した。次に、amplicon それぞれの Tm 値を測定する。得られる 7 つの amplicon は、菌種によってその塩基配列が異なる。従って、7 つの amplicon それぞれの Tm 値は菌種毎に異なる。ここでいう Tm 値とは、二本鎖 DNA の 50 % が一本鎖に解離する時の温度である。Tm 値は一般的に考えられているような、DNA 中の GC 含有率 (%) のみで決まる訳ではない。最近接塩基法<sup>4,5)</sup>により、塩基配列の横の並びもまた Tm 値に影響することが説明されている。例えば“AGCT”が“ACGT”に変化すると、GC % は変わらないが Tm 値は変化する。この原理に従えば、塩基配列の多様性が Tm 値に十分反映されることが分かる。Tm 値そのものの多様性と、その多様な 7 つの Tm 値を二次元に mapping して並べること、菌それぞれの塩基配列の相違が Tm mapping shape として反映される。

ところで、リアルタイム PCR 機器での Tm 値の測定には常に測定誤差を伴う。Tm 値をフィンガープリントとして同定に利用する以上、測定誤差は正確な同定にとって大きな問題となる。Tm 値の測定誤差には、施行間誤差とサンプル間誤差 (tube-to-tube variation) という 2 つの誤差が含まれる。施行間誤差とは、施行回毎に Tm 値全体が上下することであり、7 つの Tm 値に同様に生じるため、Tm mapping shape には影響しない。問題はサンプル間誤差であり、Tm mapping shape

そのものに影響する。従って、Tm mapping 法を用いて同定するためには、サンプル間誤差を出来るだけ小さくすることが重要となる。そして、そのサンプル間誤差とは測定機器自体の性能に依存する。一般的なリアルタイム PCR 機器のサンプル間誤差は  $\pm 0.3^\circ\text{C}$  前後であるが、それでは Tm mapping shape は崩れてしまい、正確な同定は出来ない。我々はサンプル間誤差の少ない Rotor-Gene Q (QIAGEN) や LightCycler nano (Roche) を使い、更に Eva green を用いた melting 解析 (HRM 解析ではない。Melting curve の形状の解析と本方法とは全く異なる) を行うことで、サンプル間誤差を安定的に  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  以内に収められるようにした。サンプル間誤差が  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  以内であれば、Tm mapping shape を用いて、汚染細菌を種属レベルで正確に同定することが可能となる。

最後に、得られた Tm mapping shape を“形状”として測定するために、次のような計算を行う。まず7つの Tm 値の平均値を算出し、7つの Tm

値それぞれの平均値からの距離を計算する (図 2b)。平均値より大きければプラス、小さければマイナスとする。すると、平均値からの7つの距離のそれぞれは、Tm mapping shape を反映する。従って、汚染細菌を同定するには、それら7つの距離のそれぞれの値が、データベースのそれと最も近いものを求めれば良い。計算式で表すと、「7つの距離それぞれのデータベースとの差」の総和 (= Difference Value (D) と表す) が最も 0 に近い菌が、Tm mapping shape の最も相似した菌であることを意味する (図 2c)。すなわち、それが同定結果である。尚、サンプル間誤差が  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  であれば、Difference Value は理論上 0.24 以下となり、同定結果の正確性を判定する1つの指標となる。

### 3. 汚染細菌同定ソフトウェア

我々は上記の計算式にて Difference Value を自動的に計算し、同定結果を瞬時に表示する汚染細菌同定ソフトウェアを開発した (図 3)。本ソフ

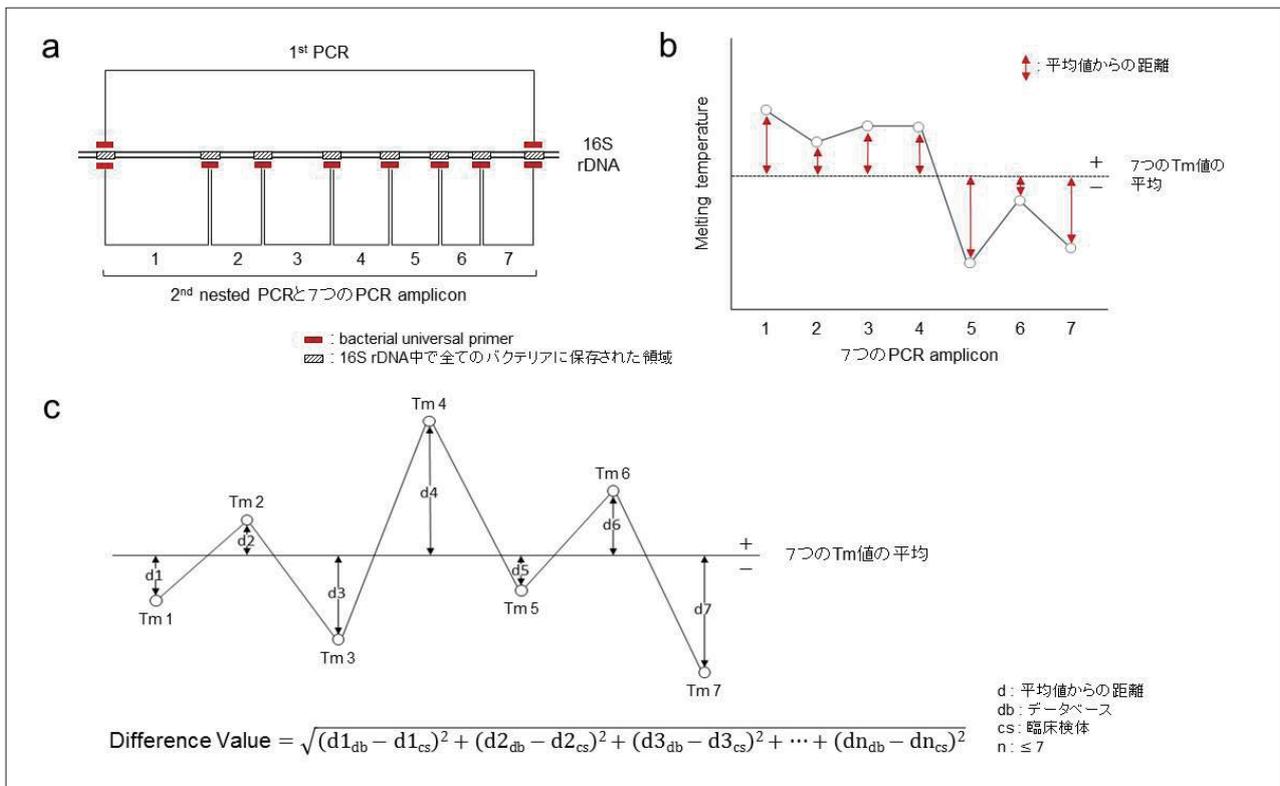


図 2 Tm mapping 法

- a. プライマーデザインを示す。 b. Tm mapping shape を“形状”として測定する方法。  
c. 未知の汚染菌とデータベースとの“Tm mapping shapeの相違”を表す Difference Value の計算式。Difference Value が 0 に近ければ近い程、Tm mapping shape が相似する。

トウェアの使用により、専門性やトレーニングを必要とせず、誰でも簡単に汚染細菌の同定が行える。ソフトウェアはクラウドで作成しており、Web 上で何処からでも使用できるシステムとなっている。データ・インプット画面(図 3a)に食品検体から得られた未知の汚染細菌の 7 つの Tm 値をインプットし、search ボタンを押す。すると、瞬時に Difference Value の 0 から近い順にデータベース上の菌が表示される。(図 3b)。この結果、Difference Value が最も 0 に近い菌が汚染細菌と同定される。また、info (information) ボタンを押すと Tm mapping shape のデータベースとの相同性を視覚的に確認することができる(図 3c)。図左が Tm 値の実測値での比較、右が

双方の平均値を adjust して重ねた図形である。これにより、視覚的にも Tm mapping shape がほぼ一致したことが分かる。逆に汚染細菌以外の菌をチェックしてみると、Tm mapping shape が重なり合わないことが視覚的にも明らかである(図 3d)。データベースは食品分野で重要な細菌種 67 菌(表 1)の ATCC 株を購入して DNA を抽出し、Tm mapping data を登録している。更に当検査部でヒト臨床検体から得られた菌株を加え、現時点で計 107 菌種の登録に至る。データベース内の Tm mapping shape の一部(18 菌分)を示す(図 3e)。菌種毎にそれぞれの Tm mapping shape が異なることが分かる。但し、菌によっては必ずしも 7 つの bacterial universal primer の

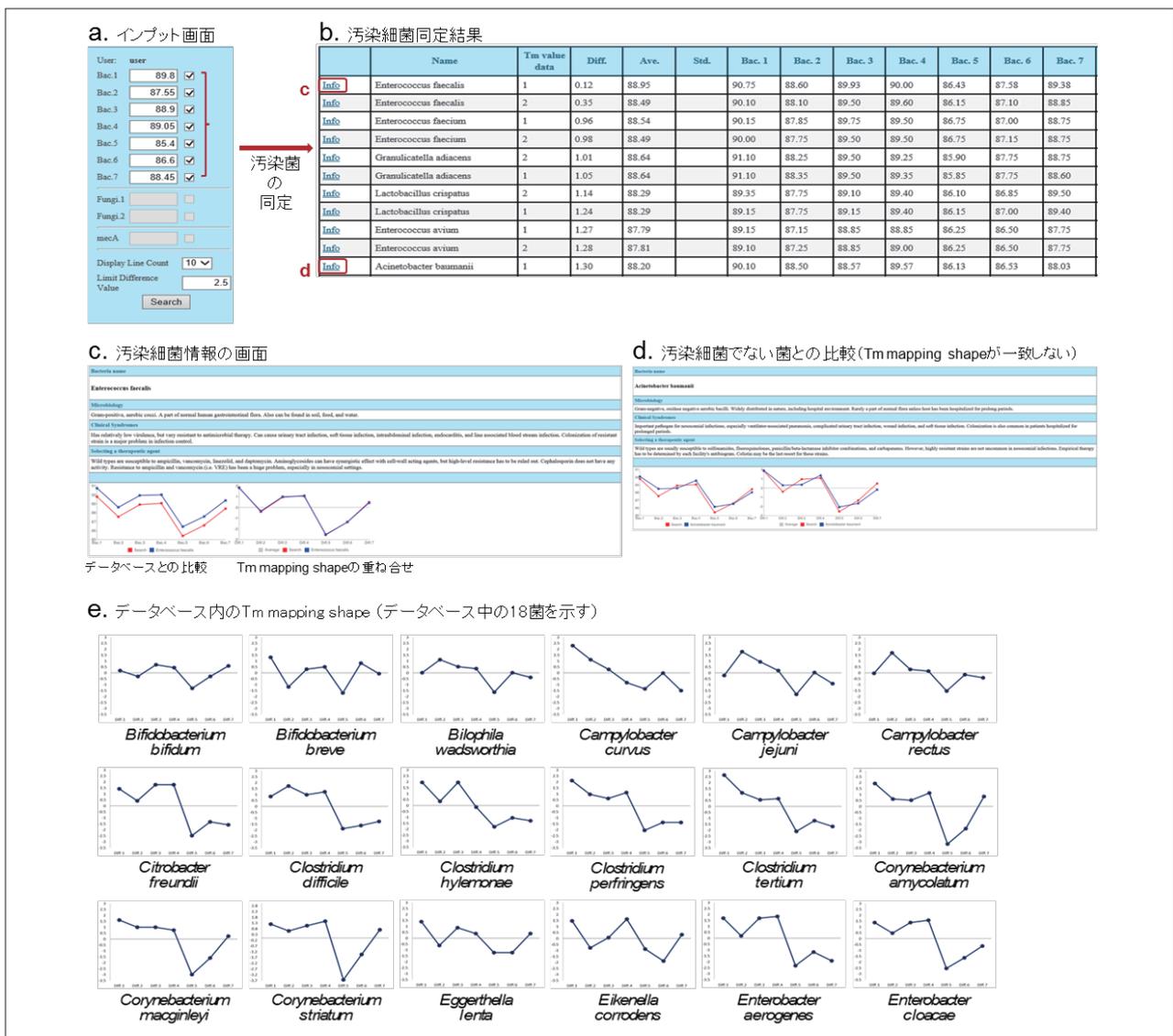


図 3 食品汚染細菌同定ソフトウェア

表1 食品分野で重要な細菌種リスト

菌名称	食中毒関連	腐敗関連 (△: 属として該当情報有り)
1 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>		△ (魚介類)
2 <i>Acinetobacter baumannii</i>		△ (肉・魚介類)
3 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		△ (肉・魚介類)
4 <i>Aeromonas hydrophilia</i>	○ (魚介類・汚染水)	
5 <i>Aeromonas sobria</i>	○ (魚介類・汚染水)	
6 <i>Bacillus cereus</i>	○ (農産物)	○
7 <i>Bacillus coagulans</i>		△
8 <i>Bacillus laterosporus</i>		△
9 <i>Bacillus licheniformis</i>	○	○
10 <i>Bacillus megaterium</i>		△
11 <i>Bacillus pumilus</i>		△
12 <i>Bacillus stearothermophilus</i>		△
13 <i>Bacillus subtilis</i>	○	○
14 <i>Bacteroides dorei</i>		△
15 <i>Bacteroides fingoldii</i>		△
16 <i>Bacteroides fragilis</i>		△
17 <i>Bacteroides nordii</i>		△
18 <i>Bacteroides salyersiae</i>		△
19 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>		△
20 <i>Bacteroides uniformis</i>		△
21 <i>Bacteroides vulgatus</i>		△
22 <i>Campylobacter coli</i>	○	
23 <i>Campylobacter jejuni</i>	○	
24 <i>Campylobacter rectus</i>	○ (肉・水)	
25 <i>Citrobacter freundii</i>	○	
26 <i>Clostridium butyricum</i>		○
27 <i>Clostridium difficile</i>	○	○
28 <i>Clostridium hylemonae</i>		○
29 <i>Clostridium perfringens</i>	○ (肉・魚介類)	
30 <i>Clostridium sporogenes</i>		○
31 <i>Clostridium tertium</i>		○
32 <i>Corynebacterium amycolatum</i>		△ (肉)
33 <i>Corynebacterium macginleyi</i>		△ (肉)
34 <i>Corynebacterium xerosis</i>		△ (肉)
35 <i>Enterobacter aerogenes</i>	○ (魚介類・乳製品)	
36 <i>Enterobacter cloacae</i>	○ (魚介類・乳製品)	
37 <i>Enterococcus faecalis</i>		○ (加工食品等、多岐)
38 <i>Enterococcus faecium</i>		○ (加工食品等、多岐)
39 <i>Escherichia albertii</i>	○	
40 <i>Escherichia coli</i>	○ (食品全般・汚染水)	
41 <i>Escherichia coli</i> O157	○ (肉)	
42 <i>Klebsiella oxytoca</i>	○	
43 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	○	
44 <i>Lactobacillus crispatus</i>		△ (加工食品等、多岐)
45 <i>Lactobacillus jensenii</i>		△ (加工食品等、多岐)
46 <i>Legionella pneumophila</i>		食品試験法 レジオネラ属
47 <i>Listeria monocytogenes</i>	○	
48 <i>Micrococcus luteus</i>		△ (食品多岐)
49 <i>Micrococcus roseus</i>		○ (食品多岐、シロップ)
50 <i>Morganella morganii</i>	○ (魚介類)	
51 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		○
52 <i>Pseudomonas fluorescens</i>		△ (加工食品等、多岐)
53 <i>Pseudomonas putida</i>		△ (加工食品等、多岐)
54 <i>Salmonella enterica</i>	○	
55 <i>Serratia marcescens</i>		○ (着色、斑点)
56 <i>Staphylococcus aureus</i>	○ (食品全般)	
57 <i>Staphylococcus capitis</i>		△ (加工食品等、多岐)
58 <i>Staphylococcus cohnii</i>		△ (過酷食品等、多岐)
59 <i>Staphylococcus epidermidis</i>		△ (過酷食品等、多岐)
60 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>		△ (過酷食品等、多岐)
61 <i>Staphylococcus schleiferi</i>		△ (過酷食品等、多岐)
62 <i>Staphylococcus warneri</i>		△ (過酷食品等、多岐)
63 <i>Staphylococcus pyogenes</i>	○	
64 <i>Vibrio fluvialis</i>	○	
65 <i>Vibrio vulnificus</i>	○	
66 <i>Yersinia enterocolitica</i>	○	
67 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	○	

全てが結合する訳ではなく、Tm 値が7つ未満となる場合もある。その場合は primer の結合しないパターン同士で汚染細菌を検索するシステムとなっているため、primer が結合しないこともまた菌の特徴として利用される。

#### 4. 本システムの判定基準と正確性の評価

Tm mapping 法による汚染細菌同定を正確に行うために、我々は先ず Difference Value を基にした判定基準を作成した(表2)。サンプル間の測定誤差を考慮すると、Difference Value 0.3 未満の同定結果が2菌種得られた場合、どちらも共に汚染細菌の可能性がある。この場合、同定結果は「共に汚染細菌の可能性あり」と判定するに留まる。但し、0.3未満に2菌種入る場合の殆どは *Staphylococcus* 属であり、2菌の属が異なることは殆どない。正確性のテストにおいて、Difference Value 0.3未満に2菌種が同定され、そのうち1菌種が sequencing の同定結果と

一致した場合、我々は“broad match”という表現で定義した。また、Difference Value が最小でも0.5以上の場合、Tm mapping shape はデータベースと明らかに異なる(データベースに存在しない)ため、汚染細菌を同定しないことにした。この場合、「食品検体中にバクテリアが存在する」と判定するのみである。

我々は本システムにおける汚染細菌同定の正確性を評価するために、以下の2つのテストを行った(表3)。先ずデータベース登録に用いた107菌種のバクテリアDNAを用いて、ブラインド・テストでの同定を試みた。その結果、matchが106菌、broad matchが1菌であった。また、この時の Difference Value は  $0.15 \pm 0.05$  (SD = 0.021) であり、理論値 ( $D \leq 0.24$ ) の範囲内に収まった。このことは、Tm 値のサンプル間誤差が  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  の範囲内であったことを意味する。

次に、150の培養コロニー(51菌種)からそれ

表2 Difference Value を基にした判定基準

Difference Value (D)	結果の信頼性:	同定の判定基準
$0.0 \leq D < 0.3$	高い	この範囲に1菌のみ入る場合、汚染菌と判定する。 2菌が入る場合、共に汚染菌の可能性ありと判定。
$0.3 \leq D < 0.4$	中等度 低い	この範囲では、Difference Valueの最も低い菌を汚染菌と判定する。
$0.4 \leq D < 0.5$		
$0.5 \leq D$	信頼できず	この範囲では汚染菌を同定しない。

表3 Tm mapping 法を用いた汚染細菌迅速同定システムの正確性の評価

Difference Value (D)	サンプル数	vs. Sequencing method			解析不能
		No. of matches	No. of broad matches	No. of mismatches	
バクテリアDNA(107菌種)を用いたブラインド・テスト					
$0.0 \leq D < 0.3$	107	106	1	0	0
$0.3 \leq D < 0.4$	0	0	0	0	0
$0.4 \leq D < 0.5$	0	0	0	0	0
$0.5 \leq D$	0	0	0	0	0
バクテリア・コロニー(140コロニー:51菌種)を用いた迅速同定					
$0.0 \leq D < 0.3$	110	98	10	2	0
$0.3 \leq D < 0.4$	17	15	1	1	0
$0.4 \leq D < 0.5$	3	2	0	1	0
$0.5 \leq D$	10	5	0	5	0

ぞれ DNA を抽出し、Tm mapping 法を用いて菌の同定を試みた。そして、sequencing との一致率、すなわち正答率を算出した。その結果、Difference Value 0.5 以上の 10 コロニーを除いた 140 コロニー中、match が 115 コロニー、broad match が 11 コロニー、mismatch が 4 コロニーであり、match と broad match を合わせた正答率は 97% であった。尚、broad match の全ては *Staphylococcus* 属であり、mismatch は全て複数菌の存在が認められた。

最後に、食中毒の代表的な食品例としてシュークリーム（クリーム）の微生物汚染テストを行った。店頭販売されている賞味期限内の新しいシュークリームをコントロールとし、5日間常温放置したシュークリームを微生物汚染疑いの検体として、それぞれクリーム部分をテストした。汚染菌の濃度単位は一般的に CFU/mL が用いられる。従って、DNA 濃度で計算される PCR 定量法との単位を合わせるために、McFarland 比濁法を介し、検量線を描いて計算を行った。結果を図 4 に示す。その結果、

常温放置 5 日後のクリームから真菌は検出されなかった（極微量の真菌 DNA が検出されているが、全く増殖が認められない為、シューの部分のイースト DNA の混入と考えられる）。しかし、新しいクリームから細菌は全く検出されなかった（= 検出感度以下）にもかかわらず、常温放置 5 日後のクリームからは、クリーム 1g 中に  $1.5 \times 10^7$  CFU (*E. coli* 換算値) という大量の細菌が検出された。この細菌を Tm mapping 法で迅速同定した結果、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)、Difference Value = 0.21 であった。クリーム部分には細菌にとって豊富な栄養が存在するため、菌にとって最適な温度環境では 30 分程度で 2 倍、すなわち指数関数的に増えていく。特に夏場の暑い環境では 5 日の放置は非常に危険であることが示された。

#### 5. Tm mapping 法の利点および今後の課題

Tm mapping 法ではデータベースを組み込んだ汚染細菌同定ソフトウェアを用いるため、データベースの修正・拡張などの更新が容易である。従っ

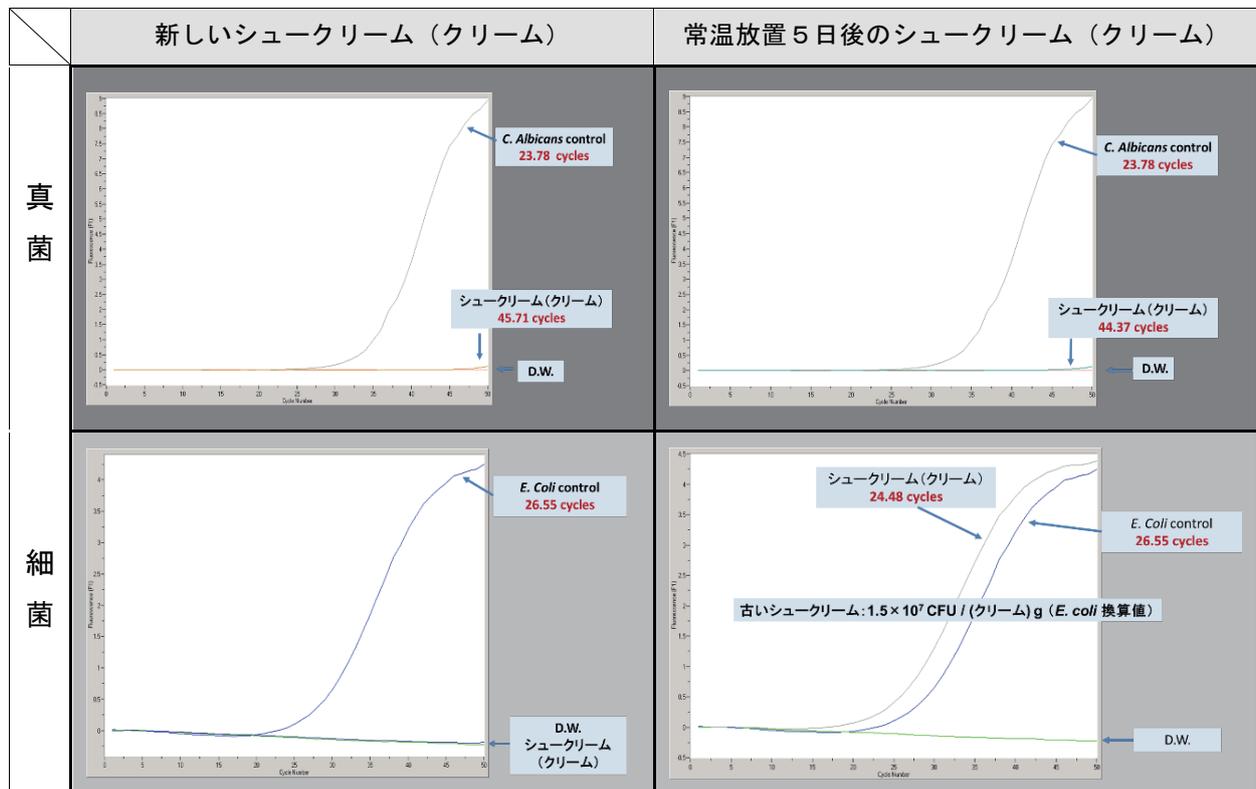


図 4 シュークリームの微生物汚染テスト

て、例えば mutant strain が新たに見つかった場合、直ぐにデータベースに加えさえすれば、迅速に同定に反映される。これは、固相の抗体やオリゴプライマーを用いた方法<sup>6)</sup>と比較してより優れた点である。また、プライマー数を7つに固定して広範な菌種を同定出来ることは、同定菌種がプライマー数に依存する、特異的プライマーを用いる方法<sup>7,8)</sup>と比較してより優れた点である。更に eukaryote-made *Taq* polymerase を用いた PCR により、食品検体から直接、高感度にバクテリア DNA を検出でき、sequencing も必要としないため、食品検体採取後3時間以内での迅速同定が可能となる。これは、一般的にバクテリア・コロニーからスタートする質量分析法<sup>9,10)</sup>と比較して、より優れた点である。

Tm mapping 法では、食品検体中の最も多い菌を同定する。もし、食品検体中に複数の菌が同程度存在すれば、Tm 値が重なってしまい、同定することが出来ない。仮に複数の菌が存在したとしても、1菌のみが数的に優位であれば同定は可能である。複数の菌が同程度存在するような検体では迅速同定とはいかず、細菌コロニーからスタートした同定となる。

Tm mapping 法では培養法を用いないため、迅速であることに加え、コンタミ菌を見分けられるという利点がある。培養では菌毎に増殖の速さが異なり、また、長時間の培養では菌の多少に関わらず、増殖後の菌量が plateau に達することにより、時として汚染細菌とコンタミ菌との判別がつかなくなる。しかし、本法では最も多い菌のみを同定するため、少量のコンタミ菌を汚染細菌として迅速同定することは無い。

真菌については現在、有無のみの確認を行っている。しかし、真菌もバクテリアと同様、Tm mapping 法による同定が可能であるため、真菌データベースの構築も行う計画である。

食品検体の場合、それぞれの食品で DNA 抽出

のための前処理が異なる。一般的に物理的に破碎した後、蛋白や脂肪、繊維成分の除去を必要とする。食品検体が一定であれば、それぞれ前処理プロトコルを最適化しておく必要がある。

今後、Tm mapping 法を食品汚染検査でルーチン化するには、登録菌種を適宜、増やしていく必要がある。また、PCR buffer の塩濃度が大きく異なると Tm mapping shape に影響する。従って、同じデータベースを同定に用いるならば、7つの bacterial universal primer、eukaryote-made *Taq* polymerase、そして PCR buffer の組成を固定した上でキット化することが望ましい。

## おわりに

以上、食品汚染細菌迅速検査法として新たに開発した Tm mapping 法について、方法論と正確性、今後の課題などについて執筆した。正確である限り、食品微生物検査は早ければ早いほどその後の対策がより効果的になる。今後、Tm mapping 法を迅速な食品汚染検査として実用化することで、食の安全に多少なりとも貢献したいと考えている。

## 謝 辞

本研究を遂行し、実用化するにあたり、富山大学附属病院・検査部の上野智浩主任臨床検査技師、石川県立大学・生物資源工学研究所の森正之先生、三井化学株式会社の伊藤潔様をはじめとする研究所の皆様方へ、多大なご理解とご協力を感謝いたします。そして、(公財)浦上食品・食文化振興財団より本研究の食文化に対する貢献へのご理解を頂き、多大な助成を頂きましたことを心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Niimi, H., *et al.*: A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination, *J Clin Microbiol*, **49**: 3316-3320, 2011.

- 2) Wellinghausen, N., *et al.*: Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis, *J Clin Microbiol*, **47**: 2759-2765, 2009.
- 3) Wilson, K.H., Blichington, R.B. & Greene, R.C.: Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, **28**: 1942-1946, 1990.
- 4) Lerman, L.S., Fischer, S.G., Hurley, I., Silverstein, K. & Lumelsky, N.: Sequence-determined DNA separations, *Annu Rev Biophys Bioeng*, **13**: 399-423, 1984.
- 5) Dumousseau, M., Rodriguez, N., Juty, N. & Novère, N.L.: MELTING, a flexible platform to predict the melting temperatures of nucleic acids, *BMC Bioinformatics*, **13**: 101, 2012.
- 6) Cleven, B.E., *et al.*: Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray, *J Clin Microbiol*, **44**: 2389-2397, 2006.
- 7) Lehmann, L.E., *et al.*: A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples, *Med Microbiol Immunol*, **197**: 313-324, 2008.
- 8) Klaschik, S., *et al.*: Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria, *J Clin Microbiol*, **40**: 4304-4307, 2002.
- 9) Sampath, R., Blyn, L.B. & Ecker, D.J.: Rapid molecular assays for microbial contaminant monitoring in the bioprocess industry, *PDA J Pharm Sci Technol*, **64**: 458-464, 2010.
- 10) La Scola, B. & Raoult, D.: Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry, *PLoS One*, **4**: e8041, 2009.

## Rapid identification system of food contamination by using a novel melting temperature (T<sub>m</sub>) mapping method

**Hideki Niimi**

*Department of Molecular Genetic Pathology, Clinical Laboratory Center,  
Toyama University Hospital*

### ABSTRACT

The earliest possible identification of microorganisms is critical for microorganism test method for food. Here we report the development of a novel method for rapid identification of the dominant bacteria in a food sample within 3 hours of sample collection.

The T<sub>m</sub> mapping method consists of three major steps: First, bacterial DNA is extracted directly from a food sample. Then, nested PCR is performed using the seven bacterial universal primer sets. To achieve accuracy in this PCR step, we have developed a eukaryote-made Taq polymerase which is free from bacterial DNA contamination. Using this polymerase, sensitive and reliable detection of bacteria without any false-positive results becomes feasible, thereby making PCR directly from a food sample to identify the dominant bacteria possible. Second, seven melting temperature (T<sub>m</sub>) values are obtained by high resolution melting (HRM) analysis of the amplicons. These seven T<sub>m</sub> values, when mapped on two dimensions, create a unique shape of a specific bacteria, like a constellation. This unique shape reflects the different DNA base sequences present among bacterial species. Finally, by comparing this T<sub>m</sub> mapping shape to the shapes in the database, the dominant bacteria in a food sample can be rapidly identified.

The T<sub>m</sub> mapping method would be widely useful for the test of food contamination that require prompt measure, and would contribute to the food safety.