Journal of Food and Drug Analysis

Volume 4 | Issue 1 Article 2

Use of polymerase chain reaction (PCR) method for the rapid identification of Salmonella typhi

Follow this and additional works at: https://www.jfda-online.com/journal

Recommended Citation
Liu, P.-R.; Wang, T.-K.; Lin, C.-K.; Pang, T.-M.; and Tsen, H.-Y. (1996) "Use of polymerase chain reaction (PCR) method for the rapid identification of Salmonella typhi," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 4 : Iss. 1 , Article 2.
Available at: https://doi.org/10.38212/2224-6614.2997

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.

Journal of Food and Drug Analysis
1996. 4(1) : 65-73

藥物食品分析
第四卷　第一册

應用聚合酶鏈反應 (PCR) 方法快速鑑定傷寒桿菌

劉珮如、王添貴*、林建谷**、潘子明*、曾浩洋

國立中興大學食品科學系
*衛生署預防醫學研究所
**私立弘光醫事護理專科學校食品營養科

摘　要

爲了解以聚合酶鏈反應之快速方法，代替傳統生化型及血清型鑑定分離自臨床檢體之傷寒桿菌之可行性，本研究以 *S. typhi* 之鞭毛抗原基因 (H1-d) 所發展出之 PCR 引子 ST1 及 ST2 對衛生署預防醫學研究所提供，由臨床檢體分離之 50 株 *S. typhi* 菌株進行 PCR 檢測，其結果皆爲正反應，而其他血清型沙門氏菌及非沙門氏菌之腸內菌科細菌，則皆無 PCR 產物之產生。若直接進行一次聚合酶鏈反應，則其檢測之靈敏度達 10^4 CFU，然若進行二次聚合酶鏈反應，則其檢測靈敏度可提高至 10^0 CFU。上述實驗結果顯示 PCR 技術爲一快速、可靠之方法，並可用於臨床分離之傷寒桿菌之快速鑑定。

關鍵詞：聚合酶鏈反應，傷寒桿菌。

前　言

沙門氏菌 (*Salmonella*) 為經由食物，飲水傳染而引起人畜中毒之重要病原菌。至目前所知，已有超過 2000 種以上之血清型 (serotype) 之沙門氏菌被鑑定出[1]；其中傷寒桿菌 (*S. typhi*) 為引起人類傷寒熱 (typhoid fever) 之主要菌株，由於常造成大規模的感染流行，且具高危險性，其檢疫及防治均為世界各國所重視。

傳統上最常用於檢驗傷寒熱病，係採血清學方法 Widal test[2]，針對 *S. typhi* 具有之 Vi 抗原進行檢測，但結果並非很可靠[3,4]。根據統計，傷寒桿菌之篩檢率，若將患者之血液，玫瑰斑 (rose spots)，糞便及骨髓抽出液之檢體，加以培養、確認，則可達 90 % 以上[5]之檢出率。然而，由於檢體中 *S. typhi* 菌株之分離鑑定過程相當繁複 (常需 7 天以上)，因此發展傷寒桿菌之快速檢測方法，在醫療及疫情防治工作上均有其必要性。

有關以基因檢測方法快速檢驗傷寒桿菌之發展，Rubin 等[6]曾篩選出一段對其 Vi 抗原基因具有特異性之 DNA 探針，以檢測傷寒熱患者檢體中傷寒桿菌之存在[7]；然而，此法仍需經樣品之濃縮及菌落之培養過程以提高 DNA 探針之檢測靈敏度[8]，其他相關 DNA 探針之報告則未見。近年來，由於聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction，PCR) 技術之發展，已相繼用在許多食品及臨床檢體中病原菌之檢測，例如：病原性大腸桿菌[9]，李斯特菌[10]，沙門氏菌[11]及創傷弧菌[12]等之檢測；其所具之高靈敏度及準確性，提供檢驗人員不需經任何培養過程，即可快速檢出樣品中少量病原菌之可行性，因而大大提高檢驗時效，並且日益受到重視。

Correspondence to: Hau-Yang Tsen

Accepted for Publication: Dec. 1, 1995

目前有關 *S. typhi* 之 PCR 檢測報告並不多，其中 Song 等[13]曾利用 *S. typhi* 之鞭毛蛋白 (flagellin) 基因設計出 PCR 引子，以檢測血液樣品中之傷寒桿菌。但報告中對於PCR引子特異性之確認僅使用 2 株 *S. typhi* 及數株其他血清型沙門氏菌，顯有取樣不足之虞，而妨礙其應用性。本研究之目的，擬以 Song 等人所發展之傷寒桿菌特異性 PCR 引子，針對由本省傷寒確定病例檢體中分離之 50 株 *S. typhi* 菌株，進行特異性聚合酶鏈反應；除進一步測試彼等引子之特異性以確立其應用性外，亦期建立國內以聚合酶鏈反應檢測臨床檢體中傷寒桿菌之快速方法。

材料與方法

一、實驗材料

㈠ 菌株

本研究所測試之 50 株傷寒桿菌係自 1992 年元月至 1994 年九月由預防醫學研究所，自疑似傷寒熱之患者檢體中分離而得，其分離地點及來源如表一所示。其他菌株，包括非傷寒桿菌之其他沙門氏菌以及非沙門氏菌 (*non-Salmonella*)，包括與沙門氏菌近緣之腸內菌科 (*Enterobacteriaceae*)菌株，例如 *Escherichia coli, Citrobacter spp., Shigella spp.* 等，其來源包括：美國標準菌種中心 (American Type Culture Collection; ATCC, Rockville, Maryland, USA.)、國家傳染病暨疾病預防及疾病控制中心 (National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention ;CDC , Atlanta, Georgia, USA.)、美國農業部 (United States Department of Agriculture ; USDA, Washington, D.C., USA.) 以及國內食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 (Culture Collection and Research Center; CCRC，新竹，台灣)，屏東技術學院獸醫系及衛生署藥物食品檢驗局。

㈡ 寡核苷酸探針

本研究所用來檢測 *S. typhi* 之 PCR 用引子：ST1 / ST2 是由 Song 等學者[13] 所發表，其序列如下：

ST1 ：5'-ACTGCTAAAACCACTACT-3'

ST2 ：5'-TTAACGCAGTAAAGAGAG-3'

以上之寡核苷酸引子(Oligonucleotide primers) 由快興科技有限公司 (台北 ，台灣) 合成。

二、實驗方法

㈠ 菌種之保存與培養

取自衛生署預防醫學研究所，經單離確認之菌株分別以 50 % 甘油保存於 -70℃ 冷凍庫中，另以 cooked meat medium (Difco 0267) 於 4-8℃ 保存作為一般例行培養接種之用。菌種培養方法如下：由 cooked meat medium 中接一白金耳 *S. typhi* 或其他菌株至 5 ml Luria-Bertani broth (LB: yeast extract 5 g, tryptone 10 g, NaCl 10 g 及 dist H_2O 1000 ml)，於 37℃ 隔夜培養 (12 小時)，部分菌液作系列稀釋，以計算菌數或作為染色體 DNA 之製備。

㈡ 傷寒桿菌之血清學鑑定

此部分之工作，係由衛生署預防醫學研究所細菌組所鑑定，方法係依 Zen-Yoji 等人所著腸管系病原菌之檢查法[14]，自檢體中分離疑似沙門氏菌之菌落並進行相關生化反應，以確認為沙門氏菌。經確認者，先以普通常用之玻片凝集反應法檢查 O 抗原及 Vi 抗原，次以 H 抗血清 (ROACH，U.S.A.) 作試管凝集試驗以分析 H 抗原，再以相誘導 (Phase induction) 血清 (日本生研)，使 H 抗原產生 phase I，II 之轉換。綜合上述所得 O，Vi，H 抗原之結果，依據 Kauffman-White scheme [15] 沙門氏菌抗原表，決定其血清型。

㈢ PCR引子之特異性探討

PCR 目標 DNA 之取得係根據 Wernars 等[16] 所發展出之煮沸法，略加修飾行之。取 10 μl 系列稀釋菌液至 0.5 ml 微量離心管中，每管加入10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP各 1μl , 10 ×PCR reaction buffer 4 μl 。及 各 50 pmol 的 ST1 及 ST2 引子，以無菌水加至終體積為 40 μl。最後加入一滴 Mineral oil 將反應液表面蓋住；而後將微量離心管放入 溫控循環器 (GeneAmp PCR System 9600，Perkin Elmer)，以 95℃ 加熱 30 分鐘，使細胞破裂， DNA 露出，繼之再加入10 μl 1×PCR反應液[10mM Tris-HCl (pH 8.0 at 25℃)，1.5 mM $MgCl_2$，50 mM KCl，0.1% Triton x-100]，內含 0.4 Unit Dynazyme (Finnzymes Oy，Finland)，並使得反應液之終體積為 50 μl，進行聚合酶鏈反應。

反應溫控條件如下：先昇溫至 94℃，維持 20 秒，使 DNA 分開成雙股 (denaturation)，再降溫至 58.5℃，維持 20 秒，進行黏合作

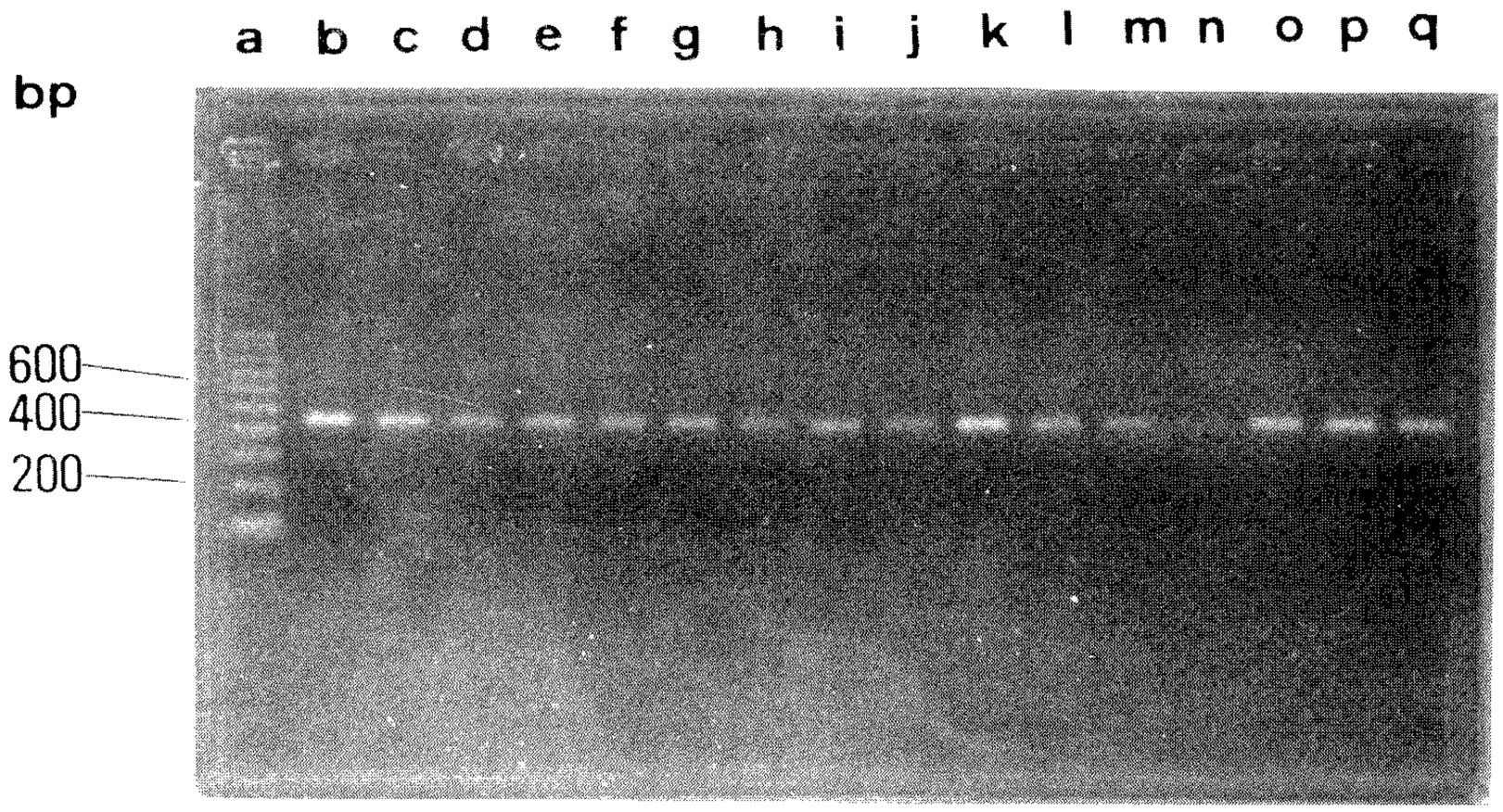

Figure 1. Detection specificity for clinical isolates of *S. typhi* using PCR primer pairs ST1/ST2. Lane a: 100 bp ladder. Lanes b-q : PCR products with target DNAs obtained by heat lysis of 10^6 bacterial cells from *S. typhi* ATCC 8427 (b); IST03 (c); IST05 (d); IST08 (e); IST12 (f); IST14 (g); IST20 (h); IST24 (i); IST 28 (j); IST31 (k); IST33 (l); IST36 (m); IST41 (n); IST45 (o); IST48 (p); and IST50 (q). The PCR conditions were 94℃/20 sec, 58.5℃/20 sec, 72℃/30 sec. Total cycles for PCR were 35.

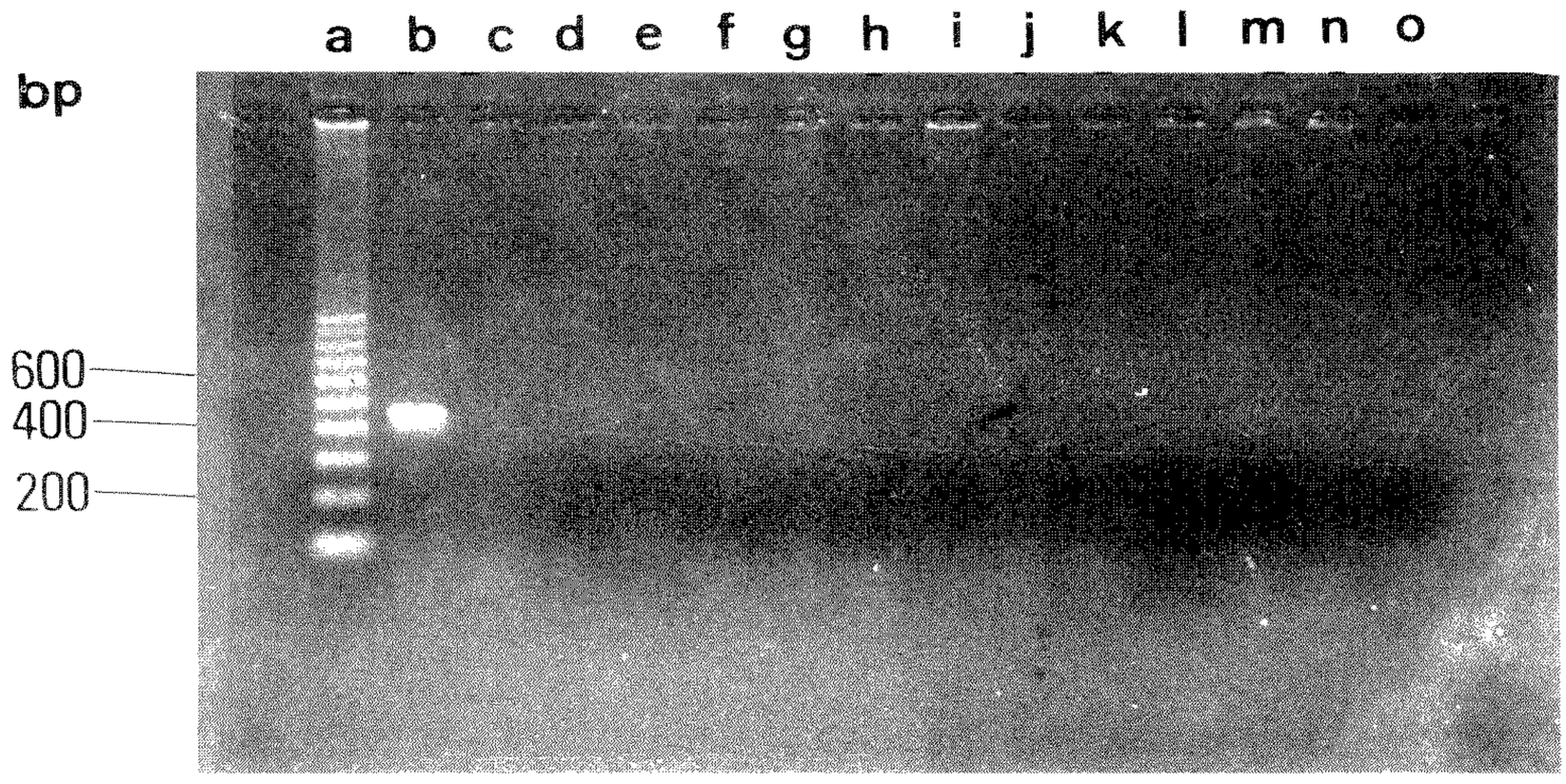

Figure 2. Specificity for detection of nontyphoidal *Salmonella* and Enterobacteriaceae bacteria other than *Salmonella* using PCR primers ST1/ST2。Lane a: 100 bp ladder. Lanes b-o: PCR products with target DNAs obtained by heat lysis of 10^6 cells from *S. typhi* ATCC 8427 (b), *S. typhimurium* ATCC 14028 (c), *S. enteritidis* ATCC 1376 (d), *S. agona* TUF 9143A (e), *S. infantis* TUF 9142C (f), *Escherichia coli* ATCC 25922(g), *Citrobacter freundii* CCRC 12291(h), *Klebsiella pneumoniae* CCRC 10692(i), *Serratia marcescens* CCRC 13880 (j), *Shigella flexneri* CCRC 10772 (k), *Yersinia enterocolitica* CCRC 10807(l), *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (m), *Proteus vulgaris* ATCC 8428 (n), and *Erwinia carotovora* CCRC 11298 (o). The PCR conditions used were 94 ℃/20 sec, 58.5℃/20 sec, 72℃/30 sec. Total cycles for PCR were 35.

用 (annealing)，接著進行延長作用 (extension)，於 72℃ 進行 30 秒。如此共 35 個循環。取 10μl 反應物，以 2% agarose 於 1×TAE buffer 中電泳 ，經 Ethidium bromide 染色後，於 UV box 觀察 ，拍照及記錄。

㈣ PCR 之靈敏度試驗

Table 1. Sources and dates of isolation for Salmonella typhi strains used in this study

Strain designation	Region of isolation	Date of isolation (month/year)	Source	Strain designation	Region of isolation	Date of isolation (month/year)	Source
IST01	東部	2/1993	Pus[b]	IST26	北市	9/1992	Blood
IST02	東部	2/1993	Pus	IST27	北市	9/1992	Blood
IST03	桃園	9/1994	NA[a]	IST28	桃園	10/1992	Blood
IST04	桃園	9/1994	NA	IST29	北市	10/1992	Blood
IST05	北市	9/1994	Bile	IST30	基隆	11/1992	NA
IST06	淡水	9/1994	NA	IST31	宜蘭	3/1992	Blood
IST07	北市	8/1994	NA	IST32	桃園	8/1992	Stool
IST08	基隆	8/1994	NA	IST33	北市	3/1992	Blood
IST09	桃園	4/1994	Blood	IST34	北市	5/1992	Blood
IST10	北市	5/1994	NA	IST35	北市	3/1992	Blood
IST11	台中	11/1993	NA	IST36	北市	4/1992	Blood
IST12	台南	11/1993	NA	IST38	北市	6/1992	Blood
IST13	北市	11/1993	NA	IST39	桃園	6/1992	Stool
IST14	北市	12/1993	NA	IST41	桃園	9/1992	Blood
IST15	新竹	4/1993	Blood	IST42	桃園	8/1992	Stool
IST16	北市	5/1993	NA	IST43	北市	9/1992	Blood
IST17	基隆	2/1993	NA	IST44	桃園	10/1992	Blood
IST18	桃園	3/1993	NA	IST45	桃園	10/1992	Blood
IST19	北市	11/1993	NA	IST46	桃園	7/1992	Blood
IST20	桃園	11/1993	NA	IST47	桃園	7/1992	Blood
IST21	北市	8/1992	Blood	IST48	北市	7/1992	Blood
IST22	北市	8/1992	Blood	IST49	桃園	5/1992	Blood
IST23	北市	8/1992	Blood	IST50	北市	7/1992	NA
IST24	桃園	9/1992	Blood	IST51	北市	5/1992	Blood
IST25	桃園	9/1992	Stool	IST52	北縣	1/1992	Stool

[a] NA : Not available

[b] 膿

取 10μl 分別含 10^2 至 10^8 CFU/ml 之傷寒桿菌菌液，加入 30μl 1 x PCR 緩衝液內含 dATP, dTTP, dCTP, dGTP 及引子 ST1，ST2 (濃度如前述)，於 95℃ 先行加熱 30 分鐘後，再加入 10μl DNA 聚合酶(0.4 U 溶於 1 x PCR buffer)，並依上述溫控條件於循環器中進行 PCR 反應，本研究另探討二次 PCR (double PCR)，以提高檢測靈敏度。其作法如下：取 10 μl 第一次 PCR 反應液為擴增模板，依前述配方進行另一PCR 反應，每一PCR循環數為 30，PCR 循環條件則如上所述。

結果與討論

一、本實驗用*Salmonella typhi* 菌株

沙門氏菌中毒 (salmonellosis) 是世界性普遍之疾病，約有 2000 種以上之血清型 (serotypes) 存在 [1] 。然而，常見引起疾病之血清型卻只有 *S. typhi* , *S. typhimurium, S. paraty-*

Table 2. PCR specificity to *S. typhi*, other *Salmonella* isolates and non-*Salmonella* isolates

Species	No. of strain tested	No. of positive result
S. typhi from typhoid patients	50	50
S. typhi (ATCC 8427)[a]	1	1
S. typhimurium (ATCC 14028)	1	0
S. enteritidis (ATCC 1376)	1	0
S. derby (TUF 7957A)	1	0
S. agona (TUF 9143A)	1	0
S. panama (USDA)	1	0
S. infantis (TUF 9142C)	1	0
S. muenchen (PT 625)	1	0
S. weltevreden (PT 658)	1	0
S. kentuckey (USDA 1073A)	1	0
Escherichia coli (ATCC 25922)	1	0
Enterotoxigenic *E. coli* (ATCC 43896)	1	0
Citrobacter freundii (CCRC 12291)	1	0
Klebsiella pneumonie (CCRC 10692)	1	0
Serratia marcescens (CCRC 13880)	1	0
Shigella flexneri (CCRC 10772)	1	0
Shigella sonnei (CCRC 10773)	1	0
Yersinia enterocolitica (CCRC 10807)	1	0
Enterobacter aerogenes(ATCC 13048)	1	0
Proteus vulgaris (ATCC 8427)	1	0
Erwinia carotovora (CCRC 11298)	1	0

[a] Bacterial isolates were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA; United States Department of Agriculture (USDA), Washington DC, USA; Culture Collection and Research Center (CCRC), Hsinchu, Taiwan; National Ping-Tung College of Technology (PT), Pingtung, Taiwan and Tokyo University of Fisheries (TUF), Tokyo, Japan.

phi, S. enteritidis, S. dublin 等[17]，其中 *S. typhi* 在臨床治療上最受重視[18]，而 *S. typhimurium* 及 *S. enteritidis* 則是最常見之致病性沙門氏菌，每年全世界約有 3/4 之沙門氏菌中毒是由此兩種血清型所引起的[19]。

根據周[20]等調查收集自台灣地區醫院之臨床檢體之沙門氏菌之分佈情形顯示：*S. typhi* 及 *S. typhimurium*，仍是最常分離出的兩種血清型。至於歐、美地區常被分離之 *S. enteritidis*[21]，在台灣地區並不常見。本研究所使用，由衛生署預防醫學研究所收集之 50 株 *S. typhi* 菌株，列如表一所示。大部分的菌株是由北部及東部地區收集，例：台北市、台北縣、桃園、宜蘭等地區分離而來的，而分離之來源多為患者血液、糞便等檢體。50 株 *S. typhi* 分離時間則為 1992 年至 1994 年間。

二、以聚合酶鏈反應確認 *S. typhi* 菌株

為了解以 PCR 之快速方法，代替傳統生化型及血清型檢測方法，確認分離自臨床檢體之 *S. typhi* 菌株，並應用於台灣地區傷寒桿菌，尤其患者檢體中檢出傷寒桿菌的可行性；因此，對於上述經衛生署預防醫學研究所人員以血清型鑑別確認之 *S. typhi* 菌株，我們亦以 PCR 方法來確認所收集菌株之可靠性。使用之 PCR 引子是由 *S. typhi* 之鞭毛基因（H1-d）序

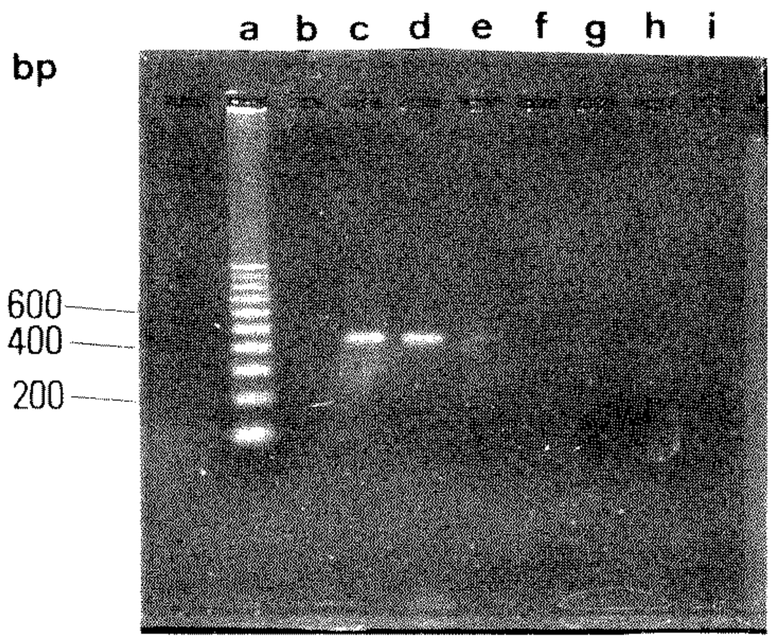

Figure 3. Sensitivity for PCR assay of *S. typhi* strain IST 32 using primers ST1/ST2. Lane a : 100 bp ladder ; lane b : negative control without target DNA; lanes c-i : PCR products with DNA obtained by boiling method from 10^6 (c), 10^5 (d) , 10^4 (e) , 10^3 (f) , 10^2 (g) , 10^1 (h) , 10^0 (i) CFU of IST32 , respectively. The PCR conditions were 94℃/20 sec, 58.5℃/20 sec, 72℃/30 sec. Total cycles for PCR were 35.

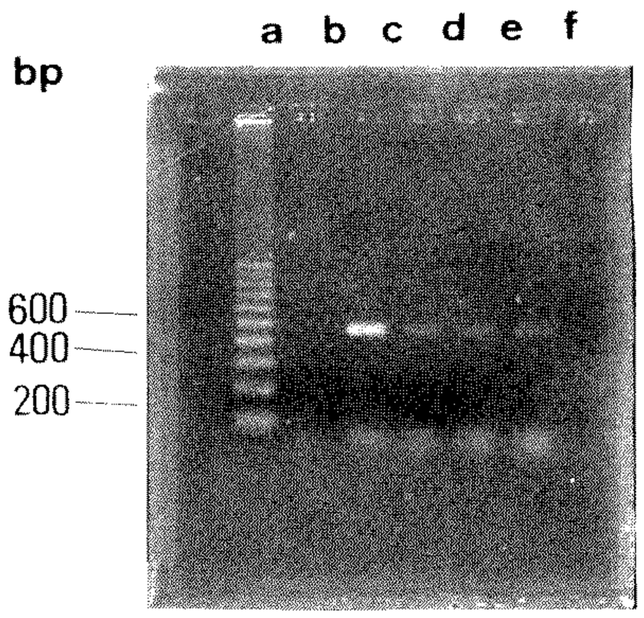

Figure 4. Sensitivity for double PCR assay of *S. typhi* strain IST32 using PCR primer pairs ST1/ST2. Experimental conditions were as described in Methods. Lane a: 100 bp ladder; lane b: negative control without target DNA, lanes c-f: PCR products with DNA obtained from 10^3 (c) , 10^2 (d) , 10^1 (e) , 10^0 (f) of *S. typhi* IST32, respectively. The PCR conditions were 94℃/20 sec, 58.5℃/20 sec, 72℃/30 sec. Total cycles for each PCR were 30.

列所發展出來的。其中， ST1 的序列是相對於核苷酸序列 1072 至 1089； ST2 則相對於序列 1513 至 1530，其 PCR 產物為 458 bp 片段。此外，由於 Song 等[13] 對於上述 PCR 引子之特異性，並未詳加探討，因此，本研究除了針對 *S. typhi* 做檢測之外，亦選取 9 株其他非 *S. typhi* 之沙門氏菌及與沙門氏菌血緣相近之腸內菌科細菌，如：*Citrobacter*、*Shigella*、*E. coli* 等 11 株非沙門氏菌，進行 PCR 引子特異性（ specificity ）之探討。其結果如表二所示。*S. typhi* 之標準菌株（ ATCC 8427 ）及 50 株收集自預防醫學研究所，源自傷寒熱患者之 *S. typhi* 菌株，皆為正反應（ 表二 ），部分 PCR 反應之電泳結果，則如圖一所示；而其餘非 *S. typhi* 之沙門氏菌、非沙門氏菌之腸內菌科細菌，則皆無 PCR 產物之產生（ 圖二 ）。顯示本研究用之寡核苷酸引子之特異性確實可靠。

Frankel 等[22]及 Wei 等[23] 之研究指出：雖然鞭毛基因（ flagellin gene ）並非 *S. typhi* 所特有，但是 *S. typhi* 在此鞭毛基因之高度變異區（ hypervariable region ）卻有一段相當專一的序列存在，因此，針對此一變異區所設計出來之寡核苷酸引子，應有良好的檢測特異性。

三、PCR 之檢測靈敏度（ sensitivity ）

由於應用 PCR 方法於臨床檢體中 *S. typhi* 之檢測，除檢測的正確性外，檢測靈敏度亦相當重要，因此，本研究亦探討 ST1/ST2 引子之 PCR 檢測靈敏度。各取 10^2-10^8 稀釋濃度的 *S. typhi* 菌株 IST 32 之菌液10 μl煮沸之後，直接進行一次聚合酶鏈反應之後，則其檢測所需最低菌數僅達到 10^4 CFU（ 圖三 ）。因此，進行二次 PCR（ double PCR ），以第一次 PCR 產生的 DNA 片段為模板，再進行 PCR，則其靈敏度則可提高至 10^0 CFU（ 圖四 ）。

由於 *S. typhi* 所引起的傷寒熱（ typhoid fever ）目前仍是一項極嚴重之公共衛生問題，因此，快速而靈敏的檢測法是相當必須的。然而，傳統之檢測法，包括血清學鑑定，需要五至七天[3]。但是，利用聚合酶鏈反應來鑑定分離之 *S. typhi* ，則具有相當良好之特異性與靈敏度，應可節省部分檢測時間。

Song 等[13] 在以 ST1/ST2 特異性檢測傷寒桿菌之實驗中，曾以巢式聚合酶鏈反應（ nested PCR ）進行二次 PCR 反應，以提高其檢測靈敏度。然所用之第二組 PCR 引子，ST3/ST4，雖仍源自 H1-d 基因，但為不具特異性之PCR 引子；因此，若直接以 ST3/ST4 作為 PCR 引子或如 Song 等，以上述巢式聚合酶鏈反應系統，第二次PCR時使用 ST3/ST4 引子時，皆可能對非 *S. typhi* 之其他血清型沙門氏菌導致假陽性反應。而本研究中，仍以

ST1/ST2 進行第二次 PCR 反應，顯無此顧慮；且檢測靈敏度亦可提高至 10^0 CFU。

Song 等[13] 直接以 PCR 方法檢測血液樣品中 *S. typhi* 時，發現其一次PCR 之檢測靈敏度僅達10^6 CFU，而以第二次 PCR（巢式 PCR）則可提高其靈敏度至 10^0 CFU，但如上所述，可能亦有假陽性反應之產生。本研究中，對於以煮沸法製備 *S. typhi* 純菌 DNA 之檢測靈敏度，於第一次 PCR 中可達 10^4 CFU，而以第二次 PCR 則可提高靈敏度至 10^0 CFU。雖然並未探討直接應用此 PCR 系統於血液或其他臨床樣品中 *S. typhi* 之檢測，；但本研究顯示，以 ST1/ST2 為 PCR 引子進行二次 PCR 反應，在檢測特異性及靈敏度均符合要求，因此將可應用於臨床檢體中 *S. typhi* 之快速，正確且具高靈敏度之檢測。

綜上所述，由於 *S. typhi* 的 PCR 檢測結果與傳統生化型及血清型鑑定結果十分相符，故本研究認為在傷寒菌感染的患者，對其病原菌之檢測而言，PCR 方法不失為一快速、可靠的初步篩檢之方法。

謝　誌

本研究承行政院農業委員會中美農業合作計劃支持 (計劃編號：84-科技-1.4-糧-02 (3)，TW-FSIS-4 (FG-Ta-140))，得以完成，特此誌謝。

參考文獻

1. Salyers, A.A. and Whitt, D.D. 1994. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach, pp. 229-243. ASM Press, Washington, DC. USA.
2. Sack, R.B., and Sack, D.A. 1992. Immunologic Methods for the Diagnosis of Infections by *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*, pp. 482-488. In Rose, N.R., De Macario, E.C., Fahey, J.L., Friedman, H. and Penn, (ed.) G.M. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 4th Ed. American Society for Micorbiology, Washington, D.C.
3. Levine, M.M., Grados, O., Gilman, R.H., Woodward, E., Solis-Plaza, R., and Waldman, W. 1978. Diagnostic Value of Widal Test in Areas Endemic for Typhoid Fever. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:795-800.
4. Wicks, A.C.B., Cruickshank, J.G., and Musewe, N. 1974. Observations on the Diagnosis of Typhoid Fever in an Endemic Area. S. Afr. Med. J. 48:1368-1370.
5. Gilman, R.H., Terminel, M., Levine, M.M., Hernandez-Mendoza, P., and Hornick, R.B. 1975. Relative Efficacy of Blood, Urine, Rectal Swab, Bone Marrow, and Rose Spot Cultures for Recovery of *Salmonella typhi* in Typhoid Fever. Lancet. 1:1211-1213.
6. Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Noon, K.F., and Baron, L.S. 1985. Development of a DNA Probe to Detect *Salmonella typhi*. J. Clin. Microbiol. 22:600-605.
7. Rubin, F.A., McWhirter, P.D., Burr, D., Punjabi, N.H., Lane, E., Kumala, S., Sudarmono, P., Pulungsih, S.P., Lesmana, M., Tjaniadi, P., Sukri, N., and Hoffman, S.L. 1990. Rapid Diagnosis of Typhoid Fever through Identification of *Salmonella typhi* within 18 Hours of Specimen Acquisition by Culture of the Mononuclear Cell-platelet Fraction of Blood. J. Clin. Microbiol. 28:825-827.
8. Rubin, F.A., McWhirter, P.D., Punabi, N.H., Lane, E., Sudarmono, P., Pulungsih, S.P., Lesmana, M., Kumala, S. Kopecko, D.J., and Hoffman, S.L. 1989. Use of a DNA Probe to Detect *Salmonella typhi* in the Blood of Patients with Typhoid Fever. J. Clin. Microbiol. 27:1112-1114.
9. Gannon, V.P., King, R.K., Kim, J.Y., Golsteyn, T. 1992. Rapid and Sensitive Method for Detection of Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* in Ground Beef Using the Polymerase Chain Reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58:3809-3815.
10. Besessin, M.T., Luo, Q., Rotbart, H.A., Blaser, M.J. and Ellison III, R.T. 1990. Detection of *Listeria monocytogenes* by Using the Polymerase Chain Reaction. Appl. Environ. Microbiol. 56:2930-2932.
11. Tsen, H.Y., Liou, J.W. and Lin, C.K. 1994. Possible Use of a Polymerase Chain Reaction Method for Specific Detection of *Salmonella*

in Beef. J. Ferment. Bioeng. 77:137-143.
12. Hill, W.E., Stacey, S.P., Trucksess, M.W., Feng, P., Kaysner, C.A., and Lampel, K.A. 1991. Polymerase Chain Reaction Identification of *Vibrio vulnificus* in Artificially Contaminated Oysters. Appl. Environ. Microbiol. 57:707-711.
13. Song, J.H., Cho, H., Park, M.Y., Na, D.S., Moon, H.B. and Pai, C.H. 1993. Detection of *Salmonella typhi* in the Blood of Patients with Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 31:1439-1443.
14. Zen-Yoji, H., Sakai, S., Terayama, T., Kudoh, Y., Itoh, T. 1985. Methods for Examination of Enteropathogenic Bacteria, 4th Ed. pp.285-294. Medicine Co. Tokyo, Japan.
15. Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. VI, pp. 427-458. Williams & Willkins, MD. USA.
16. Wernars, K., Delfgou, E., Soentoro, P.S., and Notermans, S. 1991. Successful Approach for Detection of Low Numbers of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Minced Meat by Using the Polymerase Chain Reaction. Appl. Eviron. Microbiol. 57:1914-1919.
17. Selander, R.K., Beleran, P., Smith, N.K., Helmuth, R., Rubin, F.A. , Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.O., Cravioto, A., and Musser, J.M. 1990. Evolutionary Genetic Relationships of Clones of *Salmonella* Serovars that Cause Human Typhoid and Other Enteric Fever. Infect. Immun. 58:2262-2275.
18. Pang. T., Altwegg, T.M., Martinetti, G., Koh, C.L., and Puthucheary, S. 1992. Genetic Variation among Malaysian Isolates of *Salmonella typhimurium* as Detected by Ribosomal RNA Gene Restriction Pantterns. Microbiol. Immunol. 36:539-543.
19. McClelland, R.G. and Pinder, A.C. 1992. Detection of *Salmonella typhimurium* in Dairy Products with Flow Cytometry and Monoclonal Antibodies. Appl. Environ. Microbiol. 60:4255-4262.
20. 周文祥, 李永盛及林勝育. 1985. 沙門氏桿菌血清型判別之分佈情形. 中華民國獸醫學會雜誌. 11:191-196.
21. Usera. M.A., Popovic, T., Bopp, C.A., and Strockbine, N.A. 1994. Molecular Subtyping of *Salmonella enteritidis* Phage Type 8 Strains from the United States. J. Clin. Microbiol. 32:194-198.
22. Frankel, G., Newton, S.M.C., Schoolwik, G.K., and Stocker, B.A.D. 1989. Unique Sequences in Region VI of the Flagellin Gene of *Salmonella typhi*. Mol. Microbiol. 3:1379-1383.
23. Wei, L. and Joys, T.M. 1985. Covalent Structure of Three Phase-1 Flagellar Filament Proteins of *Salmonella*. J. Mol. Biol. 186:791-803.

Journal of Food and Drug Analysis. 1995. 4(1)

Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) Method for the Rapid Identification of *Salmonella typhi*

PEY-RU LIU, TIEN-KUEI WANG*, CHIEN-KU LIN**, TZU-MING PANG* AND HAU-YANG TSEN

Department of Food Science, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.
**National Institute of Preventive Medicine, Department of Health, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, R.O.C.*
***Department of Food Nutrition, Hung-Kuang Institute of Nursing and Medical Technology, Shalu, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

In order to evaluate the applicability for using the polymerase chain reaction (PCR) method to replace the conventional biotyping and serotyping method for identification of *Salmonella typhi* isolated from suspected typhoid patients, PCR primers derived from the H1-d gene coding for *S. typhi* flagellin were used for the identification of *S. typhi* strains obtained from the Institute of Preventive Medicine, Taipei, Taiwan. All 50 *S. typhi* isolates were capable of generating positive reactions. In addition , *Salmonella* isolates other than *S. typhi* and non-*Salmonella* isolates including strains of *Enterobacteriaceae* did not yield positive reaction. Study on the detection sensitivity for this PCR system shows that when single PCR running was performed, the minimal cell number required to give a positive reaction was 10^4 . However , when double PCR running was performed, the detection sensitivity increased to 10^0 CFU. Therefore, these preliminary data indicates that PCR is a rapid and reliable method that can be used for the identification of *S. typhi* responsible for sporadic typhoid cases.

Key words : Polymerase chain reaction, *Salmonella typhi.*