

해양 유래의 병원성 미생물 검출방법: 분류 및 요약

Detecting Techniques for Marine-derived Pathogens: Grouping and Summary

황병희¹, 차형준^{2*}

Byeong Hee Hwang¹, Hyung Joon Cha^{2*}

^{1,2}포항공과대학교 화학공학과, 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 790-784, 대한민국

^{1,2}Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Republic of Korea

(2014년 6월 16일 접수, 2014년 6월 30일 수정, 2014년 6월 30일 채택)

Abstract Marine-derived pathogens threaten health and life of human and animals. Therefore, rapid and specific detection methods need to be developed. Here, we summarized various groups of detection methods, including conventional method, flow cytometry, nucleic acid-based method, and protein-based method. In addition, perspective of detection technique was discussed as a unified detection system for pathogens.

Keywords : Detection technique, Marine pathogen

서론

병원성 미생물들은 인간과 동물 그리고 농작물의 건강에 커다란 위협을 가하며 막심한 피해를 입히고 있다. 미국에서 발생한 탄저균에 의한 생화학 테러나 최근 대한민국에서 자주 발생하는 식중독 사례 등의 예에서 볼 수 있듯이 병원성 미생물에 의한 감염은 우리 생활의 아주 밀접한 곳에서 일어나고 있다. 대한민국 통계청의 식품 유래의 병원성 미생물에 의한 식중독 피해를 살펴보면 증가와 감소가 반복되면서 꾸준히 증가하는 경향을 볼 수 있다 (Fig. 1) [1]. 이러한 결과는 대한민국에서 병원성 미생물에 의한 피해가 상당 규모에 이르며 국민들의 안전한 먹거리 확보를 위해 이를 신속히 진단 및 검출하고 예방해야 할 필요성을 잘 보여준다. 식중독의 경

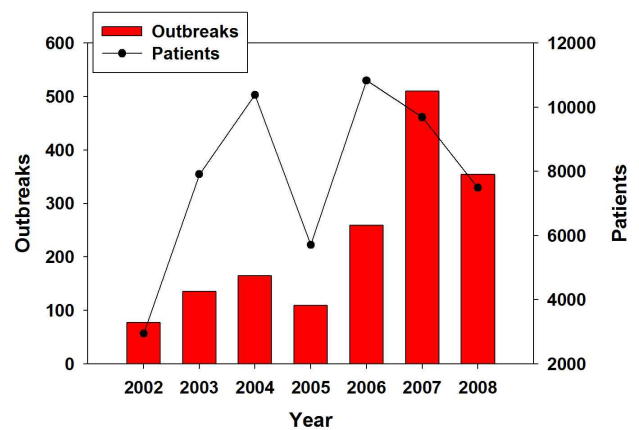


Figure 1. The statistics of Korean Foodborne Outbreaks [1].

우 해양으로부터 유래한 병원성 미생물에 의한 감염이 약 40%에 이르며 이는 검출 방법의 미비로 인하여 병원성 미생물의 원인을 알 수 없는 경우까지 포

* Corresponding author
Phone: +82-54-279-2280 Fax: +82-54-279-5528
E-mail: hjcha@postech.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

합한다면 상당히 높은 비중을 차지한다 [1]. 또한 비브리오 패혈증과 같이 인간의 생명을 위협하는 병원성 미생물에 의한 감염도 해양에서 유래한 병원성 미생물(Vibrio vulnificus)에 의한 것이다. 이러한 해양 유래를 포함한 병원성 미생물에 대한 검출방법은 지난 2-30년간 급속도로 발전해 왔으며 앞으로도 인류의 안전하고 건강한 생활을 위해 꾸준한 발전이 필요하다.

그러므로 이 총설에서는 지금까지 발전되어 온 병원성 미생물에 대한 검출 방법들을 정리 요약하여 앞으로 기술 발전 방향에 대해서 모색해 보고자 한다. Fig. 2는 병원성 미생물의 검출 방법의 발전 방향을 나타낸 모식도이다. 화살표의 방향은 시간의 흐름에 따른 검출방법의 발전이나 변화를 나타낸 것이다. 각각의 방법들은 병원성 미생물들의 특이적인 성질들을 검출원리로 활용하였다. 현미경을 통한 형태학적인 특성을 이용한 분석, 분자생물학적인 특성에 따라 핵산이나 단백질을 이용한 검출 원리 뿐만 아니라 기타의 검출 원리와 기술들을 활용하거나 통합적인 검출 원리를 이용하는 장치에 대하여 소개하고자 한다.

본 론

기존 검출 방법(Conventional method)

고전적 검출 방법은 현미경의 발명과 미생물의 배양법이 발전된 이후 100년 넘게 현재까지도 식품공전에 기록되어 표준(gold-standard)으로 사용하고 있다. 현미경 이외의 특별한 장치가 필요하지 않고, 병원성 미생물을 선택배지에서 배양하고 간단한 반응을 시킨 후에 관찰하는 등의 간편함 때문에 아직까지 널리 사용되고 있다. 현미경을 이용하여 여러 병원성 미생물들을 관찰하여 세포의 모양이나 형태학적인 특성, 간단한 생화학적인 특성 등을 검출원리로 이용하여 병원성 미생물을 검출한다 [2].

그러나 이 방법은 여러 단점들이 존재한다. 아직까지 수많은 병원성 미생물들이 배양되지 않고 있기 때문에 배양되지 않는 병원성 미생물들은 검출할 수 없다. 또한 배양시간에 따라서 검출 시간이 결정되기 때문에 배양이 오래 걸리는 병원성 미생물에 대해서는 검출에 많은 시간이 소요된다. 그리고 형태학적인 특성을 주로 관찰하여 구분하기 때문에 살모넬라균과 같이 수천 종의 아종이 존재하는 병원성 미생물에 대하여 완전한 검출은 불가능하다. 마지막으로 배양된 후에는 초기에 존재하였던 병원성 미생물의 양을 정량적으로 분석하기는 어렵고 정성분석에 치우쳐 있다. 그러므로 이러한 기존 검출 방법의 단점을 보완하기 위해 새로운 검출원리와 기술들을 이용한 검출 방법들이 개발되어 왔다.

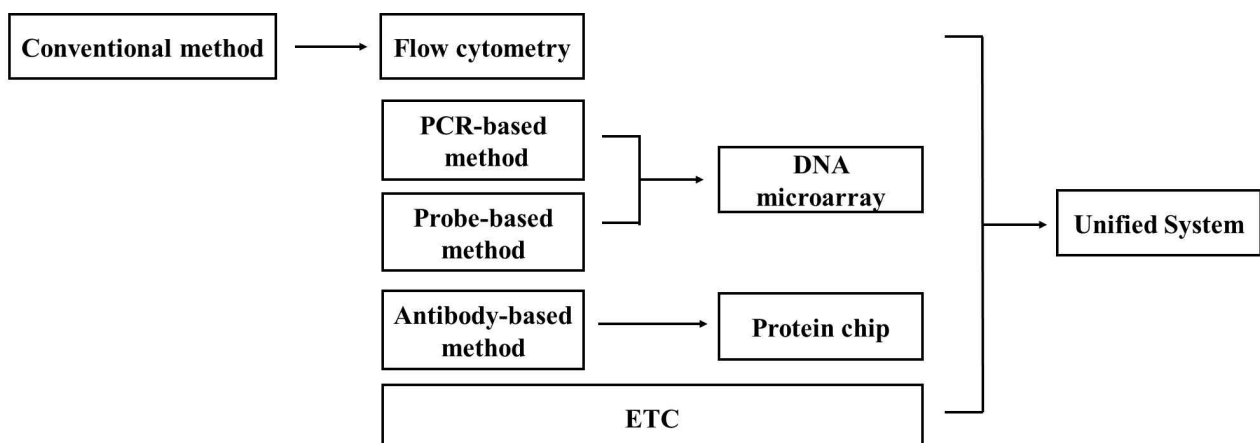


Figure 2. Technical flowcharts for marine-derived pathogen detection.

유세포 분석기(Flow cytometry)

유세포 분석법은 흐르는 유체에서 지나가는 고체물질을 셀 수 있는 유세포 분석기를 이용하여 액체시료에서 직접 병원성 미생물의 개수를 확인할 수 있다 [3]. 하지만 단순히 유세포 분석기만을 이용하여 병원성 미생물을 관측할 수는 없으므로 염색법을 동시에 사용하여 활성이 있는 병원성 미생물의 숫자를 관측하거나 현미경과 카메라를 접합하여 직접 모양을 관측하는 것이 가능하다. 거기에 추가로 무선 인터넷을 연결하여 자료를 수신 받으면 원거리 실시간 병원성 미생물의 검출이 가능하다.

이러한 특징들은 앞서 언급한 기존 검출 방법에서 배양이 필요하다는 단점을 극복하고, 배양이 필요 없으므로 시간상으로도 굉장히 단축되며 병원성 미생물을 사람이 접촉하지 않고, 간접적으로 관찰하는 것이 가능하다는 여러 장점을 지니고 있다. 그리고 숫자를 헤아릴 수 있기 때문에 정량적인 분석에 응용할 수도 있다. 그러나 이 방법은 액체 시료에 대해서만 적용될 수 있으며 검출 원리가 기존 검출방법과 동일하게 병원성 미생물의 형태학적인 특성을 관찰하는 것이기 때문에 여전히 아종까지의 완전한 검출은 불가능하다고 할 수 있다.

핵산 기반 검출방법

지금부터는 병원성 미생물의 분자생물학적인 특성을 검출원리로 이용하는 방법 중에서 핵산을 이용하는 방법들에 대해서 설명하겠다. 핵산을 이용하여 병원성 미생물을 검출하는 방법은 크게 두 가지이고, 그 중에 한 종류가 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 이용하는 방법이고, 다른 하나는 핵산 탐침(nucleic acid probe)을 이용하는 방법이다.

먼저 중합효소연쇄반응을 이용하는 검출 방법을 알아보자. 중합효소연쇄반응은 적은 양의 DNA시료를 아주 많은 양으로 증폭하는 방법이다. 주로 사용하는 중합효소연쇄반응 방법은 2개

의 primer를 이용하여 DNA시료 중에서 한 부분만을 크게 증폭하는 방법이며 반응 횟수가 30회이면 DNA의 양은 이론적으로 2^{30} 배로 증가한다. 이렇게 증폭된 DNA 단편을 아가로스겔 전기영동법을 이용하여 DNA의 밴드의 유무나 혹은 길이를 이용하여 병원성 미생물을 판별하는 기준으로 사용한다.

중합효소연쇄반응을 이용하는 방법의 종류에는 여러 종류의 프라이머들을 넣어서 동시에 여러 단편의 DNA 조각들을 증폭하는 다중 중합효소연쇄반응 [4]과 실시간으로 증폭되는 양을 관찰할 수 있는 실시간 중합효소연쇄반응 [5], 특정 RNA 서열만을 증폭해서 해양유래 바이러스를 검출하는 역전사효소 중합효소연쇄반응 [6] 등의 여러 가지 종류가 있고 이는 각각의 특성에 따라 병원성 미생물을 검출하는 방법으로 발전하고 있다. 또한, 중합효소연쇄반응과 제한효소 단편길이 다형성 (restriction fragment length polymorphism)을 병행하는 경우 아가로그젤 전기영동법을 통해 특정 병원성 미생물을 아종까지 구분하는데 이용될 수 있다 [7].

이 방법은 배양 과정을 생략할 수 있기 때문에 적은 양의 병원성 미생물도 쉽고 빠르게 검출할 수 있다. 그리고 분자생물학적인 측면에서 병원성 미생물을 검출하기 때문에 방법상의 특이성에 의해서 아종까지도 검출할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그리고 실시간 중합효소연쇄반응을 이용하여 정량적인 분석이 가능하다. 그러나 이 방법은 DNA 시료를 추출하는 방법의 발전이 선행되어야 하며 보통 한 반응으로 한 병원성 미생물을 검출할 수 있다. 그러므로 검출해야 하는 병원성 미생물의 종류와 샘플이 많아질수록 반응의 숫자도 크게 증가하여 시간과 비용이 증가한다는 단점이 있다.

핵산 탐침을 이용하는 방법에 대해서 살펴보자. 이 방법은 특정 병원성 미생물에만 특정하게 왓슨 클릭 상호작용에 의한 혼성화 반응을 일으키는 DNA나 RNA 탐침을 만들고 이를 이용하여 병원성 미생물을 검출하는 것이다. 여기에서 사

용하는 핵산 탐침세포막을 통과하는 등의 이동이 용이하도록 올리고핵산을 사용하며 관측을 용이하게 하기 위해서 형광물질이나 방사선 물질로 표지된 것을 주로 이용한다.

핵산 탐침을 이용하는 방법의 발전은 fluorescent in-situ hybridization(FISH)와 같은 검출 방법과 함께 발전하였다 [8]. 이 방법은 자연상태나 배양 중인 세포를 투과가 가능하게 하여 올리고핵산을 침투하게 한 후에 16S rRNA에 직접적으로 결합할 수 있도록 하면 형광현미경 하에서 관측하면 세포 내에서 균일하게 퍼진 모양이 관측된다.

이 방법은 역시 배양을 하지 않아도 되는 점으로 인해 빠른 결과를 보여주고, 올리고탐침이 특정 염기서열에만 혼성화반응이 일어나기 때문에 높은 특이성을 보여준다. 정량적인 분석에는 적합하지 않다. 형광 물질에 따라서 여러 핵산 탐침을 동시에 사용할 수는 있겠으나 역시 기본적으로 한 실험에서는 한 가지 병원성 미생물을 검출하는 실험이기 때문에 샘플이 많아질수록 시간과 돈이 많이 들게 되는 것이 단점이다.

위에서 언급한 단점을 극복하기 위해서 개발된 기술이 바로 DNA 마이크로어레이(microarray)이다. DNA 마이크로어레이는 앞에서 언급한 중합효소연쇄반응에 의한 핵산 증폭법과 핵산 탐침을 이용한 혼성화 반응의 장점을 모아 결합한 개념의 검출방법이다. 고체의 지지대에 특이적 탐침들을 집적시켜 놓은 후 핵산 증폭에 의해 샘플을 증폭, 염색하여 혼성화 반응을 수행한 후에 결과를 스캔하고 이미지 분석을 통해서 정량적인 실험 결과를 얻는 일련의 실험과정을 수행한다 [9].

한 번의 실험으로 여러 병원성 미생물을 동시에 검출할 수 있기 때문에 검출효율이 뛰어나고, 실험의 결과가 특정스팟의 형광세기를 이용하여 상대적인 정량분석에도 활용이 가능하다 [10]. 그러나 중합효소연쇄반응과 혼성화를 모두 수행해야 하기 때문에 상대적으로 시간은 조금 더 걸린다. 이를 해결하기 위해 16S rRNA를 이용한 검출 방법도 개발된 바 있다 [11]. 사용하는 기기가

상당히 고가이며, 재현성의 문제가 제기되고 있기 때문에 이를 통계학적으로 분석하는 방법이 제시되고 있다 [12].

단백질 기반 검출방법

단백질을 이용하는 방법은 주로 항체를 이용하여 어떤 단백질의 특정한 부분을 인식하고, 그 후에 특정반응을 일으키는 효소를 사용하여 반응을 유발시킴으로써 검출하는 방법이다. 항체란 아미노산으로 이루어진 단백질의 일종으로 항원의 특정 부위인 항원결정부(epitope)만을 인식하여 그 부분에만 결합하는 특수한 구조로 이루어져 있다. 항체는 두 가지 종류로 나누어 지는데 한가지 항원결정부만을 인식하여 결합하면 단일클론항체 (monoclonal antibody)라고 부르고, 여러 항원결정부를 인식하여 각 부분에 붙을 수 있는 것은 다중클론항체(polyclonal antibody)라고 부른다.

항체를 이용한 결과를 확인하기 위해서 효소이나 형광염료를 이용한다. 그리고 방법으로는 효소면역측정법 (enzyme linked immunosorbent assay)을 주로 이용한다. 항원이나 항체가 고체에 고정되어 있고, 거기에 항체나 항원을 넣고, 다시 효소가 고정되어 있는 검출용 항체를 넣어 그 시그널로 병원성 미생물을 검출한다 [13].

이 방법은 배양을 하지 않고 단백질의 수준에서 병원성 미생물을 검출하기 때문에 아주 특이적이면서 빠르게 결과를 확인할 수 있다. 그리고 정량적인 분석도 가능하다. 그러나 항체를 만드는 과정에서 시간과 자금이 많이 들고, 한 가지 종류의 항체는 한 가지 단백질의 특정부위만을 검출할 수 있기 때문에 각 병원성 미생물과 시료의 수에 따라서 많은 횟수의 실험이 요구되는 것이 단점이다.

항체를 이용하면서 검출방식으로 전자적인 신호를 이용하려는 시도도 행해지고 있는데 이를 전기화학센서라고 부른다. 전기화학센서는 앞에서 언급한 항체에 연결된 효소에서 사용되는 전자전달계 물질과 전자적인 장치를 결합하여 전기적인 신호를 얻음으로써 특정 병원성 미생물의

존재를 파악할 수 있다 [14].

이를 이용하면 실시간 검출이 가능할 정도로 빠르고 특이적인 결과를 기대할 수 있고, 또한 전기 시그널의 세기와 미생물의 숫자가 비례한다는 관계를 이용한다면 정량적인 분석도 가능하다. 그러나 역시 한가지 종의 병원성 미생물에만 결합하는 항체를 이용해야 하기 때문에 여러 종을 동시에 검출하기 위해서는 숫자만큼의 항체를 필요로 한다. 그리고 항체의 안정성문제나 특이성에 관련된 문제가 해결되어야 할 것이다.

DNA 마이크로어레이와 같이 단백질에서도 위에서 한 반응에 한 종류의 병원성 미생물만 검출된다는 점을 극복하기 위해 고안된 방법이 단백질 마이크로어레이이다. 인간의 다른 질병과 관련된 분야에서 활발히 연구되고 있다. 단백질 마이크로어레이는 DNA 마이크로어레이와 마찬가지로 동시에 여러 병원성 미생물의 검출이 가능하고, 데이터를 정량적으로 분석할 수 있다는 장점과 검출 시간이 짧고, 검출 효율이 높다는 점에 주목하여 여러 팀에서 활발히 연구하고 있는 분야이다. 하지만 역시 실용화를 위해서 안정성, 고정화, 증폭방법 등의 방면에서 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

기타 방법들

여기서는 지금까지 언급되었던 것과는 다른 검출 원리인 지질을 이용하는 방법과 핵산과 단백질을 통합적으로 이용하는 다기능성 바이오칩에 대하여 소개할 것이다.

먼저 지질을 이용하여 병원성 미생물을 검출하는 방법은 열분해 질량분석법 (pyrolysis mass spectrometry)라고 부르는데 원리는 먼저 병원성 미생물을 열분해 한 후에 메틸화 반응을 거치고, 그 시료의 질량분석을 얻음으로써 각각의 병원성 미생물을 검출하는 방법이다. 그 결과 각각의 병원성 미생물에 대하여 독특한 피크들이 형성되기 때문에 쉽게 구분할 수 있다. 이 방법은 한 반응에 시간이 10분 남짓 걸릴 정도로 빠른 검출이 가능하다. 그리고 여러 개의 특이적 피크

를 보이기 때문에 구분이 용이하다. 하지만 정량 분석이 불가능하고, 여러 병원성 미생물이 한가지 시료에 있을 경우에 병원성 미생물들의 종류를 알아내기 힘들다는 단점을 가지고 있다.

마지막으로 다기능성 바이오칩에 대해서 설명하면 세포, 단백질, 핵산의 검출원리들을 모두 이용하여 통합하여 하나의 칩 위에 구현한 것이다 [17]. 이는 지금까지 설명하였던 모든 방법들의 총체적인 결합으로 볼 수 있으며 각각의 방법들의 장점이나 특색을 모두 살릴 수 있다면 강력한 검출 방법의 하나가 될 수 있을 것으로 기대된다. 한 가지 예를 들면 전자칩 위에 항체, 핵산 탐침, 세포 탐침과 같은 수많은 탐침들을 나열하고 그 전기적인 세기를 관찰할 수 있는 하나의 시스템이다. 이와 같은 시스템은 동시에 여러 병원성 미생물을 빠르고 정확하고 신뢰성 있게 검출할 수 있으므로 앞으로 그 개발이 주목되고 있다.

고 찰

지금까지 여러 가지 검출원리를 이용한 병원성 미생물의 검출 방법들을 순서대로 하나씩 설명하였다. 미생물의 검출이나 진단은 시간적인 제약이 요구되기 때문에 좀 더 빠르게 원하는 병원성 미생물을 정량적으로 검출하려고 노력하고 있다. 기존 검출방법을 제외한 다른 방법들은 배양과정에서의 생략이 가능할 수 있으므로 좀 더 빠른 결과를 얻을 수 있었으며 전자장비를 이용한 실시간으로 관측할 수 있는 기술도 개발되고 있다. 활용되는 검출 원리를 살펴보면 크게 세포 그 자체의 화학적 형태학적인 특성, 핵산, 단백질로 나눌 수 있으며 마지막의 지질을 검출원리로 사용하는 예와 같이 다른 특징적인 물질들도 충분히 검출원리로서 이용될 가능성을 지니고 있다.

그리고 여기에 언급된 모든 검출 방법들은 장치나 기술의 발전에 의해 지대한 영향을 받아온 것들이므로, 앞으로도 장치나 기술의 발전이 검출 방법의 발전에 많은 영향을 끼칠 것임을 예상할 수 있다. 그리고 현재 활발히 연구되고 있는 분야는 한 번에 많은 데이터를 얻어서 이를 분석

할 수 있다는 특징을 가지고 있으며 이는 ‘omics’의 개념과 일맥상통하는 것임을 알 수 있다. 그러므로 앞으로 검출 방법의 발전이 고속대량의 데이터 생산과 그 분석 기술 개발에 중점을 둘 것임을 쉽게 예측할 수 있다.

그러나 아직까지 이 모든 검출 원리와 방법들을 아우를 수 있는 통합검출시스템은 개발되지 않았으며 이러한 검출 방법을 개발하기 위해 많은 연구 그룹들이 노력하고 있다 [18]. 마지막으로 언급하였던 다기능성 바이오칩은 이러한 노력의 일환으로 지금까지 나왔던 모든 검출 원리들을 하나의 바이오칩에 접목시킨다면 한가지 방법만으로 동시에 수많은 미생물을 빠르고 정확하게 검출할 수 기술이 발전할 것이다. 거기에 전자적인 장비나 미세유체장치를 접합시켜서 자동화와 실시간 진단이 가능해진다면 하나의 통합적인 검출 솔루션으로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 총설에서는 해양에서 유래한 병원성 미생물들을 검출하기 위한 여러 기술들에 대해 살펴보았다. 앞으로의 기술은 더 특이적이고, 빠르며, 고속대량으로 처리할 수 있을 뿐만 아니라 여러 검출원리를 사용하여 더 정확한 통합 검출 시스템이 개발될 것으로 기대한다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부 해양생명공학사업의 해양 바이오산업신소재 기술개발의 지원을 받아 작성하였습니다.

References

1. Korean Food and Drug Administration 2002-2008. Foodborne Outbreak Statistics in South Korea.
2. Velji, M. I., Albright, L. J. 1986. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine, sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatment. *Can. J. Microbiol.* **32**(2), 121-126.
3. Endo, H., Nakayama, J., Hayashi, T. 2000. Application of flow cytometry to environmental control in marine aquaculture. *Mater. Sci. Eng: C.* **12**(1-2), 83-88.
4. Hwang, B. H., Lee, J. W., Cha, H. J. 2010. Polymerase chain reaction-based detection of total and specific *Vibrio* species. *Appl. Biochem. Biotech.* **162**(4), 1187-1194.
5. Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., Vickery, M. C.L., Bowen M. D., Meyer, R. F., Depaola, A. 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *53*(2), 149-155.
6. Griffin, D.W., Gibson C. J. III, Lipp, E. K., Riley, Kelly, Paul, J. H. III, and Rose, J. B. 1999. Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcriptase PCR and of Microbial Indicators by Standard Methods in the Canals of the Florida Keys. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9), 4118-4125.
7. Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada, K. 1997. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**(1), 125-132.
8. Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. 1998. rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology.* **144**(8), 2085-2093.
9. Eom, H. S., Hwang, B. H., Kim D. H., Lee I. B., Kim, Y. H., Cha, H. J. 2007. Multiple detection of food-borne pathogenic bacteria using a novel 16S rDNA-based oligonucleotide signature chip. *Biosens. Bioelectron.* **22**(6), 845-853.
10. Hwang, B. H., Cha, H. J. 2008. Quantitative oligonucleotide microarray data analysis with an artificial standard probe strategy. *Biosens. Bioelectron.* **23**(11), 1738-1744.
11. Hwang, B. H., Shin, H. H., Seo, J. H., Cha, H. J. 2012. Specific multiplex analysis of pathogens using a direct 16S rRNA hybridization in microarray system. *Anal.*

- Chem.* **84**(11), 4873-4879.
12. Hwang, B. H., Cha, H. J. 2010. Pattern-mapped multiple detection of 11 pathogenic bacteria using a 16S rDNA-based oligonucleotide microarray. *Biotechnol. Bioeng.* **106**(2), 183-192.
 13. Robertson, P.A.W., Xu, H.-S. Austin, B. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. *J. Microbiol. Methods.* **34**(1), 31-39.
 14. Byrne, Bb, Stack, E., Gilmartin, N., O'Kennedy, R. 2009. Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins. *Sensors.* **9**(6), 4407-4445.
 15. Mitchell, P. 2002. A perspective on protein microarrays, *Nature biotechnology*, **20**, 225-229.
 16. Basile, F., Beverly, M. B., Voorhees K. J. 1998. Pathogenic bacteria: their detection and differentiation by rapid lipid profiling with pyrolysis mass spectrometry. *Trands in anal. chem.* **17**(2), 95-108.
 17. Vo-Dinh, T., Friffin G., Stokes, D. L., Wintenberg, A. 2003. Multifunctional biochip for medical diagnostics and pathogen detection. *Sensor Actuat B-Chem.* **90**, 104-111.
 18. Straub, T. M., Chandler D. P. 2003. Towards a unified system for detection waterborne pathogens. *J. Microbiol. Methods.* **53**(2), 185-197.