

Joanna I. DOBROCZYŃSKA*

UKŁADY DETEKCYJNE DO IDENTYFIKACJI MIKROBIOLOGICZNEJ

Ze względu na fakt, iż coraz większa liczba bakterii chorobotwórczych jest identyfikowana jako patogeny przenoszone przez wodę i pożywienie, istotne jest opracowanie układów detekcyjnych identyfikujących potencjalne zagrożenie mikrobiologiczne. Wraz z szybkim rozwojem nowych technik diagnostyki chorób infekcyjnych i inwazyjnych zwiększa się również lista organizmów (wirusów, bakterii, grzybów i pasożytów), dla których dostępne są komercyjne molekularne testy diagnostyczne. Zestawienia to aktualnie obejmuje blisko dwieście pozycji, w tym ponad 100 szczepów bakteryjnych. Metody wykrywania bakterii muszą być szybkie i bardzo wrażliwe, ponieważ obecność nawet pojedynczego organizmu patogennego w organizmie lub w żywności już może stanowić dawkę zakaźną. Za obiecujące narzędzia służące do szybkiej detekcji i identyfikacji bakterii uznawane są biosensory i testy diagnostyczne. W pracy omówiono układy detekcji bezpośredniej i pośredniej mikroorganizmów.

1. WSTĘP

Bakterie, wirusy i inne mikroorganizmy występują powszechnie w przyrodzie i środowisku naturalnym. Bakterie patogenne mogą występować w glebie, wodach morskich i ujściach rzek, przewodzie pokarmowym zwierząt czy w wodzie skażonej fekaliami. Przeciętnie człowiek posiada więcej niż 150 rodzajów bakterii, które występują zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz ciała [6]. Są one nieszkodliwe, a nawet niezbędne dla zdrowia i życia. Większość mikroorganizmów prowadzi istotne działania sprzyjające środowisku. Jednakże pewne potencjalnie szkodliwe mikroorganizmy mogą wywierać głęboki wpływ na ludzi i zwierząt oraz mogą być przyczyną różnych chorób zakaźnych. Bakterie, kiedy wymagają odżywienia, odpowiedniej wilgotności

* Politechnika Wroclawska, Wydział Inżynierii Środowiska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Zakład Biologii i Ekologii, pl. Grunwaldzki 9, 50-377 Wrocław, joanna.dobroczyńska@pwr.wroc.pl

czy korzystnej temperatury mogą się łatwo i szybko rozprzestrzeniać [5]. Wśród szacowanych 50 milionów zgonów rocznie na całym świecie choroby zakaźne stanowią prawie 40%, a choroby mikrobiologiczne są główną przyczyną śmierci w wielu krajach rozwijających się. Z wojskowego punktu widzenia, istnieje wiele bakterii patogennych, które można uznać za ewentualne biologiczne środki bojowe. Są one odporne na warunki atmosferyczne, większość populacji ludzkiej jest na nie całkowicie podatna i mikroorganizmy te charakteryzują się zdolnością wywoływania ciężkich chorób cechujących się dużym ryzykiem efektu letalnego. Ponadto znaczna ilość mikroorganizmów wywołujących śmiertelność może się rozwijać w środowisku i utrzymywać żywotność przez kilka lat [24], [15].

Coraz większa liczba bakterii chorobotwórczych jest identyfikowana jako ważne patogeny przenoszone przez wodę i pożywienie [16]. Według szacunków roczna częstotliwość zachorowalności na choroby pokarmowe zawiera się w przedziale od kilku milionów do 81 milionów przypadków w USA, z czego bakterie pokarmowe powodują aż 91% wszystkich przypadków. Częstotliwość występowania u człowieka chorób wywołanych przez patogeny, takie jak: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Bacillus cereus* nie zmniejsza się na przestrzeni lat [16], [24]. Na przykład, *E. coli* występuje naturalnie w jelicie człowieka, ale może również powodować infekcje jelitowe i pozajelitowych. Bakterie te mogą łatwo zanieczyścić mieloną wołowinę, surowe mleko czy mięso kurczaka, dlatego bardzo ważna jest staranna kontrola tego patogenu w dziedzinie produkcji żywności. *Salmonella sp.* jest kolejnym przykładem niebezpiecznego szczepu pokarmowego, którego chorobotwórczość dla człowieka można stwierdzić we wszystkich gatunkach i szczepach [4], [7].

Skuteczne badanie bakterii wymaga metod analiz, które spełniają szereg trudnych kryteriów. Czas i czułość analizy są najważniejszymi ograniczeniami dotyczącymi przydatności badań mikrobiologicznych. Metody wykrywania bakterii muszą być szybkie i bardzo wrażliwe, ponieważ obecność nawet pojedynczego organizmu patogennego w organizmie lub w żywności może już stanowić dawkę zakaźną [9]. Tradycyjne metody stosowane do wykrywania *E. coli* obejmują standardowe kliniczne testy mikrobiologiczne. Charakteryzują się one długim czasem inkubacji około 24-72 h są wrażliwe, niedrogie i dają informacje jakościowe i ilościowe w sprawie ilości i charakteru badanych mikroorganizmów, jednak nadal są czasochłonne. Co więcej, przeprowadzenie takich testów bardzo często wiąże się z dodatkową hodowlą oraz oględzinami próbek za pomocą mikroskopii, cytometrii przepływowej lub reakcji łańcuchowej polimerazy [11].

Biosensory i testy diagnostyczne są uważane za obiecujące narzędzia do szybkiej detekcji i identyfikacji bakterii. Główną ideą rozwijania nowych narzędzi diagnostycznych jest konwersja sygnału rozpoznawania specyficznego analitu na ilościowe lub półilościowe informacje analityczne.

2. UKŁADY DETEKCYJNE

2.1. DETEKcja BEZPOŚREDNIA

Obecnie większość badań mikrobiologicznych jest scentralizowana w dużych laboratoriach stacjonarnych, ponieważ wymagają one złożonego oprzyrządowania i wysoko wykwalifikowanego personelu technicznego. Jednakże w ostatnich latach, zostały podjęte intensywne badania mające na celu decentralizację takich testów tak, aby mogły być one wykonane w dowolnym miejscu, a praktycznie w warunkach polowych [19]. Stąd dynamiczny rozwój technologii przenośnych, szybkich i czułych biosensorów z bezpośrednią interpretacją wyników "na miejscu". Obszary, dla których biosensory wykazują obiecujące zastosowanie to: diagnostyka kliniczna, analiza żywności, monitoring środowiska i procesów biologicznych [14], [3]. Znaczenie biosensorów wynika z ich wysokiej specyficzności i czułości, które pozwalają na wykrywanie szerokiego spektrum analitów w złożonych matrycach próbek (krwi, surowicy, moczu lub żywności) z ich minimalną obróbką wstępną.

Biosensory służące do wykrywania bakterii składają się generalnie ze składnika biologicznego (kwasy nukleinowe, receptory lub przeciwciała) pozostającego w bezpośrednim kontakcie z odpowiednią częścią aparaturową przetwarzającą sygnał powstały w części biologicznej. W zależności od zastosowanej metody przetwarzania sygnału biosensory można podzielić na cztery podstawowe grupy: optyczne, masowe, elektrochemiczne i termiczne [8]. W innym podziale można wyróżnić dwie kategorie: czujniki do bezpośredniego wykrywania analitu docelowego i czujniki z pośrednim (znakowaniem) wykrywaniem. Sensory bezpośredniego wykrywania są zaprojektowane w taki sposób, że specyficzna biologicznie reakcja jest bezpośrednio określona w czasie rzeczywistym na podstawie pomiaru zmian fizycznych wywołanych przez tworzenie kompleksu [11]. Natomiast sensory wykrywania pośredniego to te, w których wstępnie zachodzi reakcja biochemiczna, a jej produkty są następnie wykrywane za pomocą czujnika. Można również wyodrębnić podział na czujniki działające w trybie okresowym (przerwywany) i ciągłym (monitoring) [8].

Przetworniki optyczne są szczególnie atrakcyjne dla bezpośredniego wykrywania bakterii. Czujniki te są w stanie wykryć w ciągu minuty zmiany współczynnika załamania lub grubości, których pojawienie się jest efektem związania komórki bakteryjnej z receptorami immobilizowanymi na powierzchni przetwornika. Swenson wykorzystuje metodę elipsometryczną dla rozwoju przyrządów bezpośredniego wykrywania bakterii (BDS-240) [25]. Głównym elementem systemu BDS-240 jest moduł optyczny, który składa się z układu: diody LED/filtr wzbudzenia i fotodiodowego systemu wykrywania. Bakterie metabolizujące spowodowałyby wzrost stężenia CO₂, który z kolei powoduje emulsję wodnego wskaźnika kolorymetrycznego, a zatem modulowana jest fluorescencja wykrywana przez fotodiody. Selektywność jest zależna od selektywności pożywki używanej do wzrostu bakterii. System ten stosuje

się do nieilościowych testów wykrywania bakterii zarówno tlenowych jak i beztlenowych.

Osiągnięcia czujników bioanalitycznych doprowadziły do wykorzystania zdolności pewnych enzymów do emitowania fotonów jako produktów ubocznych ich reakcji. Zjawisko to znane jest jako bioluminescencja i może być stosowane do wykrywania obecności i stanu fizjologicznego komórek. Sarkis użył bakteriofaga L5 do wykrywania *Mycobacterium segmantis* [22]. Na luminometrze wykrywany był wyjściowy sygnał generowany przez reakcje lucyferazy, dzięki któremu możliwa była detekcja stu komórek *M. segmantis* w ciągu kilku godzin i 10 komórek w ciągu dwóch dni. Korzystając z tej samej metody wykryto również *Salmonella sp.* i *Listeria sp.*

2.1. DETEKcja BEZPOŚREDNIA

Mikroorganizmy są immunogenne z powodu obecności białek i polisacharydów w zewnętrznych warstwach. To pozwala na rozwój immunologicznych technik wykrywania bakterii. W immunologicznych analizach fluorescencyjnych (FIA) cząsteczki fluorochromów są stosowane do znakowania immunoglobulin, dzięki którym można uzyskać dodatkowe informacje (np. odróżnić komórki pojedyncze od zlepionych - tzw. dyskryminacja dubletów). Fluorochromy to substancje posiadające zdolność do autofluorescencji, a dzięki ich powinowactwu do określonych związków obecnych w komórkach nadają im właściwości fluorescencji wtórnej (np. oranż akrydynowy, który tworzy specyficzne kompleksy z kwasami nukleinowymi). Fluorochrom absorbuje krótkie długości fali światła, a następnie wydziela się światło o większej długości fali, które może być wykrywane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Istnieje kilka rodzajów fluorochromów, różniących się między sobą sposobem działania. Niektóre z nich emitują sygnał jedynie po przyłączeniu się do specyficznych składników komórkowych: białek (izotiocyanian fluoresceiny, ang. *fluorescein isothiocyanate* - FITC), kwasów nukleinowych (jodek propidyny, ang. *propidium iodide* - PI) i tłuszczu (Czerwień Nilu, ang. *Nile Red*). Inną grupą są tzw. fluorogeniczne substraty, których aktywność zależy od obecności odpowiednich enzymów. Wyróżnia się także znaczniki związane z fizjologicznymi parametrami komórki (pH< potencjał błonowy, itp.). Metoda fluorescencji jest na tyle czuła, że pozwala na wykrycie i dokonanie ilościowego pomiaru bardzo niewielkich ilości substancji. Fluorochromami mogą być znakowane przeciwciała (immunofluorescencja) stosowane w cytochemii i diagnostyce klinicznej [13]. Izotiocyanian fluoresceiny (FITC) i izotiocyanian rodaminy B surowiczej albuminy są najczęściej stosowane do znakowania przeciwciał fluorochromami. Pyle zastosował techniki fluorescencji przeciwciał, które następnie inkubowano z chlorkiem tetrazolowym CTC. Po uchwyceniu i inkubacji bakterii dodano koniugat fluoresceiny. Za pomocą tej techniki można było wykryć *E.coli* O157: H7 w zakresie 10^5 - 10^9 CFU/ml w czasie 4-godzinnego testu. Technika ta jest również stosowana do wykrywania *Salmonella typhimurium* i *Klebsiella pneumoniae* [21],

[18]. Metoda barwienia z solami terazolowymi, np. INT (chlorek jodo-nitro-tetrazoliowy) lub CTC jest stosowana do oznaczania komórek VBNC („żywych, lecz nie dających się hodować” VBNC – ang. viable but nonculturable) w populacjach bakteryjnych. Związki tetrazolowe redukowane są przez dehydrogenazy do odpowiednich formazanów: niebieskiego INT-formazanu lub czerwonego CTC-formazanu o właściwościach fluorescencyjnych do wykrywania aktywności oddychania.

Liczebność mikroorganizmów w próbce można określić przez monitorowanie metabolizmu drobnoustrojów. Elektroniczne czujniki bazujące na elektrodzie tlenowej Clarka są stosowane do szybkiego oznaczenia *E. coli*, *S. aureus* i *Enterococcus serolicida* w próbce biologicznej [7]. Zawiesinę komórek filtrowano przez membrany nitrocelulozowe (o średnicy porów 0,45 μm). Membrany wraz z zatrzymanymi komórkami ustawiono na pracującej platynowej katodzie tlenowej elektrody Clarka i pokryto membraną do dializ. Elektrode mikrobiologiczną zanurzano w 0,05 M buforze fosforanowym, aż do stabilizacji strumienia wychodzącego. Elektrode następnie wyjęto i umieszczono w roztworze zawierającym azydek sodu, który hamował wzrost większości drobnoustrojów z wyjątkiem *E. serolicida*. Liniową zależność otrzymano w zakresie $1,4 \cdot 10^7$ - $7,2 \cdot 10^7$ komórek/ml w czasie 2-godzinnego testu, co umożliwia ilościowe oznaczenie badanej próbki na podstawie oznaczonej zawartości tlenu. Jednakże, liniowy zakres elektrody tlenowej jest ograniczony ze względu na niskie stężenie tlenu.

Większość testów jest opartych na fazie stałej immunoenzymatycznego testu (ELISA) z użyciem płytek mikrotitracyjnych. Test ten stosowany jest do analizy w badaniach biomedycznych z powodu wysokiej powtarzalności i możliwość jednoczesnego prowadzenia wielu analiz. Oczywiście, nie można umieścić 25 g próbki bezpośrednio w płytce mikrotitracyjnej, dlatego też w wielu przypadkach, w celu zwiększenia czułości testu, pożądane jest skoncentrowanie bakterii do mniejszej objętości przed testem lub wyhodowanie kolonii z pojedynczej komórki. Najatrakcyjniejszą techniką zateżania bakterii jest filtracja membranowa w połączeniu z systemami przepływowymi [1]. Przykładem takiego immunotestu jest test oparty na wykorzystaniu strzykowego systemu przepływowego i przeciwciała powlekanego cząstkami magnetycznymi [20]. Technika ta może być łatwo zautomatyzowana, analizy przeprowadzone są szybko i płynnie, a także łatwo można odnowić czułą powierzchnię immunosensora. W celu regeneracji immunoreagenta, usuwa się magnez i obmywa cząstki magnetyczne. W tym momencie, test jest przygotowany do wstrzykiwania nowego przeciwciała zmodyfikowanego cząstkami magnetycznymi dla innego cyklu analitycznego. System został zastosowany do wykrywania przetrwalników *B. anthrax.*, *E. coli O157* i *S. typhimurium*. Typowy strumień wyjściowy z układu strzykowego jest pik, który wynika z rozproszenia wtryskiwanej próbki. Ciągła konfiguracja testów immunologicznych jest ważna dla właściwości takich jak: wstrzykiwanie lub odsysanie próbki do/z czujnika, kondycjonowanie (ustalenie pH, mieszanie z innymi odczynnikami) dla pełnego przebiegu reakcji i detekcji, która następuje na po-

wierzchni czujnika, regeneracja czujnika między próbkami, ułatwianie niezawodnej kalibracji i zwiększenie selektywności i czułość czujnika poprzez moduł stałej separacji, zwiększenie precyzji poprzez zmniejszenie ingerencji człowieka.

Sondy genowe odgrywają bardzo ważną rolę w ochronie zdrowia, rolnictwie i monitoringu środowiska. Wojskowe użycie sond genetycznych wiąże się z bardzo wrażliwym oznaczeniem mikroorganizmów, wirusów (broń biologiczna) i śladowych ilości specjalnych chemikaliów w różnych środowiskach. Sondy genowe znajdują zastosowanie w wykrywaniu mikroorganizmów chorobotwórczych w dostarczanej wodzie i żywności, albo w tkankach roślinnych, zwierzęcych lub ludzkich [27].

W identyfikacji patogenów analizie najczęściej poddawane są sekwencje DNA kodujące rybosomowy RNA obu podjednostek rybosomu, bądź też sam rRNA. Geny dla rRNA występują u wszystkich organizmów (wyjątek stanowią wirusy), i pomimo tego, że posiadają regiony o znikomej zmienności gatunkowej (a nawet rodzajowej), zawierają także sekwencje DNA specyficzne dla poszczególnych gatunków. Swoistym i wyjątkowym znakiem rozpoznawczym danego mikroorganizmu są wybrane fragmenty genów dla rRNA. Do detekcji i klasyfikacji mikroorganizmów używa się niekiedy innych regionów ich genomu. Niełatwo jest znaleźć unikalne geny, kodujące niepowtarzalne, funkcjonalne białka dla poszczególnych drobnoustrojów. Specjalną uwagę poświęca się testom rozpoznającym swoiste dla danej bakterii plazmidy, wnioskując na ich podstawie nie tylko o identyfikacji patogenu, ale także o jego oporności na określone leki [12].

Genowa sonda kwasu nukleinowego opisuje segment kwasu nukleinowego, który specyficznie rozpoznaje i wiąże się z docelowym kwasem nukleinowym. Rozpoznanie zależy od powstawania stabilnych wiązań wodorowych pomiędzy dwiema niemi kwasu nukleinowego. Kontrastuje to z oddziaływaniem tworzącym kompleks antygen-przeciwciało, w którym znaczenie mają wiązania hydrofobowe, jonowe i wodorowe. Wiązanie pomiędzy kwasami nukleinowymi występuje w regularnych odstępach wzdłuż długości dupleksu kwasu nukleinowego (nukleotydy), podczas gdy wiązanie przeciwciało-białko występuje tylko w kilku określonych miejscach (epitopach) [28]. Częstotliwość wiązania odzwierciedla wyższą w porównaniu z kompleksem przeciwciało-białko stałą asocjacji dupleksu kwasu nukleinowego, co umożliwia opracowanie bardzo specyficznych i czułych systemów detekcji z wykorzystaniem kwasów nukleinowych. Specyfika kwasów nukleinowych wykorzystuje zdolność różnych nukleotydów do tworzenia wiązań tylko z właściwym odpowiednikiem. Ponieważ warstwy rozpoznające kwasy nukleinowe są bardzo stabilne, zaletą ligandów kwasów nukleinowych jako immobilizowanych czujników jest to, że mogą one być łatwo denaturowane do odwrócenia wiązania, a następnie łatwo regenerowane przez kontrolowanie stężenia jonów buforu. Wykrywanie specyficznych sekwencji DNA stanowi podstawę do wykrywania różnorodnych patogenów bakteryjnych [23].

Bezpośrednie monitorowanie reakcji hybrydyzacji umożliwia powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR). System Biacore (Pharmacia, Szwecja) wykorzystuje SPR,

który powstaje w cienkich warstwach metali w warunkach całkowitego wewnętrznego odbicia. W elemencie pomiarowym urządzenia, złota powierzchnia przetwornika jest modyfikowana dekstranową matrycą, w której immobilizowane są sondy biologiczne (często poprzez wiązanie awidyna-biotyna). Oligonukleotydy są wprowadzane w fluidalnym systemie przepływowym. Hybrydyzację prowadzi się w temperaturze pokojowej i pozytywne sygnały otrzymuje się w ciągu kilku minut [28].

Obecnie stosuje się dwa typy hybrydyzacji: a) hybrydyzację pseudo-jednorodną, którą można osiągnąć w systemach o dużym współczynniku powierzchnia-objętość, takich jak membrany porowate i silnie rozproszone nośniki im mobilizujące; b) hybrydyzacja do fazy stałej, którą poprzedza transfer do membrany. Główną wadą hybrydyzacji fazy stałej w stosunku do pseudo-jednorodnej jest dłuższy czas i potrzeba wykonania kilku zabiegów [26]. Prowadzenie reakcji hybrydyzacji w trybie stałego przepływu (w systemie czujników przepływowych jako wariantu przepływowej analizy strzykowej) ułatwia zniesienie ograniczeń transportowych. Aubert opisał rozwój techniki enzymatycznego testu immunofiltracyjnego do szybkiego wykrywania DNA *Toxoplasma gondii* w próbkach rzeczywistych [2]. Aktualne techniki hybrydyzacji umożliwiają stosunkowo szybką (około 24-48 godzin) biochemiczną identyfikację bakterii. Jednak nie są to proste metody, składają się na wieloetapowy test i pojawia się również problem fałszywych amplifikacji [10].

3. PODSUMOWANIE

Pomimo ciągłego rozwoju prac badawczych i rozwojowych układy detekcyjne są stosowane do wykrywania nielicznych grup bakterii. Stworzenie układów z właściwościami niezbędnymi dla rzetelnego i skutecznego zastosowania stanowi duże wyzwanie. Układ taki musi specyficznie odróżniać docelowe bakterie w matrycy z wieloma organizmami, musi mieć zdolność adaptacji do wykrywania różnych analitów, szybkość otrzymania wyników w czasie rzeczywistym i czułość bezpośredniego wykrywania bakterii, działać on-line bez wstępnego wzbogacania i Jednocześnie powinien być stosunkowo prosty i mieć niekosztowne konfiguracje [6].

Układy diagnostyczne powinny zapewniać niską granicę wykrywalności, np. jeden organizm typu *E.coli* w 100 ml wody przeznaczonej do spożycia, w szybkim czasie przy stosunkowo niskich kosztach. Tylko w takim przypadku będą one odpowiednie do testów on-line bakterii patogennych w próbkach rzeczywistych. Problem stanowi również rozróżnienie komórek żywych i martwych. Układy do detekcji mikrobiologicznej powinny ograniczać ingerencję człowieka w swoim działaniu (w celu uniknięcia dodatkowego zanieczyszczenia), a zatem ich nieodłącznym atrybutem powinna być automatyka [11], [16].

LITERATURA

- [1] ABDEL-HAMID I., IVNITSKI D., ATANASOV P., Wilkins E., *Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of E. coli O157:H7*, Biosensors Bioelectronics, 1999, 14, 309–316.
- [2] AUBERT D., TOUBAS D., FOUDRINIER F., VILLENA I., GOMEZ J.E., MARX C., LEPAN H., PINON J.M., *Accelerated detection of DNA on Membranes by automated enzyme-linked immunofiltration assay*, Anal. Biochem., 1997, 247, 25–29.
- [3] BLUM L.J., *Bio- and chemiluminescent sensors*. World Scientific, River Edge 1997, 198.
- [4] BUCHANAN R.L., DOLY M.P., *Foodborne disease significance of E. coli O157:H7 and other enterohemorrhagic E. coli*, Food Technol., 1997, 51 (10), 69–76.
- [5] COMPTON J.A.F., *Military Chemical and Biological Agents*, Telford Press, Caldwell 1987.
- [6] DANDO M., *Biological Warfare in the 21st Century*, Brassey's, London 1994.
- [7] ENDO H., FUJISAKI K., OHKUBO Y., HAYASHI T., WATANABE E., *A biosensor system for the determination of cell number of Enterococcus-Seriolocida.*, Fisheries Sci., 1996, 62, 235–239.
- [8] GOEPEL W., HEIDUSCHKA P., *Interface analysis in biosensor design.*, Biosensors Bioelectron., 1995, 10, 853–883.
- [9] GREENBERG A.E., TRUSSEL R.R., CLESCERI L.S., FRANSON M.A.H., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington 1992.
- [10] GUSCHIN D.Y., MOBARRY B.K., PROUDNIKOV D., STAHL D.A., RITTMANN B.E., MIRZABEKOV A.D., *Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology*, Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63 (6), 2397–2402.
- [11] IVNITSKI D., ABEL-HAMID I., ATANASOV P., WILKINS E., *Biosensors for detection of pathogenic bacteria*, Biosens. Bioelectron., 1999, 14, 599–624.
- [12] JAMESON J.L., COLLINS F.S., *Principles of molecular medicine*. Humana Press, Totowa 1998.
- [13] KASPAR C.W., TARTERA C., *Methods for detecting microbial pathogens in food and water*. Methods Microbiol., 1990, 22, 497–530.
- [14] KRESS-ROGERS E., *Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment.*, CRC Press, Boca Raton 1997.
- [15] MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J., *Brock Biology of Microorganisms*, wyd. 8, A Viacom Company Upper Saddle River 1997, 986.
- [16] McNAMARA A.M. *Foodborne pathogens*, J. Urban Health Bull. N.Y. Acad. Med., 1998, 75 (3), 503–505.
- [17] MENG J., DOYLE M.P., *Emerging and evolving microbial foodborne pathogens*, Bull. Institut Pasteur, 1998, 96 (3), 151–163.
- [18] MISKIN I., RHODES G., LAWLOR K., SAUNDERS J.R., PICKUP R.W., *BACTERIA IN POST-GLACIAL FRESHWATER SEDIMENTS.*, MICROBIOLOGY, 1998, 144, 2427 – 2439.
- [19] OWEN V.M., *Market requirements for advanced biosensors in healthcare*. Biosens. Bioelectron., 1994, 9, 29-35.
- [20] PEREZ F.G., MASCINI M., TOTHILL I.E., TURNER A.P.F., *Immunomagnetic separation with mediated flow-injection analysis amperometric detection of viable E. coli O157.*, Anal. Chem., 1998, 70, 2380–2386.
- [21] PYLE B.H., BROADWAY S.C., MCFETERS G.A., *A Rapid, direct method for enumerating respiring enterohemorrhagic E. coli O157:H7 in water.*, Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61 (7), 2614–2619.
- [22] SARKIS G.K., JACOBS W.R., HATFULL G.F., *Luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria.*, Mol. Microbiol., 1995, 15, 1055–1067.
- [23] SKURIDIN S.G., YEVDOKIMOV Y.M., EFIMOV V.S., JENNIFER M.H., TURNER A.P.F., *A*

- new approach for creating double-stranded DNA biosensors*, Biosensors Bioelectron., 1996, 11 (9), 903–911.
- [24] SWAMINATHAN B., FENG P., *Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria*. Annu. Rev. Microbiol., 1994, 48, 401–426.
- [25] SWENSON F.J., *Development and evaluation of optical sensors for the detection of bacteria*, Sensors Actuators B, 1993, 11, 315–321.
- [26] YANG M., MCGOVERN M.E., THOMPSON M., *Genosensor technology and the detection of infacial nucleic chemistry.*, Anal. Chim. Acta, 1997, 346, 259.
- [27] YU H., STOPA, P.J., *Application of an immunomagnetic assay system for detection of virulent bacteria in biological samples.*, Environmental Immunochemical Methods: Perspectives and Applications, Washington 1995, 297–306.
- [28] ZHAI H., CUI H., YANG R.F., *DNA-based biosensors*. Biotechnol. Adv., 1997, 15 (1), 43–58

DETECTION SYSTEMS FOR MICROBIOLOGICAL IDENTIFICATION

Due to the fact that an increasing number of pathogenic bacteria is identified as a food- and water-borne pathogens, it is important to develop a detection system identifies potential microbiological risk. With the rapid development of new techniques for diagnosing of infectious and invasive diseases, increases the list of organisms (viruses, bacteria, fungi and parasites) for which commercially available molecular diagnostic tests. Methods for detection of bacteria need to be fast and very sensitive, since the presence of even of a single pathogenic organism in the body of food may be an infectious dose. In this paper systems of direct and indirect detection of microorganisms.