

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。

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

(一) 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。

(二) 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

(一) 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°C 冷凍庫中，另以 cooked meat medium (Difco 0267) 於 4-8°C 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 H₂O 1000 ml)，於 37°C 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。

(二) 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。

(三) 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 μ l 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 1 μ l, 10 $\times$ PCR reaction buffer 4 μ l。及各 50 pmol 的 ST1 及 ST2 引子，以無菌水加至終體積為 40 μ l。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°C 加熱 30 分鐘，使細胞破裂，DNA 露出，繼之再加入 10 μ l 1 $\times$ PCR 反應液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 25°C), 1.5 mM MgCl₂, 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 μ l，進行聚合酶鏈反應。

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

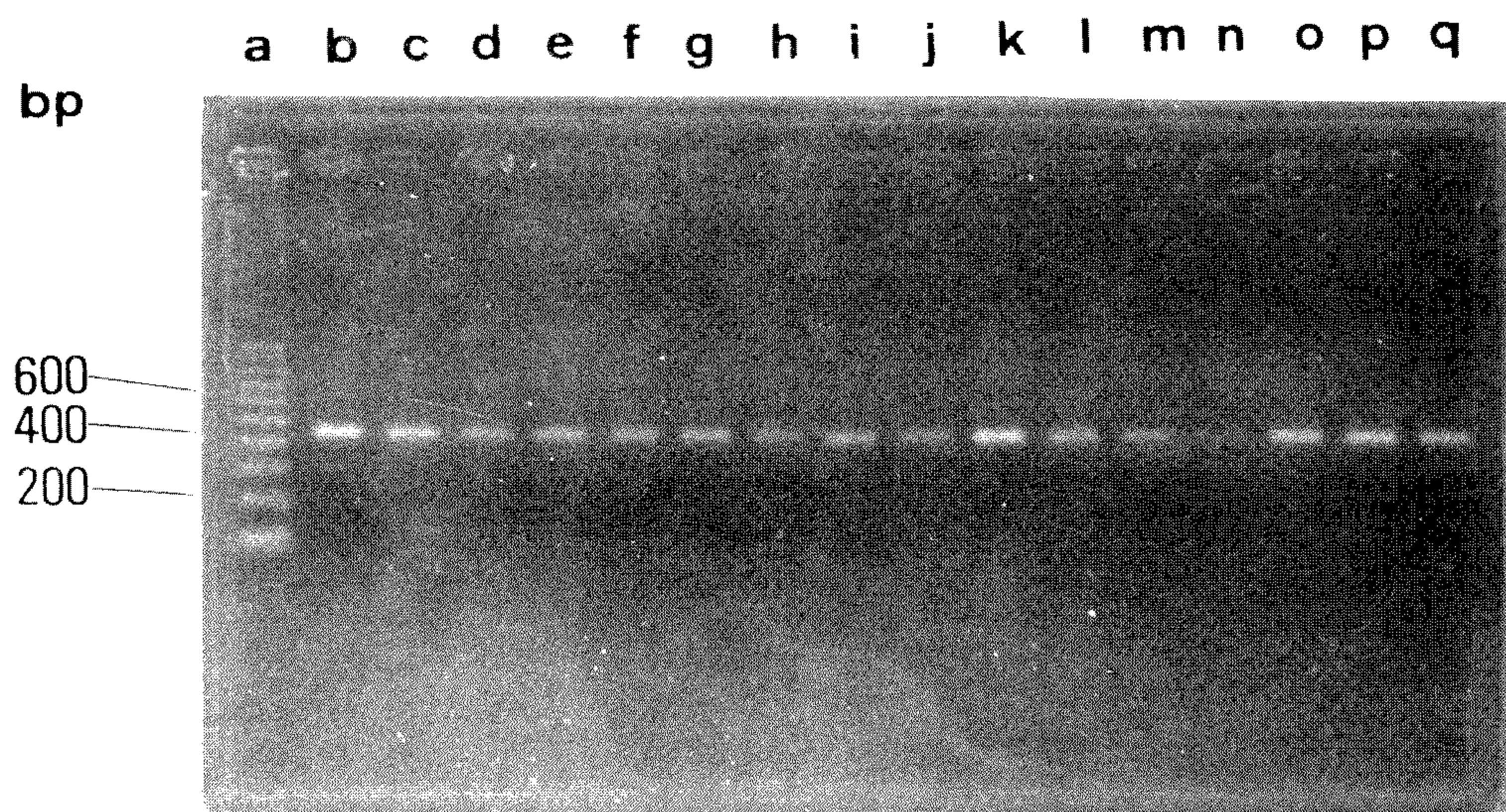


Figure 1. Detection specificity for clinical isolates of *S. typhi* using PCR primer pairs ST1/ST2. Lane a: 100 bp ladder. Lanes b-q : PCR products with target DNAs obtained by heat lysis of 10^6 bacterial cells from *S. typhi* ATCC 8427 (b); IST03 (c); IST05 (d); IST08 (e); IST12 (f); IST14 (g); IST20 (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°C/20 sec, 58.5°C/20 sec, 72°C/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°C/20 sec, 58.5°C/20 sec, 72°C/30 sec. Total cycles for PCR were 35.

用 (annealing) , 接著進行延長作用 (extension) , 於 72°C 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。

(四) 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 10² 至 10⁸ 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
<i>S. typhi</i> from typhoid patients	50	50
<i>S. typhi</i> (ATCC 8427) ^a	1	1
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)	1	0
<i>S. enteritidis</i> (ATCC 1376)	1	0
<i>S. derby</i> (TUF 7957A)	1	0
<i>S. agona</i> (TUF 9143A)	1	0
<i>S. panama</i> (USDA)	1	0
<i>S. infantis</i> (TUF 9142C)	1	0
<i>S. muenchen</i> (PT 625)	1	0
<i>S. weltevreden</i> (PT 658)	1	0
<i>S. kentucky</i> (USDA 1073A)	1	0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	0
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ATCC 43896)	1	0
<i>Citrobacter freundii</i> (CCRC 12291)	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CCRC 10692)	1	0
<i>Serratia marcescens</i> (CCRC 13880)	1	0
<i>Shigella flexneri</i> (CCRC 10772)	1	0
<i>Shigella sonnei</i> (CCRC 10773)	1	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> (CCRC 10807)	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	1	0
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	1	0
<i>Erwinia carotovora</i> (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

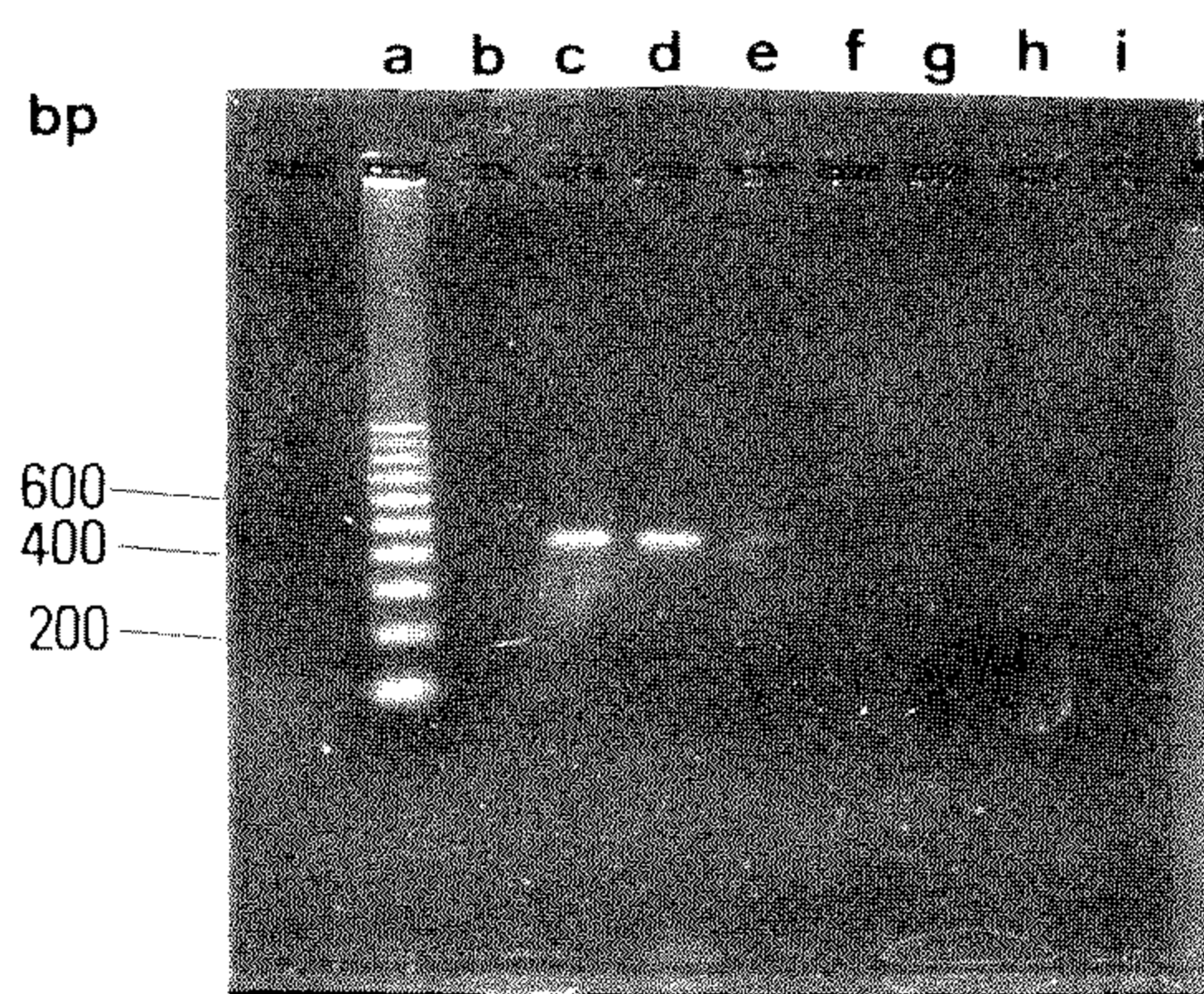


Figure 3. Sensitivity for PCR assay of *S. typhi* strain IST 32 using primers ST1/ST2. Lane a : 100 bp ladder ; lane b : negative control without target DNA; lanes c-i : PCR products with DNA obtained by boiling method from 10^6 (c), 10^5 (d), 10^4 (e), 10^3 (f), 10^2 (g), 10^1 (h), 10^0 (i) CFU of IST32,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

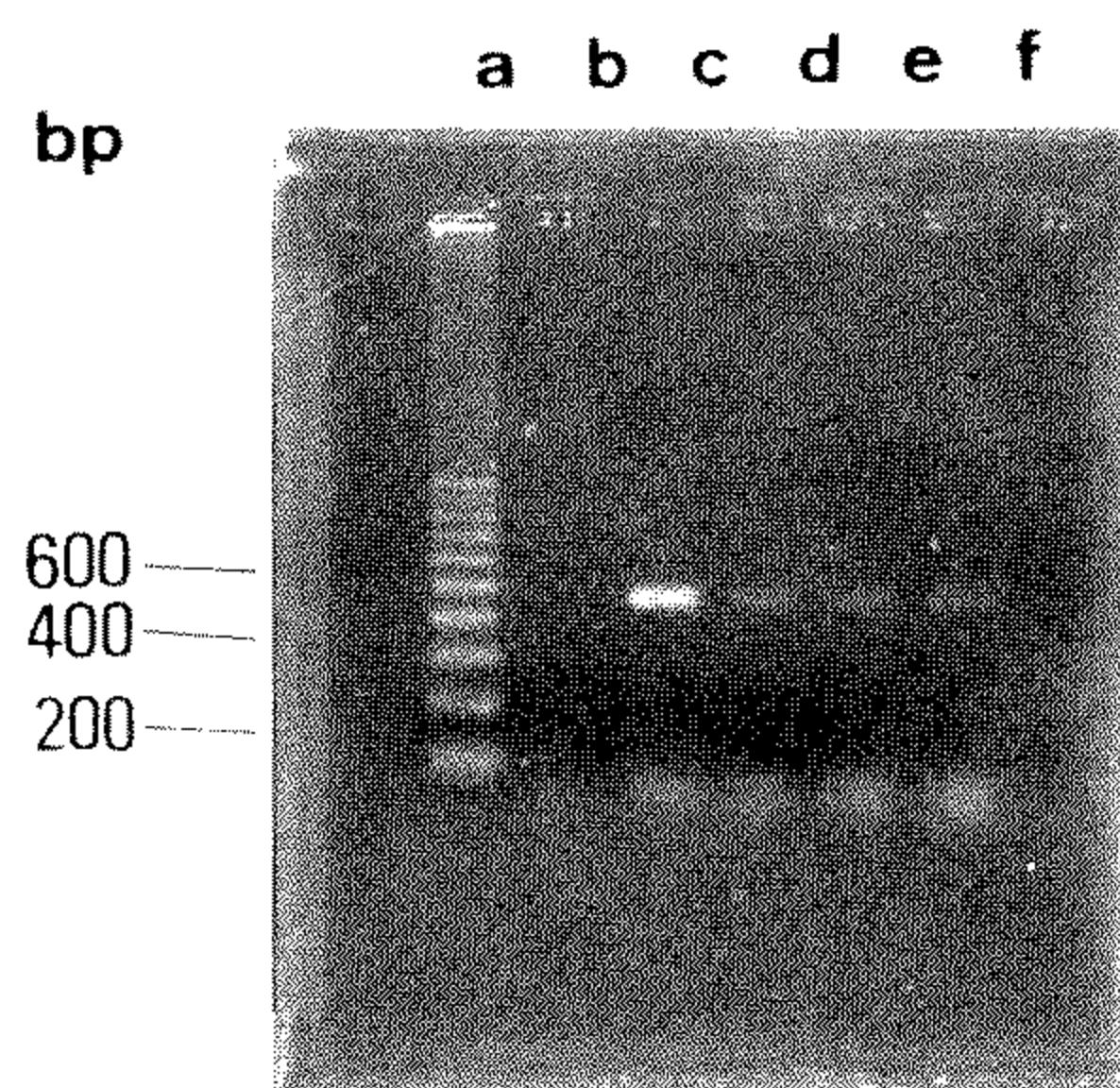


Figure 4. Sensitivity for double PCR assay of *S. typhi* strain IST32 using PCR primer pairs ST1/ST2. Experimental conditions were as described in Methods. Lane a: 100 bp ladder; lane b: negative control without target DNA, lanes c-f: PCR products with DNA obtained from 10^3 (c), 10^2 (d), 10^1 (e),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

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 includ-

ing 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*.

