Daniela GWIAZDOWSKA, Marian FILIPIAK

METODY WYKRYWANIA MIKROORGANIZMÓW PATOGENNYCH W ŻYWNOŚCI

Skażenie żywności przez chorobotwórcze patogeny i toksyny stanowi jeden z najważniejszych problemów zdrowotnych współczesnego świata. Zjawisko to dotyczy zarówno krajów wysoko uprzemysłowionych, jak i słabo rozwiniętych. Epidemiolodzy szacują, że choroby wywołane przez mikroorganizmy patogenne są przyczyną około 40% całkowitej liczby zgonów na świecie. Lista mikroorganizmów patogennych (tab. 1) obejmuje bakterie, pasożyty i wirusy, przy czym niemal 75% wszystkich zatruć spowodowanych jest przez bakterie [24].

Tabela 1

Mikroorganizmy patogenne (FDA*, CDC, National Institute of Health)**

Bakterie	Pasożyty	Wirusy
Salmonella spp.	*Giardia lamblia*	wirus żółtaczki typu A
Clostridium botulinum	*Entamoeba hystolytica*	rotawirus
Clostridium perfringens	**Cryptosporidium parvum**	wirusy z grupy Norwalk
Staphylococcus aureus	*Cyclospora cayetanensis*	
Campylobacter jejuni	*Anisakis* sp.	
Yersinia enterocolitica	*Diphyllobotrium* spp.	
Yersinia pseudotuberculosi	*Nanophyetus* spp.	
Listeria monocytogenes	*Eustrongylides* spp.	
Vibrio cholerae	*Acanthamoeba*	
Vibrio parahaemolyticus	*Ascaris lumbricoides*	
Bacillus cereus		
Aeromonas hydrophila		
Aeromonas spp.		
Plesiomonas shigelloides		
Shigella spp.		
Streptococcus spp.		
Escherichia coli		

* FDA - Food and Drug Administration; ** CDC - Centre for Disease Control.

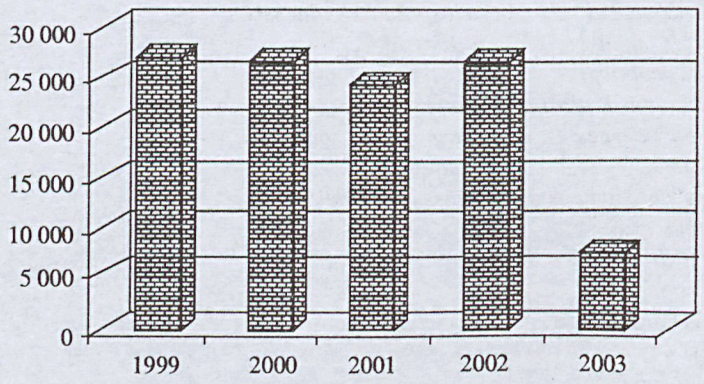
Przykładowo, w Stanach Zjednoczonych odnotowuje się około 76 mln zatruć pokarmowych rocznie, z czego 325 tys. przypadków wymaga hospitalizacji, a niemal 5000 to przypadki śmiertelne. W tabeli 2 przedstawiono mikroorganizmy patogenne, będące najczęstszą przyczyną zachorowań w tym kraju. Znamienne jest, iż tylko w około 14 mln zatruć udaje się wykryć mikroorganizm odpowiedzialny za schorzenie, podczas gdy przy aż 62 mln zatruć etiologia pozostaje nieznana [10].

Tabela 2

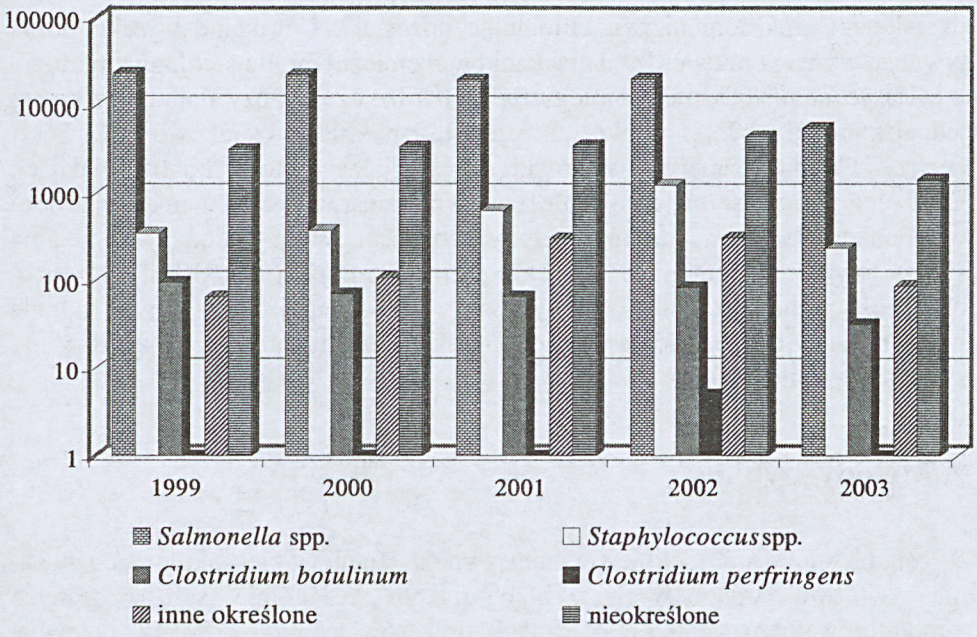
Przyczyny zatruć pokarmowych w Stanach Zjednocznonych

Bakterie	Liczba zachorowań rocznie
Campylobacter jejuni	1 963 000
Salmonella spp.	1 342 000
Clostridium perfringens	248 520
Staphylococcus spp.	185 060
Escherichia coli O157:H7	62 500
Listeria monocytogenes	2 500

Jak wynika z danych Państwowego Zakładu Higieny, w Polsce odnotowuje się prawie 27 tys. zatruć pokarmowych rocznie (rys. 1), przy czym liczba zachorowań co roku kształtuje się na podobnym poziomie. Najczęstszą przyczyną zachorowań są bakterie z rodzaju *Salmonella*, w dalszej kolejności zatrucia powodowane są przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* i *Clostridium* (rys. 2). W znacznej liczbie przypadków, tj. około 3-4 tys. rocznie, nie udaje się zidentyfikować mikroorganizmu odpowiedzialnego za zatrucie.



Rys. 1. Liczba zatruć pokarmowych w Polsce w latach 1999-2003 (2003 r. obejmuje dane od 1 stycznia do 31 czerwca)



Rys. 2. Przyczyny zatruć pokarmowych w Polsce w latach 1999-2003 (dane PZH)

Wobec tak dużej liczby zatruć o nieokreślonej przyczynie laboratoria na całym świecie dążą do opracowania skutecznych metod ich wykrywania i identyfikacji. Wykrywanie skażeń mikrobiologicznych ma podstawowe znaczenie w zachowaniu bezpieczeństwa żywności. Metody ilościowego i jakościowego oznaczania drobnoustrojów w żywności można podzielić na konwencjonalne i szybkie.

1. Konwencjonalne metody mikrobiologiczne

Konwencjonalne metody umożliwiają przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej badanej próbki żywności. Identyfikacji bakterii dokonuje się na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych mikroorganizmów. Wynik uzyskuje się w rezultacie przeprowadzenia kilku etapów, takich jak przednamnażanie, namnażanie selektywne i identyfikacja mikroorganizmów. Przednamnażanie polega na posiewie próbki żywności na podłoże nieselektywne w celu zwiększenia liczby mikroorganizmów, co ma szczególne znaczenie w przypadku badania produktów przetworzonych, zwłaszcza poddanych procesom utrwalania, gdzie ilość mikroorganizmów jest niewielka. Kolejny etap polega na przesiewaniu uzyskanej mieszaniny na podłoża selektywne celem namnożenia i wyizolowania

określonego mikroorganizmu, eliminując pozostałe. Uzyskanie wyniku pozytywnego wymaga potwierdzenia testami biochemicznymi lub serologicznymi.

Klasyczne metody mikrobiologiczne są bardzo czułe, pozwalają na wykrycie jednej komórki w 25 g próbki, ich zaletą jest również stosunkowo niski koszt analizy. Co najważniejsze, stanowią one oficjalne metody kontroli jakości, uznawane przez instytucje kontrolne zarówno państwowe, jak i międzynarodowe. Ponadto są wymagane jako metody odniesienia w przypadku posługiwania się tzw. szybkimi testami. Jednak niewątpliwą wadą tych metod jest ich pracochłonność i długi czas analizy, wynoszący co najmniej kilka dni, co skłania wielu badaczy do poszukiwania nowych, skutecznych i szybkich metod oceny stanu mikrobiologicznego żywności.

2. Metody szybkie

W ostatnich latach obserwuje się intensywne działania w kierunku opracowywania i wprowadzania nowych szybkich metod, szczególnie tych związanych z monitorowaniem stanu higienicznego procesów technologicznych, detekcją, określeniem ilościowym i identyfikacją mikroorganizmów. Rozwój szybkich metod na przełomie lat przedstawia się następująco:

1965-1975 – miniaturyzacja testów diagnostycznych,
1975-1985 – testy immunologiczne,
1985-1995 – sondy genetyczne i aplikacja PCR,
od 1995 r. – biosensory.

Poniżej krótko scharakteryzowano techniki stosowane obecnie najczęściej w laboratoriach oraz metody intensywnie rozwijające się w ostatnich latach.

2.1. Bioluminescencyjny pomiar ATP

Bioluminesencyjny pomiar ATP opiera się na reakcji enzymatycznego wysokoenergetycznego związku z udziałem ATP, występującego we wszystkich żywych komórkach. ATP – adenozynotrifosforan – jest przenośnikiem energii swobodnej w większości procesów metabolicznych w komórce, takich jak synteza biocząsteczek czy też ich transport. Podczas enzymatycznej hydrolizy ATP w obecności lucyferazy lub luminolu energia przekazywana tym związkom wyzwala reakcją świetlną [20]. Ilość emitowanych kwantów światła jest mierzona za pomocą aparatu zwanego luminometrem i wyrażona we względnych jednostkach świetlnych – RLU (*relative light unit*). Ilość kwantów światła jest proporcjonalna do zawartości ATP w badanej próbie.

Bioluminescencyjny pomiar ATP stanowi jedną z metod szybkiej oceny stanu mikrobiologicznego produktów spożywczych. Wykorzystanie tej metody

wciąż budzi kontrowersje ze względu na dużą liczbę czynników, które mogą zafałszować prawdziwy wynik zawartości ATP w próbie. Do najważniejszych czynników, wpływających na pomiar, należy homogenność próby, sposób jej przygotowania i przechowywania. Konieczna jest znajomość składu próby, jej pochodzenia i zawartości czynników, które mogą wpływać na ostateczny wynik [38]. Reakcja ATP z lucyferyną wymaga odpowiednich parametrów fizykochemicznych, takich jak: pH i temperatura [20].

Metoda bioluminescencyjnego pomiaru ATP jest bardzo przydatna przy kontroli stanu sanitarno-higienicznego powierzchni oraz skuteczności mycia i dezynfekcji urządzeń w przemyśle spożywczym. Największą zaletą tej metody jest krótki czas badania, zaledwie kilka minut. Oznaczenie jest bardzo proste i nie wymaga skomplikowanej procedury przygotowania próby. W przypadku stosowania pomiaru ATP do oceny stanu mikrobiologicznego produktów żywnościowych wymagane jest dodatkowo oddzielenie ATP drobnoustrojów od ATP pochodzenia organicznego. Niemniej jednak w literaturze opisano wykorzystanie tej metody do oceny zakażenia mikrobiologicznego takich produktów, jak: produkty mleczarskie [4], [14], [32], mięso i drób [3], [50], napoje gazowane [23], soki owocowe [15], [23], [36] i piwo [15], [23], [42].

Metoda bioluminescencji została także wykorzystana do specyficznej detekcji bakterii z grupy *coli* poprzez zastosowanie bakteriofagów specyficznych dla *Enterobacteriaceae* z wprowadzonym genem *lux*. Bakterie te są stosowane jako wskaźnik sanitarno-higieniczny w przemyśle spożywczym [28].

Zastosowanie bioluminescencyjnego pomiaru ATP pozwala również na prognozowanie rozwoju drobnoustrojów podczas procesu technologicznego, co jest szczególnie istotne przy wprowadzaniu systemu HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) [19], [25].

2.2. Pomiar impedancji

Aktywność biologiczną mikroorganizmów można monitorować poprzez zmiany impedancji hodowli w płynnej pożywce. Mikroorganizmy podczas wzrostu metabolizują substraty o małej przewodności do produktów o wysokiej przewodności, co w rezultacie powoduje zmianę oporu elektrycznego środowiska. Zmiany te są rejestrowane przez odpowiednie urządzenie i przedstawiane w postaci krzywej, podobnej do krzywej wzrostu bakterii. Stosując różne podłoża i warunki wzrostu, można uzyskać różny próg detekcji i otrzymać wyniki charakterystyczne dla określonej liczby poszczególnych grup mikroorganizmów [46].

Metoda ta wzbudza coraz większe zainteresowanie, ponieważ daje możliwość szybkiego oszacowania stopnia zanieczyszczenia żywności. Wiąże się jednak z koniecznością zakupu drogiej aparatury. Obecnie znane są trzy systemy oznaczania liczby mikroorganizmów, wykorzystujące pomiar impedancji: an-

gielskie Malthus i RABIT oraz amerykański Bactometer. Przy zastosowaniu tego typu aparatów można wykrywać i oznaczać ilościowo m.in. ogólną liczbę bakterii, liczbę pleśni i drożdży, pałeczki z grupy *coli*, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wynik otrzymywany jest już po 6-48 godzinach, w zależności od rodzaju mikroorganizmu i automatycznie interpretowany [12].

2.3. Metody mikroskopowe

Metody mikroskopowe umożliwiają prostą i szybką ocenę stanu mikrobiologicznego produktu, toteż są często wykorzystywane w przemyśle m.in. do oceny mleka, produktów mlecznych czy wody. Przykładem takiej metody jest bezpośrednia technika epifluorescencyjna (*direct epifluorescent filter technique* – DEFT).

Technika ta jest stosunkowo szybką i czułą metodą, stosowaną do określania liczby mikroorganizmów: bakterii, pleśni i drożdży. Polega na bezpośrednim liczeniu komórek pod mikroskopem po odpowiednim przygotowaniu badanej próbki. Próbka żywności poddawana jest wstępnemu trawieniu w celu zlizowania obecnych w niej komórek somatycznych i ułatwienia procesu filtracji. Najczęściej do tego celu wykorzystywane są trypsyna i Triton X-100. Przeprowadzona następnie filtracja przez filtr membranowy poliwęglanowy pozwala na skoncentrowanie komórek w badanym materiale, co poprawia jednocześnie czułość metody. Osadzone na powierzchni filtra drobnoustroje są wybarwiane fluoryzującym barwnikiem – oranżem akrydynowym, co umożliwia ich obserwację w świetle ultrafioletowym w mikroskopie fluorescencyjnym [22], [44], [45].

Dodatkową zaletą tej metody jest możliwość rozróżnienia w obrazie mikroskopowym komórek żywych i martwych, ponieważ zabarwienie komórek jest charakterystyczne dla danej fazy wzrostu mikroorganizmów. Z reguły komórki żywe barwią się na pomarańczowo do czerwonego, a komórki martwe na zielono. Najczęściej metodę tę wykorzystuje się do badania mleka, ale coraz częściej podejmowane są próby zastosowania DEFT do oceny mikrobiologicznej innych produktów żywnościowych, np. soków czy przetworów mięsnych. Metoda ta jest prosta, a koszt badania pojedynczej próbki niewysoki, jednak wymaga wyposażenia laboratorium w kosztowną aparaturę [30], [44], [49].

Mikroskopia epifluorescencyjna umożliwia również oznaczenie jakościowe, jeśli zastosowane zostaną przeciwciała znakowane fluorescencyjnie, wykrywające antygen na powierzchni komórki identyfikowanych bakterii. Metodę taką zastosowali Tortorello i Gendel (1993) w celu wykrycia bakterii *Escherichia coli* O157:H7 w mleku i soku owocowym, a Wang i Sharpe (1998) w mięsie.

2.4. Filtracja membranowa

Jedną z powszechniej stosowanych metod w kontroli jakości wody i innych produktów spożywczych jest filtracja membranowa. Technika filtracji membranowej polega na przefiltrowaniu odpowiedniej ilości próbki przez filtr o określonej wielkości porów, co umożliwia zatrzymanie mikroorganizmów na jej powierzchni. Filtry takie umieszcza się następnie na podłożu agarowym. Typowy obraz po inkubacji mikroorganizmów przedstawiony jest w postaci siatki z losowym rozkładem kolonii w poszczególnych „kwadracikach" [31]. Obecnie wiele firm, np. Millipore, oferuje zestawy do filtracji wraz z gotowymi podłożami, którymi nasącza się krążki bibułowe umieszczone na płytkach Petriego (tzw. *nutrient pad sets*).

Metoda filtracji membranowej jest metodą referencyjną do oznaczania liczby bakterii z grupy *coli*, liczby bakterii z grupy *coli* typu kałowego, liczby paciorkowców kałowych oraz bakterii z rodzaju *Salmonella* w wodzie [35]. Metodę tę wykorzystuje się również w badaniach innych produktów spożywczych, takich jak: piwo, woda mineralna, wino i farmaceutyki.

Możliwe jest także zastosowanie tej metody do selektywnego wykrywania bakterii, np. *Escherichia coli* O157. W tym przypadku stosuje się przeciwciała monoklonalne, znakowane peroksydazą chrzanową, a detekcji komórek dokonuje się na podstawie ich wybarwiania na kolor różowy. Metoda ta umożliwia wykrycie 10 komórek na gram próby bez konieczności selektywnego namnażania mikroorganizmu [1].

2.5. Testy chromogenne

W celu szybkiej identyfikacji bakterii stosuje się substraty enzymatyczne w postaci odwodnionej na specjalnych nośnikach. Pod wpływem dodanej zawiesiny bakterii substrat jest rozkładany przez enzymy, w wyniku czego powstaje barwny produkt bądź produkt, uzyskujący zabarwienie pod wpływem określonego odczynnika. Obecnie wiele firm oferuje zestawy złożone z wielu testów chromogennych, które umożliwiają dokonanie identyfikacji mikroorganizmów w krótkim czasie, nawet w ciągu 2-4 godzin [53]. Przykładem tego typu testów są manualne testy API lub automatyczne testy Vitek firmy BioMerieux. Testy API można przyrównać do zminiaturyzowanego szeregu biochemicznego. Na płytce z tworzywa sztucznego znajdują się mikroprobówki, zawierające zliofilizowane substraty do oceny reakcji biochemicznych. Przygotowaną zawiesinę bakterii posiewa się na podłoża w mikroprobówkach i inkubuje w określonych warunkach. Po inkubacji odczytuje się wyniki reakcji według załączonej instrukcji, a następnie w książce kodowej sprawdza ostateczny wynik, czyli określony gatunek bakterii.

Metody wykorzystujące substraty chromogenne charakteryzują się 95% czułością i swoistością, umożliwiają zidentyfikowanie drobnoustroju niekiedy już po 4 godzinach, a w większości analiz w ciągu 18-24 godzin. Reakcje biochemiczne są dobrze dobrane, a wyniki łatwe do odczytania i interpretacji. Ponieważ w testach wykorzystywane są reakcje katalizowane przez wytworzone już w komórce bakterii enzymy, z reguły nie są one zależne od fazy wzrostu bakterii. Poza tym reakcje nie są wrażliwe na wpływy otoczenia. Metody te mają pewne ograniczenia, m.in. aktywność enzymów może być różna u poszczególnych szczepów należących do tego samego gatunku, niekiedy też na wynik wpływać faza wzrostu bakterii bądź rodzaj podłoża hodowlanego. Czułość reakcji może być ograniczona, jeśli są to reakcje katalizowane przez enzymy wewnątrzkomórkowe. W takim przypadku szybkość reakcji będzie uzależniona od wielkości inoculum [53].

2.6. PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy

Metoda PCR pozwala na szybką i selektywną detekcję oraz identyfikację mikroorganizmów poprzez amplifikację specyficznego fragmentu genu. Reakcja polega na wielokrotnym powtarzaniu cyklu, składającego się z trzech etapów: denaturacji dwuniciowego DNA, przyłączania starterów do pojedynczych nici DNA i syntezy komplementarnego łańcucha DNA za pomocą termostabilnej polimerazy. W rezultacie ilość DNA zostaje zwielokrotniona i może być łatwo zidentyfikowana metodą elektroforezy na żelu agarozowym. Wzrost czułości metody można uzyskać, stosując dodatkowo hybrydyzację ze specyficzną sondą DNA [2], [39].

Reakcja PCR jest szeroko wykorzystywana w biologii molekularnej i diagnostyce medycznej [17], a w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie tą techniką jako metodą detekcji i identyfikacji mikroorganizmów patogennych w żywności [39]. Niewątpliwymi zaletami PCR są specyficzność i czułość. Specyficzność wynika z faktu, że amplifikowany jest fragment genu o unikatowej sekwencji, charakterystycznej dla danego mikroorganizmu. Z reguły są to określone sekwencje genów, kodujących czynnik wirulencji danego drobnoustroju, np. toksynę [8], [11], [21]. Metoda PCR charakteryzuje się także dużą czułością, ponieważ teoretycznie wystarczy jedna kopia genu w probówce reakcyjnej do zajścia reakcji amplifikacji.

Oznaczanie drobnoustrojów tą metodą jest bardzo skuteczne w przypadku czystych kultur, jednak czułość metody spada w przypadku zastosowania PCR bezpośrednio do próbek żywności [48]. Przykładowo, bakterie *Listeria monocytogenes* są wykrywane w czystej kulturze już przy liczebności 1-10 komórek/cm^3, podczas gdy w różnych typach serów bakteria ta wykrywana jest dopiero przy poziomie 10^6 komórek/cm^3 [16]. Głównym problemem, występującym

podczas stosowania PCR w żywności, jest obecność związków hamujących reakcję PCR, co może dawać fałszywie negatywne wyniki. Inhibicja reakcji może być spowodowana denaturacją polimerazy DNA, degradacją DNA i starterów przez nukleazy bądź wiązaniem jonów Mg^{2+} niezbędnych do zajścia reakcji. Wadą bezpośredniej metody PCR jest także brak rozróżnienia pomiędzy komórkami żywymi i martwymi, co z kolei może dawać fałszywie pozytywne wyniki. Rozwiązaniem może być w tym wypadku przednamnożenie próbki [33], [34]. Możliwe jest zastosowanie modyfikacji reakcji PCR, polegającej na analizie informacyjnego RNA (mRNA), który rozpada się znacznie szybciej po obumarciu komórki niż DNA, tak więc jest obecny tylko w komórkach żywych. W metodzie tej mRNA jest przekształcany w komplementarny DNA za pomocą odwrotnej transkryptazy. Jednak izolacja i detekcja RNA w porównaniu z detekcją DNA jest metodą trudniejszą pod względem technicznym i mniej czułą [18].

2.7. Sondy genetyczne

Sondy DNA to krótkie znakowane fragmenty kwasu nukleinowego, tworzące hybrydy (pary) z komplementarnymi sekwencjami DNA lub RNA, wyizolowanymi z mikroorganizmów bądź obecnymi wewnątrz komórek. Wyróżnia się sondy o swoistości szczepowej, gatunkowej czy rodzajowej [52].

Sondy mogą być produkowane przez klonowanie lub amplifikację określonej sekwencji DNA na drodze enzymatycznej, a także na drodze syntezy chemicznej. Aby zwiększyć czułość detekcji i ułatwić prace diagnostyczne, sondy są znakowane różnego rodzaju znacznikami. Dotychczas najczęściej stosowano radioaktywne izotopy, obecnie coraz częściej do znakowania stosuje się związki nieradioaktywne, takie jak digoksygenina czy biotyna, które są bezpieczne w użyciu i mogą być przechowywane dłuższy czas [39]. Sondy nieradioaktywne mogą być znakowane pośrednio lub bezpośrednio. Sondy znakowane metodą pośrednią zawierają ligand, który podczas detekcji hybrydyzacji jest rozpoznawany przez przeciwciało skoniugowane z enzymem. W rezultacie powstaje barwny produkt bądź reakcji towarzyszy zjawisko chemiluminescencji. W metodzie znakowania bezpośredniego wykorzystywane są znaczniki fluorescencyjne [52].

Przy detekcji i identyfikacji mikroorganizmów za pomocą sond wykorzystuje się dwie metody: hybrydyzację kolonijną i hybrydyzację izolowanego DNA. W przypadku hybrydyzacji kolonijnej konieczna jest na wstępie hodowla kolonii na odpowiedniej pożywce. Następnie powierzchnia pożywki z wyrośniętymi koloniami jest odcinana i przenoszona na sączek z membraną nitrocelulozową. W kolejnym etapie komórki kolonii poddawane są lizie metodą chemiczną lub enzymatyczną w celu uwolnienia DNA. Przed rozpoczęciem hybrydyzacji konieczne jest przeprowadzenie denaturacji DNA w celu rozplecenia podwójnego

łańcucha, tak aby sonda mogła przyłączyć się do komplementarnej sekwencji. Metoda hybrydyzacji bezpośrednio izolowanego DNA jest prostsza i szybsza, ponieważ polega na jednostopniowej izolacji i oczyszczaniu DNA z pobranej próby, z pominięciem etapu hodowli komórek. Metoda ta jednak wymaga dostępności dużych próbek biomasy komórkowej [3], [27], [40], 41].

W ostatnich latach coraz częściej obok sond DNA stosuje się sondy komplementarne do fragmentów genów kodujących rybosomalny RNA [37].

2.8. Testy serologiczne

Metody immunochemiczne, wykorzystujące przeciwciała, znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in. do detekcji mikroorganizmów patogennych, takich jak wirusy, bakterie i pleśnie. Bardzo często metodę tę stosuje się do wykrywania toksyn wytwarzanych przez mikroorganizmy. Specyficzność testów immunochemicznych zależy od specyficzności zastosowanego przeciwciała. Mogą to być przeciwciała monoklonalne, poliklonalne lub rekombinowane.

Wykrywanie patogenów przeprowadza się najczęściej za pomocą testów ELISA (*enzyme – linked immunosorbent assay*). Jest kilka odmian tej metody, ale zasadniczo wykorzystuje ona reakcję swoistego przeciwciała z antygenem obecnym w badanej próbce. W metodzie bezpośredniej powstały kompleks antygen–przeciwciało wiąże się następnie z enzymem, który powoduje przekształcenie dodanego w kolejnym etapie substratu w barwny produkt. W tzw. metodzie kanapkowej przed reakcją z enzymem kompleks antygen–przeciwciało jest wiązany najpierw z drugim przeciwciałem, które rozpoznaje powstały kompleks i służy do detekcji. Pomiędzy kolejnymi etapami mikropłytki, na których przeprowadzana jest analiza, przemywa się, aby usunąć niezwiązane przeciwciała [7], [53].

Limit wykrywalności przy użyciu testów ELISA wynosi około 10^4 do 10^6 jtk/ml, dlatego przy małej liczbie komórek konieczne jest przednamnożenie próbki. Szereg firm oferuje zestawy do detekcji mikroorganizmów za pomocą testów serologicznych ELISA. Obecnie w ten sposób można wykrywać takie mikroorganizmy, jak: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157, *Campylobacter*.

Test ELISA stosowany jest także w połączeniu z reakcją PCR do wykrywania produktów reakcji, co poprawia czułość metody nawet stukrotnie w porównaniu z konwencjonalną elektroforezą żelową [13].

2.9. Biosensory

W ostatnich latach nastąpił duży rozwój badań nad biosensorami, postrzeganymi nawet jako tzw. technologia przyszłości [7]. Biosensory to urządzenia analitycz-

ne, które łączą w sobie dwa zasadnicze elementy. Jednym z nich jest biologiczny receptor, a drugim system przetwarzania sygnału. Bioreceptorami mogą być enzymy, przeciwciała, kwasy nukleinowe, mikroorganizmy, komórki bądź tkanki. W wyniku biospecyficznej interakcji, np. przeciwciało/antygen, kwas nukleinowy/komplementarna sekwencja, enzym/substrat, powstaje sygnał, który trafia do przetwornika. Przetwornikiem może być elektroda, włókna optyczne, kryształy piezoelektryczne. W zależności od metody transdukcji sygnału biosensory dzieli się na kilka grup: elektrochemiczne, optyczne, termometryczne, piezoelektryczne i magnetyczne [6], [47].

W literaturze opisano szereg przykładów biosensorów przeznaczonych do detekcji mikroorganizmów patogennych w żywności, chociaż większość opisanych badań dotyczy tylko skali laboratoryjnej. Ye i in. [51] opisali biosensor piezoelektryczny do wykrywania bakterii *Salmonella*, wykorzystujący przeciwciało immobilizowane na złotej elektrodzie, połączone z powierzchnią kryształu kwarcowego. Biosensor wykrywał bakterie *Salmonella typhimurium* przy liczebności komórek od $5{,}3 \times 10^5$ do $1{,}2 \times 10^9$ w ciągu 25 minut. Biosensory elektrochemiczne w połączeniu z magnetyczną separacją komórek zastosowano do wykrywania bakterii *Salmonella* [9] oraz *Escherichia coli* [29]. Analiza trwała krócej niż 2 godziny, a próg wykrywalności wynosił $5{\times}10^3$ komórek/cm^3 w przypadku bakterii *Salmonella* i 10^5 komórek/cm^3 w przypadku *Escherichia coli*. Ostatnio obserwuje się coraz większe zainteresowanie biosensorami, wykorzystującymi sondy genetyczne jako bioreceptory [26], 43].

Biosensory stanowią wysoce specyficzne, szybkie i proste w użyciu urządzenia analityczne. Jednak jak dotąd niewiele z nich odgrywa istotną rolę w przemyśle spożywczym czy innych dziedzinach, takich jak diagnostyka medyczna. Przejście od badań laboratoryjnych do skali przemysłowej jest utrudnione. Wynika to m.in. z konieczności opracowania metody produkcji niedrogiego i wiarygodnego sensora, który zapewni stabilne i czułe oznaczenie. Problemy związane są także z metodą kalibracji, stabilnością i przechowywaniem oraz całkowitą integracją systemu detekcji [47].

Podsumowanie

Duża liczba zatruć pokarmowych każdego roku na świecie, liczne przypadki śmiertelne i jednoczesny znaczny odsetek chorób o niezidentyfikowanej przyczynie to wystarczające powody do ciągłego rozwoju badań nad nowymi metodami wykrywania patogenów. Szybkie metody oferują pod tym względem wiele korzyści: krótki czas analizy i łatwość oznaczenia, czułość, specyficzność, często automatyzację. Dzięki temu laboratoria mogą badać więcej próbek w tym samym czasie, znacznie szybciej uzyskując wynik, niż miałoby to miejsce

w przypadku metod konwencjonalnych. Jednak jak dotąd nie jest możliwe całkowite zastąpienie metod tradycyjnych szybkimi testami. Przede wszystkim większość szybkich metod pozwala albo na oznaczenie ilościowe, albo jakościowe, a ponadto, zgodnie z wymogami, konieczne jest potwierdzenie wyniku pozytywnego przez analizę metodami konwencjonalnymi.

Bibliografia

[1] Adamczak M., Bednarski W., Kowalska A., *Szybkie testy biologiczne szansą poprawy i standaryzacji jakości żywności*, Przemysł Spożywczy 6, 1999, s. 36-39.

[2] Allmann M., Hofelein C., Koppel E., Luthy J., Meyer R., Niederhauser C., Wegmuller B., Candrian U., *Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products*, Res. Microbiol. 146, 1995, s. 85-97.

[3] Bautista D.A., Clarke R., Vaillancourt J.P., Renwick S., Griffith M.W., *Adenosine triphosphate bioluminesce as a method to determine microbial levels in scald and chill tanks at a poultry abattoir*, Poultry Sci. 73, 1994, s. 1673-1678.

[4] Bautista D.A., McIntyre L., Laleye L., Griffith M.W., *The application of ATP bioluminescense for the assessment of milk quality and factory hygiene*, J. Rapid Methods Automat. Microbiol. 1, 1992, s. 179-193.

[5] Betzl D., Ludwig W., Schleifer K.H., *Identification of lactococci and enterococci by colony hybridisation with 23S rRNA – targeted oligonuclease probes*, Appl. Environ. Microbiol. 52, 1990, s. 1190-1194.

[6] Bishop B.F., Lorbert S.J., *The needs for sensors in bacterial and yeast fermentation*, Bioprocess. Technol. 6, 1990, s. 1-16.

[7] Blankenfeld-Enkvist G. von, Brännback M., *Technological trends and needs in food diagnostics*, Tekes, National Technology Agency, Technology Review 132, 2002.

[8] Bulte M., *Dot blot – Verfahren mit Digoxigenin – markierten Gensonden zum Nachwels von verotoxinogen E.coli – Stammen (VTEC) in Verdunnungskulturen und Lebensmittelproben*, Archiv für Lebensmittelhygiene 42, 1991, s. 77-100.

[9] Che Y.H., Yang Z.P., Li Y.B., Paul D., Slavik M., *Rapid detection of Salmonella typhimurium using an immunoelectrochemical method coupled with immunomagnetic separation*, J. Rapid Methods Automat. Microbiol. 7 (1), 1999, s. 47-59.

[10] Doyle M.P., *Reducing foodborne disease: what are priorities?*, Nutrition 16 (7/8), 2000.

[11] Fach P., Hauser D., Guillou J.P., Popoff M.R., *Polymerase chain reaction for the rapid identification of Clostridium botulinum type A strains and detection in food samples*, J. Appl. Bacteriol. 61,1993, s. 389-392.

[12] Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J., *Use of the Malthus conductance growth analyser to determine numbers of thermophilic streptococci on stainless steel*, J. Appl. Microbiol. 1997.

[13] Ge B., Zhao S., Hall R., Meng J., *A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin – producing Escherichia coli*, Microbes and Infection 4, 2002, s. 285-290.

[14] Griffith M.W., *Rapid estimation of microbial numbers in dairy products using ATP technology*, w: *Physical methods for microorganisms detection*, ed. W.H., Nelson, CRC Press, Boca Raton 1991, s. 29-62.

[15] Griffith M.W., *The role of ATP bioluminescence in food industry*: *New light on old problem*, Food Technol. 6, 1996, s. 62-71.

[16] Herman L.M.F., De Ridder H., *Cheese components reduce the sensitivity of detection of Listeria monocytogenes by the polymerase chain reaction*, Neth. Milk Dairy J. 47, 1993, s. 23-29.

[17] Jones D.D., Bej A.K., *Detection of foodborne microbial pathogens using polymerase chain reaction methods*, w: *PCR technology*: *Current innovations*, eds H.G. Griffin, A.M. Griffin, CRC Press Inc., London 1994, s. 341-365.

[18] Josephson K.L., Gerba C.P., Pepper I.L., *Polymerase chain reaction of nonviable bacterial pathogens*, Appl. Environ. Microbiol. 59, 1993, s. 3513-3515.

[19] Kircher D., Buelte M., Reuter G., *Suitability of a bioluminescence method for examination, cleaning and disinfection in food processing*, Fleischwirtschaft 76, 1996, s. 897-903.

[20] Klegerman M.E., *Automated microbial identification and quantification*, w: *Technologies for the 2000s*, ed. W.P. Olson, Interpharm Press, Buffalo Grove 1996, s. 259-279.

[21] Koch W.H., Payne W.L., Wentz B.A., Cebula T.A., *Rapid polymerase chain reaction method for detection of Vibrio cholerae in foods*, Appl. Environ. Microbiol. 59, 1993, s. 556-560.

[22] Kroll R., *The direct immunofluorescent filter technique* (*DIFT*) w: *Methods in molecular biology*, vol. 46: *Diagnostic bacteriology protocols*, eds J. Howard, D.M. Whitcombe, 1995, s. 107-112.

[23] Kyriakides A.L., Patel P.D., *Luminescence techniques for microbial analysis of food*, w: *Rapid analysis techniques for microbiology*, ed. P. Patel, Blackie Academic and Professional Press, Glasgow, UK, 1994, s. 196-231.

[24] Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., Quinn J., Chakraborty T., O'Kennedy R., *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water*, Enz. Microbial Technol. 32, 2003, s. 3-13.

[25] Michalski M., *Zastosowanie HY-LITE w monitoringu w ramach systemu HACCP*, Przemysł Spożywczy 6, 1999, s. 23-25.

[26] Olsen J.E., *DNA – based methods for detection of foodborne bacterial pathogens*, Food Res. Int. 33 (3-4), 2000, s. 257-266.

[27] Olsen J.E., Aabo S., Nielsen E.O., Nielsen B.B., *Isolation of a Salmonella specific DNA hybridization probe*, APMIS 99, 1991, s. 114-120.

[28] Olsen O., *Rapid food microbiolgy: Application of bioluminescence in the dairy and food industry – a review*, w: *Physical methods for microorganisms detection*, ed. W.H. Nelson, CRC Press, Boca Raton 1991, s. 68-80.

[29] Perez F.G., Mascini M., Tothill I.E., Turner A.P., *Immunomagnetic separation with mediated flow injection analysis amperometric detection of viable Escherichia coli O157*, Anal. Chem. 70 (11), 1998, s. 2380-2386.

[30] Pettipher G.L., Mansell R., McKinnon C.H., Cousins C.M., *Rapid membrane filtration – epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk*, Appl. Environ. Microbiol. 39 (2), 1980, s. 423-429.

[31] Pytlik G., Nierychlewski B., Mueller P., *Zastosowanie technik filtracji membranowej w kontroli mikrobiologicznej wody*, Aparatura Badawcza i Dydaktyczna 8 (2), 2003, s. 205-209.

[32] Reybroeck W., Schramm E., *Improved filtration method to assess bacteriological quality of raw milk based on bioluminescence of adenosine triphosphate*, Neth Milk Dairy J. 49, 1995, s. 1-14.

[33] Rossen L., Holmstrom K., Olsen J.E., Rasmussen O.F., *A rapid polymerase chain reaction (PCR) – based assay for the identification of Listeria monocytogenes in food samples*, Int. J. Food Microbiol. 14, 1991, s. 145-152.

[34] Rossen L., Norskov P., Holmstrom K., Rasmussen O.F., *Inhibition of PRC by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA – extraction solutions*, Int. J. Food Microbiol. 17, 1992, s. 37-45.

[35] Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r., DzU z 2002 r., nr 204, poz. 1728.

[36] Ryan R.A., *Bioluminescence testing of aseptically packaged fruit juice*, Milk Ind. Int. 98, 1996, s. 13-15.

[37] Salama M.S., Sandine W.E., Giovannoni S.J., *Isolation of Lactococcus lactis subsp. cremoris from nature by colony hybridization with rRNA probes*, Appl. Environ. Microbiol. 59, 1993, s. 3941-3945.

[38] Sala-Newby G.B., Goodfield G., Johnson I.R., Massey P.G., Stadford D.A., Hampton A.N., Campbell A.K., *Ultra-sensitive detection of microbes by ATP analysis*, w: *ATP luminescence rapid methods in microbiology*, eds P.E. Stanley, B.J. McCarthy, R. Smither, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1989, s. 261--270.

[39] Scheu P.M., Berghof K., Stahl U., *Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction*, Food Microbiol. 15, 1998, s. 13-31.

[40] Schmidthuber S., Ludwig W., Schleifer K.H., *Construction of a DNA probe for the specific identification of Streptococcus oralis*, J. Clin. Microbiol. 26, 1988, s. 1042--1044.

[41] Scholl D.R., Kaufmann C., Jollick J.D., York C., Goodrum G.R., Charche P., *Clinical application of novel sample processing technology for the identification of salmonellae by using DNA probes*, J. Clin. Microbiol. 28, 1990, s. 237-241.

[42] Simpson W.J., *'Instant' assessment of brewery hygiene using ATP bioluminescence*, Brewers' Guardian 10, 1989, s. 20-22.

[43] Smith T.J., O'Connor L., Glennon M., Maher M., *Molecular diagnostic in food safety: Rapid detection of foodborne pathogens*, Irieh J. Agric. Food Res. 39 (2), 2000, s. 309-319.

[44] Tortorello M.L., Gendel S.M., *Fluorescent antibodies applied to direct epifluorescent filter technique for microscopic enumeration of Escherichia coli O157:H7 in milk and juice*, J. Food Protect. 56, 1993, s. 672-677.

[45] Tortorello M.L., Stewart D.S., *Antibody – direct epifluorescent filter technique for rapid, direct enumeration of Escherichia coli O157:H7 in beef*, Appl. Environ. Microbiol. 60, 1994, s. 3553-3559.

[46] Ur A., Brown D.F., *Impedance monitoring of bacterial activity*, J. Med. Microbiol. 8 (1), 1975, s. 19-28.
[47] Velasco-Garcia M.N., Mottram T., *Biosensor technology addressing agricultural problems*, Biosystems Engineering 84 (1), 2003, s. 1-12.
[48] Wang H., Sharpe A.N., *An immuno-capturing and concentrating procedure for Escherichia coli O157:H7 and its detection by epifluorescent microscopy*, Food Microbiol. 15, 1998, s. 559-565.
[49] Way J.S., Josephson K.L., Pillai S.D., Abbaszadegan M., Gerba C.P., Pepper I.L., *Specific detection of Salmonella spp. by multiplex polymerase chain reaction*, Appl. Environ. Microbiol. 59, 1993, s. 1473-1479.
[50] Werlein H.D., Fricke R., *ATP bioluminescence for rapid determination of the quality of poultry meat*, Archiv für Geflügelkunde 60, 1996, s. 212-217.
[51] Ye J., Letcher S.V., Rand A.G., *Piezoelectric biosensor for detection of Salmonella typhimurium*, J. Food Sci. 62 (5), 1997, s. 1067-1071.
[52] Zakrzewska-Czerwińska J., *Sondy molekularne w diagnostyce mikrobiologicznej*, Biotechnologia 4 (59), 2002, s. 79-89.
[53] Zaremba M.L., Borowski J., *Podstawy mikrobiologii lekarskiej*, PZWL, Warszawa 1994, s. 47-49.

METHODS OF DETECTING PATHOGENIC MICROORGANISMS IN FOOD

Summary

There are millions of food poisoning cases in the world every year and a significant part of them ends in death. This is a problem for both the poorly and highly developed countries. Most frequently the poisoning is caused by such bacteria as *Campylobacter, Salmonella, Clostridium* and *Staphylococcus*, but many illnesses are of unknown etiology. In order to ensure food safety it is necessary to detect quickly and precisely the microorganisms responsible for food poisoning. This can be done thanks to new analytical techniques which have dynamically developed over the last few years. The paper is a review of the currently applied methods to detect and identify pathogenic microorganisms in food. The authors present a series of hygiene related technological procedures, such as: bioluminescence measurement of ATP, measurement of impedance, microscopic methods or membrane filtration. In order to ensure fast selective detection and identification of pathogenic organisms, a wider and wider use is made of polymerization chain reaction (PCR), genetic probes, chromogen and serologic tests as well as biosensors. However, conventional microbiological methods which, in contrast to majority of fast methods, render both quantitative and qualitative results, are still treated as reference methods.

Tłum. *Ewa Kotkowska*