توسعه فناوری حسگرها و تکنیک‌های مولکولی شناسایی تهدیدهای زیستی

آناهیتا شریعت*

ایران، تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۷/۰۲

چکیده

در عصر حاضر که جهان پیچیده‌تر و غیرقابل پیش‌بینی‌تر از همیشه بوده و آلودگی‌های زیست‌محیطی، تغییرات آب و هوایی، رشد جمعیت و جنگ رو به گسترش است، تهدیدات زیستی، به‌عنوان خطری جدی برای سلامت جوامع محسوب می‌شود و گام اصلی در مقابله با چنین تهدیداتی تشخیص زودهنگام می‌باشد. روش‌های مورداستفاده در این زمینه بر اساس تکنیک‌های ژنتیکی، ایمونولوژیک و یا ترکیبی از هر دو روش (ایمونوژنتیک) است. روش‌هایی نیز بر اساس خواص فیزیکی و شیمیایی آنالیت‌ها توسعه‌یافته است. هر گروه از این سنجش‌ها را می‌توان با روش‌های متداول (مانند PCR کلاسیک، Real-time PCR و یا واکنش‌های ساده آنتی‌ژن-آنتی‌بادی) و یا فناوری‌های مدرن (مانند کاوشگرهای ژنی، تراشه‌های ژنی، حسگرهای زیستی، فناوری ریزآرایه، آپتامرها، فسفرها و غیره) اندازه‌گیری کرد. همچنین دستگاه‌های تشخیصی یکپارچه و خودکار وجود دارد که روش‌های مختلف را باهم ترکیب می‌کند و امکان نمونه‌برداری همزمان، استخراج مواد ژنتیکی و تشخیص و شناسایی آنالیت با استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی و ایمونولوژیک را فراهم می‌آورد. نتایج این تحقیق نشان داد که در میان دستگاه‌های موجود که برای تشخیص تهدیدات زیستی استفاده می‌کردند، آن دسته از روش‌های مولکولی که کاربرد میدانی و عملیاتی دارند دارای دقت و سرعت بالایی هستند در اولویت دستیابی به فناوری‌های تشخیص بوده، می‌توانند نقش مؤثری در پدافند غیرعامل داشته باشند.

واژگان کلیدی: ایمونولوژی، تشخیص، تهدید زیستی، حسگر زیستی، ریزآرایه

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: shariat@rifr-ac.ir

مقدمه

تسلیحات بیولوژیک، یک کلاس منحصربه‌فرد از سلاح‌ها هستند که برای همه نوع تنوع زیستی ازجمله انسان، حیوان، گیاه، آب‌وهوا و ... خطراتی ایجاد می‌کنند. افزایش چنین تهدیداتی مستقیماً با پیشرفت فناوری در بیوتکنولوژی مدرن مرتبط است که متخاصمین از آن در جهت مقاصد پلید خود استفاده می‌کنند (۱). مقابله با چنین چالشی نیازمند استراتژی‌های مؤثر پدافند غیرعامل است که فناوری‌های تشخیصی، داروها و واکسن‌های موردنیاز برای مقابله با طیف وسیعی از سلاح‌های زیستی پیشرفته قرن ۲۱ را ارائه می‌دهد. به‌طورکلی عوامل بیولوژیک تهدیدکننده، دارای ویژگی‌ها و مزایایی برای متخاصمین هستند ازجمله: مدتی پس از حمله باعث ایجاد علائم می‌شوند، به این مفهوم که آسیب از این طریق، تأخیری است به‌طوری‌که زمانی از تهاجم مطلع می‌گردیم که عامل بیولوژیک توسعه‌یافته و منطقه گسترده‌ای را درگیر کرده است. از ویژگی‌های دیگر آن است که این عوامل با روش‌های طبیعی در منطقه انتشار می‌یابند و از نرخ شیوع و خسارت بالایی برخوردارند. این عوامل با تجهیزات آزمایشگاهی به میزان فراوان تکثیر و در منطقه حساس رها می‌گردند و روش انتشار به‌صورت پنهان صورت می‌گیرد و امکان شناسایی آن با هیچ ابزار شناساگری در مرحله تهاجم وجود ندارد و یا بسیار دشوار است (۲)؛ بنابراین تفکیک بین عمدی و یا طبیعی بودن شیوع یک عامل بیولوژیک بسیار دشوار است مگر در موارد استثنایی که عامل به‌هیچ‌وجه بومی آن کشور نباشد. به همین دلیل دشمنان در طراحی حملات بیوتروریسم برای پرهیز از امکان اثبات ادعای به‌کارگیری سلاح کشتارجمعی، به نحوی برنامه‌ریزی می‌کنند که ضمن آسیب‌رسانی مؤثر، از مظان اتهام بری بمانند. در اکثر تهدیدات بیولوژیک صورت گرفته، کشور موردتهاجم قادر به اثبات ادعای خود برعلیه دشمن نبوده است (۳).

تا پیش‌ازاین میکروسکوپ نقش مهمی در تشخیص عوامل بیماری‌زای باکتریایی و شمارش آن‌ها در نمونه‌های مختلف (مانند خون، ادرار، خلط، مدفوع) داشته است. استفاده از

فن رنگ‌آمیزی (به‌عنوان‌مثال رودامین، جوهر هندی) نیز تمایز و طبقه‌بندی تعدادی از سویه‌های باکتریایی را تسهیل نموده است. ویروس‌هایی نظیر روتاویروس‌ها، هپاتیت A و Norwalk نیز با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپی قابل‌شناسایی هستند. لازم به ذکر است که تشخیص بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی باکتری‌ها و ذرات ویروس، نیاز به مقدار زیاد نمونه دارد، به‌طور مثال در مورد ویروس‌ها، به تیتر بالای ویروسی (۱۰۵ تا ۱۰۶ ذره ویروس در میلی‌لیتر) (Virus particles per mililliter, vp/mL) نیاز است. علاوه بر این، تلفات نمونه در حین آماده‌سازی نمونه برای میکروسکوپ‌های الکترونی، به دلیل از دست دادن آب نمونه و شارژ مولکول‌های زیستی (باکتری‌ها و ویروس‌ها) بالاست که این امر باعث کاهش اختلاف میان روشن‌ترین و تیره‌ترین بخش یک تصویر و نیز کاهش عملکرد می‌شود. علاوه بر این، تکنیک‌های میکروسکوپی نیاز به تخصص و نیروی انسانی آموزش‌دیده دارد که موارد ذکرشده باعث ایجاد محدودیت در تشخیص می‌شوند. تاکنون برای تشخیص تهدیدهای زیستی روش‌های مختلفی ارائه‌شده است که عمدتاً بر اساس آزمایش‌های کشت و بیوشیمیایی هستند که نمی‌توان از آن‌ها در عرصه استفاده کرد و در صورت حمله بیوتروریستی اجازه تشخیص و شناسایی عوامل بیولوژیکی را در زمان کوتاه نمی‌دهند (۴). هدف از ارائه مقاله حاضر معرفی و مقایسه روش‌های تشخیص تهدیدات بیولوژیک است که در شش حوزه آب، دام، انسان، غذا، دارو و محیط‌زیست قابلیت کاربرد دارند.

روش تحقیق

این تحقیق ازنظر هدف کاربردی و ازنظر روش گردآوری داده‌ها توصیفی – تحلیلی و گردآوری اطلاعات با استفاده از مطالعه و بررسی اسناد و مدارک علمی پژوهشی و شبکه اینترنت صورت گرفته است. در این تحقیق، تکنولوژی‌های ژنتیکی و ایمونولوژیکی موجود در جهان بر اساس شاخصه‌های کاربرد میدانی- عملیاتی بررسی شده‌اند. جدول ۱ خلاصه‌ای از تکنیک‌های مختلف مورداستفاده در تشخیص تهدیدهای بیولوژیک است که در این مقاله موردبررسی قرارگرفته است.

سنجش‌های ایمونولوژیک

تست ایمونوکروماتوگرافی (Immunochromatographic test (ICT))

تشخیص عوامل تهدید بیولوژیک توسط آنتی‌بادی‌ها (مونوکلونال یا پلی‌کلونال) یک روش استاندارد در تشخیص بالینی محسوب می‌شود. این روش بر پایه اصل تشکیل پیوند میان آنتی‌بادی-آنتی‌ژنی بر روی سطح جامد استوار است و پس‌ازآن خوانش بصری است. این آزمایش‌های کیفی و نیمه کمّی (شدت بازخوانی رنگ)، سریع (کمتر از ۲۰ دقیقه)، مقرون‌به‌صرفه، کاربرپسند و نیاز به حداقل تنظیمات دارد؛ بنابراین، این سنجش‌ها یک ابزار مناسب در برنامه‌های نظارتی به‌حساب می‌آیند که برای تشخیص پاتوژن‌ها استفاده می‌شود. تست‌های ایمونوکروماتوگرافی که بانام Lateral flow tests نیز شناخته شده‌اند، از اواخر دهه ۱۹۸۰ وارد بازار شدند و به‌عنوان یک پلتفرم محبوب و با سرعت برای تشخیص کیفی و یا نیمه کمّی بسیاری از آنالیت‌ها ازجمله آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌بادی‌ها و حتی محصولات اسید نوکلئیک استفاده شده‌اند. از ادرار، بزاق، سرم، پلاسما، خون، عصاره ترشحات یا مایعات بیمار می‌توان به‌عنوان نمونه استفاده کرد. روش LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assays) از دیگر روش‌های آسان و سریع است، اما حساسیت آن کمتر است و نتایج مثبت کاذب زیادی را ارائه می‌دهد. بااین‌حال ممکن است برای غربالگری اولیه سریع عوامل بیولوژیکی و تشخیص سریع نمونه‌ها مفید باشد، اگرچه، به‌طور اصولی، هر نتیجه مثبتی باید با آزمایش‌های دیگر، مانندPCR تائید شود. دستگاه‌های LFIA توسط بسیاری از شرکت‌ها برای تعداد زیادی از عوامل بیولوژیک مانند *Bacillus anthracis*، *Francisella tularensis*، *Yersinia pestis*، *Clostridium botulinum* و چندین سم مانند ریسین و انتروتوکسین استافیلوکوکی B تولید شده‌اند (۵). یک آرایه ایمونولوژیکی مبتنی بر سوسپانسیون می‌تواند پنج عامل تهدیدکننده را هم‌زمان تشخیص دهد به‌عنوان‌مثال در نمونه‌های پودری *Yersinia pestis*، سندرم حاد تنفسی کروناویروس SARS-CoV، انتروتوکسین، استافیلوکوکی B (SEB)، ریسین را به ترتیب با حد تشخیص (LOD, limit of detection) ۱۱۱ (CFU)/ml، ۲۰ CFU/ml، ۱۱۰ pg، ۵/۴ نانوگرم و ۲ نانوگرم تشخیص می‌دهد.

امروزه کیت‌های تشخیصی مختلفی برای شناسایی عوامل مختلف در محیط، غذا و آب و نمونه‌های بالینی گرفته‌شده

از بیمار عرضه‌شده است. ENVI Assay System Gold یک دستگاه آزمایشگاهی قابل‌حمل است (جدول ۲) که عوامل مختلف را در عرض ۲۰ دقیقه تشخیص می‌دهد (۶).

جدول ۱- تکنیک‌های مختلف برای تشخیص تهدیدهای بیولوژیک

روش‌ها		تکنیک‌های تشخیص
آزمایش ایمونوکروماتوگرافی	Immunochromatographic test (ICT)	سنجش های ایمونولوژیک Immunological assays
سنجش ایمونوکروماتوگرافی جریان جانبی	Lateral-Flow Immunochromatographic Assays	
تست جریان از طریق نقطه	Flow through spot test	
سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay	
روش ایمونواسی فلورسانس زمانی	Time-Resolved Fluorescence Immunoassay (TRF)	
حسگرهای مبتنی بر آرایه دی ان ا	DNA array-based sensors	فناوری حسگرها Sensor technologies
حسگرهای مبتنی بر آرایه پروتئینی	Protein array-based sensors	
سنسورهای ایمونولوژیک	Immunological sensors	
حسگرهای زیستی مبتنی بر بافت	Tissue-based biosensors	
سنسورهای مبتنی بر ام ای پی	MIP-based sensors	
حسگرهای زیستی نانومواد	Nanomaterials biosensors	
واکنش زنجیره ای پلیمراز	Polymerase chain reaction (PCR)	تکنیک های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک Nucleic Acid-Amplification-Based Techniques
ریل تایم پی سی آر	Real-time RT-PCR	
پایروسکونسینگ	454 Pyrosequencing	توالی یابی نسل بعدی Next Generation Sequencing
توالی یابی ایلومینا	Illumina Sequencing	
تعیین توالی با بستن و تشخیص الیگونوکلئوتیدی	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection	
بستن و تشخیص		
توالی یابی به روش یون تورنت	Ion Torren	
تقویت توالی خاص	Sequence-Specific Amplification	تقویت همدما Isothermal Amplification
تقویت با واسطه سیگنال فناوری ار ان ا	Signal Mediated Amplification of RNA Technology	
روش ذوب دوبلکس آنزیمی و اتصال پرایمر	Enzymatic Duplex Melting and Primer Annealing Method	
تقویت پلیمراز رکامبیناز	Recombinase Polymerase Amplification	
تقویت وابسته به هلیکاز	Helicase Dependent Amplification (HDA)	
تقویت حلقه چرخان	Rolling Circle Amplification	
تقویت همدما با واسطه حلقه	Loop-Mediated Isothermal Amplification	
تقویت جابجایی رشته	Strand Displacement Amplification	
طیف سنجی جرمی	Mass spectrometry	فناوری های ابزاری Instrumental technologies
تصویربرداری شیمیایی رامان	Raman chemical imaging	
		ریزآرایه هاMicroarrays
		میکروسیال Microfluidics

یک پلتفرم باقابلیت اندازه‌گیری سریع نیز توسط شرکت Response Biomedical Inc برای تشخیص ویروس‌های آنفلوانزای A (FluA) و B (FluB)، Bacillus anthracis، ویروس واریولا و سموم ریسین و بوتولینوم ارائه‌شده است این پلتفرم شامل یک دستگاه فلورسنت خوان و یک

کارتریج یک‌بارمصرف است که می‌تواند عوامل بیماری‌زای مشخصی را تشخیص دهد (جدول ۲).

تست نقطه‌ای جریان (Flow-through spot test)

این آزمایش مبتنی بر جریان سیال حاوی آنالیت، از طریق یک غشای متخلخل به یک‌لایه جاذب است. از این آزمایش‌ها می‌توان برای تشخیص آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها استفاده کرد. برای تشخیص لازم است آنالیت مربوطه بر روی غشا (در یک نقطه یا خط) متصل و بی‌حرکت شود. سپس معرف موردنظر آنالیت‌ها را در حین عبور از غشا جذب می‌کند. برای انجام آزمایش، یک نمونه بر روی غشاء گذاشته می‌شود و اجازه داده می‌شود تا با عمل مویرگی جذب و پراکنده شود. پس‌ازآن، به ترتیب، یک مرحله شستشو، افزودن معرف سیگنال و شستشو دوم برای پاک‌سازی غشاء وجود دارد. این روش آزمایش بسیار سریع (۳–۵ دقیقه) و دارای حساسیت بالا برای سنجش‌های سرولوژیکی است، اما در آزمایش‌های فاز جامد، تشخیص آنتی‌ژن‌ها اغلب نسبت به روش‌های سنجش EIA (enzyme immunoassays) حساسیت کمتری دارد. بعد از انتشار سیاه‌زخم در سال ۲۰۰۱، توجه قابل‌ملاحظه‌ای به آزمایش‌های تشخیصی دستی مبتنی بر آنتی‌بادی، مانند تست سریع SMART (Sensitive Membrane Antigen Rapid Test) و ALERT (-the Antibody based Lateral Flow Economical Recognition Ticket) ایجاد شد (۷). سیستم‌های نامبرده، از آنتی‌بادی‌ها برای تشخیص اهداف خاص، سموم، آنتی‌ژن‌ها یا سلول‌های موردنظر استفاده می‌کنند. محدودیت‌های این آزمایشات شامل اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها است که ممکن است منجر به نتایج مثبت کاذب شود و تجزیه آنتی‌بادی‌ها در طول زمان، که ممکن است منجر به نتایج منفی کاذب شود. به‌علاوه، این آزمایش‌ها به میزان در دسترس بودن آنتی‌بادی‌ها، محدود می‌شوند.

روش سنجش ایمنی آنزیمی یا الایزا

روش الایزا یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای ردیابی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی است، بدین ترتیب که یکی از این دو ماده در بستر جامد فیکس می‌شود و به‌وسیله آن، ردیابی دومی انجام می‌شود، اما اساساً برای ردیابی هر جفت ماده‌ای که مثل جفت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به هم گرایش داشته و قدرت اتصال مناسبی نسبت به هم دارند می‌تواند به کار گرفته شود. این تکنیک کاربرپسند، حساس، خاص و مقرون‌به‌صرفه است. در این روش کمپلکس‌های آنتی‌ژن/آنتی‌بادی در یک نمونه مشخص ازنظر کمی اندازه‌گیری می‌شود. این روش به‌عنوان یک ابزار تشخیصی آزمایشگاهی در آزمایش‌های بالینی مورداستفاده قرار می‌گیرد. انواع مختلف ELISA برای تشخیص پاتوژن مورداستفاده قرار می‌گیرد مانند ELISA مستقیم، غیرمستقیم و رقابتی که می‌توانند عوامل تهدیدکننده زیستی ازجمله: *F. tularensis*، *B. anthracis*، *Y. pestis*، *Brucella abortus*، *Burkholderia pseudomallei*، ویروس ابولا (EBOV) یا ویروس ماربورگ را تشخیص دهند (۸).

همچنین سیستم‌های نمونه‌برداری و سنجش یکپارچه برای شناسایی هشت عامل تهدیدکننده (*B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, *Brucella spp.*, *B. mallei*, ricin toxin, *botulinum toxin* A/B, and SEB) در عرض ۱۵ دقیقه گزارش‌شده است. در این روش از یک نوار کد شده، حاوی آنتی‌بادی‌های بی‌حرکت، استفاده می‌شود که می‌تواند عوامل زیستی را از نمونه‌های سطحی، پودری یا مایع شناسایی کند.

(TRF) Time-Resolved Fluorescence Immunoassay

روش (TRF) شبیه به الایزا است ولی نیاز به زمان بیشتر دارد. افزایش زمان فلورسانس کمک به اندازه‌گیری بهتر سیگنال می‌کند. روش TRF می‌تواند سم بوتولینوم را در نمونه‌های بیمار در غلظت‌های پایین (0.01 pM) تشخیص دهد. پلتفرم تجاری این روش توسط شرکت پرکین–المر برای تشخیص عوامل بیماری‌زای مختلف، ساخته‌شده است. این آزمایش مشابه ELISA است به‌این‌ترتیب که یک صفحه با ۹۶ چاهک، با آنتی‌بادی نشان‌دار شده با استرپتاویدین و یوروپیوم (series Eu3+, lanthanide) پوشانده شده است. آنتی‌بادی نشان‌دار شده هنگامی‌که در معرض آنتی‌ژن قرار می‌گیرد یوروپیوم آزاد و سیگنال فلورسنت تولید می‌کند. حد تشخیص سیستم ۴ تا pg/ml ۲۰ است. دستگاه‌های مبتنی بر الایزا برای تشخیص عفونت‌های میکروبی استفاده می‌گردند. پیشرفت‌های اخیر با استفاده از فناوری Luminex xMAP، قابلیت شناسایی چندین عامل میکروبی را فراهم نموده است. سیستم سنجش MagPix بر پایه اصول ELISA مبتنی بر فناوری

میکروسفر پارامغناطیس است که می‌تواند الایزا را به یک سیستم حساس‌تر و سازگارتر با توانایی شناسایی چندین عامل تبدیل کند (۹).

جدول ۲- پلتفرم‌های مختلف تشخیص سموم و پاتوژن‌ها

	تصویر دستگاه	نام دستگاه	شرکت تولیدکننده	پاتوژن‌ها و سموم قابل‌شناسایی	مدت‌زمان انجام آزمایش
۱		NIDS® handheld biothreat assay and handheld reader	ANP technologies	*Bacillus anthracis*, vaccinia virus, Brucellae, Venezuelan equine *encephalitis virus*, *Listeria*, SEB, *Francisella tularensis*, botulinum toxin A, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* 0157, ricin, *Coxiella burnetii*, *Yersinia pestis*, *Salmonella* sp.	۱۵ دقیقه
۲		PRO STRIPS5 Agent biowarfare threat detection kit	ADVNT Biotechnology	*B. anthracis*, ricin, botulinum toxin A and B, *Y. pestis* and SEB	تعیین نشده
۳		Zephyr	PathSensors, Inc.	*B. anthracis*, *Y. pestis*, ricin, *F. tularensis*, orthopoxviruses, *Salmonella* sp.	۱۵ دقیقه
۴		Prime Alert	GenPrime, Inc.	Ricin, botulinum toxin, SEB, *F. tularensis*, *Y. pestis*	۱۵ دقیقه
۵		ENVI Assay System Gold	Environics Oy	Ricin, botulinum toxin, SEB, orthopoxviruses, B. anthracis, *Y. pestis* and *F. tularensis*	کمتر از ۲۰ دقیقه
۶		Aegis 1000	BioDetection Instruments(BDI)	Foodborne pathogens, toxins, infectious agents, protein biomarkers, waterborne pathogens	کمتر از ۳۰ دقیقه
۷		RAMP 200 Biowarfare Detection System	Response Biomedical Corporation	*B. anthracis*, ricin, botulinum toxin, variola virus	بیشتر از ۳۰ دقیقه

حسگرهای زیستی

حسگر زیستی یک دستگاه تحلیلی است که از اجزای فعال بیولوژیکی، گیرنده‌های زیستی و مبدل‌ها تشکیل‌شده است و می‌تواند آنالیت‌ها را در یک نمونه مشخص، تشخیص دهد. گیرنده‌های زیستی ممکن است آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، DNAهای تک‌رشته‌ای (ssDNA)، پروتئین‌های آپتامر یا سلول‌ها باشند. روش‌های تشخیص پاتوژن و یا سموم با استفاده از حسگرهای زیستی، سریع، حساس و مقرون‌به‌صرفه است. حسگرهای زیستی مبتنی بر سنجش ایمنی، آنتی‌ژن‌های خاصی را در نمونه بیمار تشخیص می‌دهند و یا نشانگرهای زیستی را برای مطالعه ایمنی میزبان در طول دوره عفونت شناسایی می‌کنند. دانشمندانی که از حسگرهای زیستی استفاده می‌کنند ممکن است برای تشخیص تجزیه‌وتحلیل از روش‌های بدون نشان (برچسب) یا از روش‌های نشان‌دار استفاده کنند. در سنجش بدون نشان، حضور آنالیت، مستقیماً از طریق مبدل که می‌تواند نوری، الکتریکی یا مکانیکی باشد، تشخیص داده می‌شود. در مقابل، در روش‌های نشان‌دار برای تشخیص آنالیت از آشکارساز دوم استفاده می‌شود که با آنزیم، فلوروفور یا رادیوایزوتوپ جفت شده است (۱۰). ایمونوسنسور الکتروشیمیایی با روش نشان‌دار نمودن غیرمستقیم می‌تواند عفونت *F. tularensis* را با حد تشخیص 1000 CFU/ml در عرض ۲۵ دقیقه تشخیص دهد. علاوه بر این، یک ایمونوسنسور پیزوالکتریک *F. tularensis* را با حد تشخیص 105 CFU/ml در عرض ۵ دقیقه شناسایی می‌کند. تشخیص حسگر زیستی گلیکوپروتئین EBOV glycoprotein ($GP_{1,2}$) بر اساس سطح رزونانس پلاسمون است. این بستر مقرون‌به‌صرفه، سریع و حساس است و می‌تواند در صنعت، تحقیقات و برنامه‌های دفاع زیستی مورداستفاده قرار گیرد (۱۱). یک حسگر زیستی مبتنی بر سلول به نام CANARY (تجزیه‌وتحلیل سلولی و اطلاع‌رسانی از خطرات و بازدهی آنتی‌ژن) که در انستیتوی فناوری ماساچوست ساخته‌شده است، عوامل بیماری‌زای نوظهور یا عوامل تهدیدکننده زیستی مربوط به بخش‌هایی مانند دفاع زیستی، کشاورزی و ایمنی غذا را شناسایی می‌کند. در داخل حسگر زیستی CANARY، سلول‌های لنفوسیت B مهندسی‌شده وجود دارد که پروتئین بیولومینسنت وابسته به کلسیم را بیان می‌کند که نام آن aequorin است که با آنتی‌بادی متصل به غشاء آنتی‌ژن خاصی جفت می‌شود. اتصال آنتی‌ژن- آنتی‌بادی یک کانال یونی کلسیم درون‌سلولی را فعال می‌کند و آکوورین نور ساطع می‌کند. فناوری CANARY برای غربالگری نمونه‌های مایع و پودر برای عوامل تهدیدکننده بیولوژیکی و سموم در سطح تجاری عرضه‌شده است. حسگر زیستی یک دستگاه مستقل و مدرن است که می‌تواند برای برنامه‌های داخلی و خارجی با حد تشخیص کمتر از ۱۰۰ CFU/ml به ترتیب در مدت ۵ دقیقه و ۲ تا ۱۵ دقیقه استفاده شود. انواع مختلف حسگرهای زیستی پیشرفته و کاربردهای آن‌ها در تشخیص عوامل جنگ زیستی و عوامل بیماری‌زا به‌طور گسترده درجاهای دیگر موردبررسی قرارگرفته است (۱۲). انواع مختلف حسگرهای زیستی مورداستفاده برای تشخیص عوامل زیست درمانی در جدول ۳ فهرست شده است.

روش‌های تشخیص مولکولی

روش‌های تشخیص مولکولی منحصراً بر پایه اسید نوکلئیک DNA/RNA عامل بیولوژیکی هستند. این روش‌ها نسبت به روش‌های تشخیص مبتنی بر آنتی‌بادی حساس‌تر هستند به‌گونه‌ای که با روش real-time PCR تنها با داشتن تعداد ۱۰ میکروارگانیسم یا کمتر امکان شناسایی وجود دارد (۱۳). محدودیت عمده PCR ناتوانی در تفکیک عوامل زنده از مرده و عوامل چندتایی (به‌طور مثال ۴-۶ تایی) است. تشخیص سطوح بالاتری از عوامل چندتایی با روش endpoint PCR و با استفاده از سیستم لومینکس وجود دارد، اما حساسیت، اختصاصی بودن و محدوده دینامیکی کمّی کاهش می‌یابد. همچنین تعدادی روش بر اساس هم‌دما و غیر هم‌دما نیز وجود دارد که در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای، برای تکثیر ژن‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

PCR همچنان رایج‌ترین و پرکاربردترین فناوری محسوب می‌شود. مزیت اصلی این سیستم مبتنی بر اسید نوکلئیک، به دلیل ویژگی منحصربه‌فرد بودن ژنوم در موجودات زنده است. طراحی دقیق آغازگرها و کاوشگرها، تشخیص موجودات را امکان‌پذیر می‌کند. همچنین بالاترین حساسیت را به دلیل تکثیر نمایی نسخه ژنومی ارائه

می‌دهد. در طول PCR، یک قطعه کوتاه از ژنوم عامل تهدیدکننده زیستی تکثیر می‌شود و میلیون‌ها نسخه در مدت‌زمان کوتاهی به دست می‌آید. آماده‌سازی نمونه یکی از مهم‌ترین مراحل، برای تحقق سیستم‌های تکثیر اسید نوکلئیک است. نتایج PCR بسته به وجود مهارکننده‌ها در نمونه بسیار متفاوت و در صورت وجود ماتریس‌های پیچیده محیطی، نیاز به پردازش نمونه است. تغییراتی در PCRمعمولی انجام‌شده است که تشخیص هم‌زمان چندین عامل تهدیدکننده را امکان‌پذیر می‌کند. PCRهای چندتایی (multiplex PCR) هزینه و زمان را به میزان قابل‌توجهی کاهش می‌دهد (۱۴).

Real-time RT-PCR

تکنیک Real Time PCR بسیار شبیه به روشPCR است. در این تکنیک نیز همانند PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، یک توالی تکثیر می‌گردد اما تفاوت آن با PCR معمولی در سنجش کمّی توالی تکثیرشده، است. در روش Real Time PCR با به کار گرفتن یک نشانگر فلورسنت در واکنش، میزان تکثیر محصول ردیابی می‌گردد. این نشانگرهای فلورسنت به‌گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA، یا اتصال آن‌ها به DNA نور تولید می‌شود بنابراین نور بیشتر برابر است با تکثیر محصول و افزایش شدت نور ثبت‌شده در دستگاه با میزان محصول به‌دست‌آمده نسبت مستقیم دارد. در RT-PCR غیراختصاصی، از یک رنگ عمومی مانند SYBR Green استفاده می‌شود که هنگام اتصال به DNA فلورسانس (نور) ساطع می‌کند. افزایش فلورسانس نشان‌دهنده هیبریداسیون کاوشگر به DNA هدف است که منجر به جداسازی فیزیکی مواد شیمیایی فلورسنت‌دار می‌شود (۱۵). برخلاف فرمت غیراختصاصی SYBR Green، سنجش‌های مبتنی بر کاوشگر از طریق استفاده از رنگ‌های مختلف فلورسنت، قابلیت چندگانه را ارائه می‌دهند. کاوشگرهای TaqMan با موفقیت برای تشخیص عوامل متعدد تهدیدات بیولوژیک ازجمله *Bacillus anthracis*، *Yersinia pestis*، *Coxiella burneti*، عوامل ویروسی Cat A ازجمله آبله، ابولا و سایر ویروس‌های هموراژیک (hemor- rhagic) استفاده می‌شود.

توالی‌یابی نسل بعدی (Next-generation sequencing; NGS)

توالی‌یابی DNA در سال ۱۹۷۷ توسط سنگر و گیلبرت معرفی شد. آن‌ها توالی DNA را با افزودن یک فسفات نوکلئوتیدی دی‌اکسید پایانی (ddNTPs) نشان‌دار شده با رنگ فلورسنت و DNA پلیمراز برای خاتمه دادن به واکنش، رمزگشایی کردند. بعدها، اسید نوکلئیک انتهایی با روش الکتروفورز مویی شناسایی و مقدار تحریک لیزر توسط دوربین CCD ثبت شد.

جدول ۳- حسگرهای زیستی برای تشخیص عوامل تهدیدات بیولوژیک

ردیف	مبدل	عامل تهدید	حد تشخیص	زمان	نمونه‌های تست‌شده
۱	حسگر زیستی الکتروشیمیایی با نانوذرات طلا	*Botulinum neurotoxin* type E	۱۰ pg/ml to ۱۰ ng/ml	۶۵ min	آب پرتقال و شیر
۲	بیوسنسور ایمپدومتریک با نانوذرات طلا	*Brucella melitensis*	۴ * ۱۰۵ CFU/ml	۱/۵ h	شیر
۳	حسگر زیستی الکتروشیمیایی با نانوذرات فلزی طلا و پالادیوم بر روی نانو ورقه های نیتریت بور	*B. anthracis* surface array proteins	۵ pg/ml to۱۰۰ ng/ml	۱ h	کشت سلولی
۴	طیف سنج رزونانس پلاسمون سطحی و امپدانس الکتروشیمیایی	*Brucella abortus*	۰/۰۵ pM	۱۰ min	کشت سلولی
۵	رزونانس پلاسمون سطحی با آنتی بادی علیه آنتی ژن F1	*Y. pestis*	۱۰۶ CFU/ml	۱ h	نمونه های محیطی
۶	رزونانس پلاسمون سطحی همراه با طیف‌سنج امپدانس الکتروشیمیایی	*Botulinum neurotoxin* A	۰/۰۴۵ fM		کشت سلولی
۷	ایمونوسنسور پیزوالکتریک همراه با میکروبالانس *F. tularensis* و آنتی ژن (QCM) کریستال کوارتز	*F. tularensis*	۵ * ۱۰۶ cells/ml	۳۵ min	کشت سلولی
۸	میکروبالانس کریستال کوارتز	staphylococcal enterotoxin A (SEA)	۰/۰۲ mg/L	۲۵ min	شیر

معایب سیستم، شامل خوانش اشتباه، تشکیل ساختارهای ثانویه DNA و محدود شدن طول کوتاه توالی‌های DNA است (۱۶). توالی‌یابی نسل بعدی افق‌های جدیدی را برای تشخیص مولکولی باز کرد، اما به دلیل نیاز به کارکنان آموزش‌دیده، مدت‌زمان طولانی و تنظیمات پیچیده، هنوز در تشخیص بالینی کاربرد محدودی دارد. از این تکنیک می‌توان برای تشخیص هموپلیمر یا توالی‌های تکراری استفاده کرد. از NGS برای شناسایی ژنوم‌های بیماری‌زا، جهش‌های ژنتیکی، الگوهای مقاومت دارویی و کشف پاتوژن جدید استفاده می‌شود. کاربرد NGS برای آنالیز کامل ژنوم، ترنسکریپتوم، توالی کل exome و توالی‌های متیله شده و یا توالی ژن کاندید است. یکی دیگر از کاربردهای مهم NGS شامل تعیین توالی متاژنومی است که میکروارگانیسم‌های متعدد را در نمونه‌های همگن یا ناهمگن به‌طور هم‌زمان تشخیص می‌دهد حتی اگر مقدار میکروارگانیسم‌ها خیلی کم باشد. علاوه بر این، NGS را می‌توان برای میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت نیز استفاده کرد. نسل بعدی NGS نوید پتانسیل بالایی برای توسعه داروهای اختصاصی و ساخت کتابخانه‌های cDNA می‌دهد (۱۷).

ریزآرایه (Microarray)

فناوری ریزآرایه در سال ۱۹۹۵، هنگامی‌که دو محقق از cDNA به‌عنوان یک کاوشگر برای تعیین الگوی بیان ژن در *Arabidopsis* استفاده می‌کردند، ابداع شد. ریزآرایه‌ها دستگاه‌های آزمایشگاهی هستند که روی تراشه میناتوری از جنس شیشه یا سیلیکون ساخته‌شده‌اند و حاوی ۲۵ تا ۷۰ کاوشگر الیگونوکلئوتیدی هستند که از طریق رسوب مکانیکی، چاپ جوهرافشان یا از طریق فوتولیتوگرافی روی اسلاید مشاهده می‌شوند. هر نقطه روی یک ریزتراشه حاوی چندین برابر کپی‌های اولیگونوکلئوتیدی (۱۰ نانومتر تا ۱۰۰ پی پی م DNA) است. بسته به نیاز، یک ریزآرایه ممکن است دارای چندین کاوشگر برای میکروارگانیسم‌های مختلف یا یک ژنوم کامل از یک میکروارگانیسم واحد باشد. ریزتراشه‌های تجاری Affymetrix و Illumina برای تشخیص بیش از ۲۰۰۰۰ تا چند میلیون ژن استفاده شده است. انواع مختلف ریزآرایه‌ها (پروتئین، پپتید، کربوهیدرات، چربی، بافت، فاز معکوس یا ریزآرایه‌های آنتی‌بادی) در دسترس هستند. پروتکل‌های ریزآرایه شامل مراحل آماده‌سازی نمونه، برچسب‌گذاری کاوشگرها بارنگ‌های فلورسنت، هیبریداسیون نمونه روی تراشه، شستشو و به دست آوردن تصویر، نرمال‌سازی داده‌ها، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر است. در تحقیقی، میکرو آرایه چند طیفی با طیف وسیع (TessArray® RPM-TEI 1.0, TessArae LLC, Potomac Falls, VA)، ۸۴ عامل بیماری‌زا و ۱۳ سم، از گروه پاتوژن‌های A، B و C با حد تشخیص ۱۰۴ در هر آزمایش، تشخیص و از یکدیگر تفکیک نمود. این آزمایش‌ها بسیار حساس هستند و می‌توانند بین EBOV، ویروس ماچوپو و ویروس Lassa تمایز قائل شوند. یک آرایه نیز برای شناسایی ویروس‌ها به نام ViroChip ساخته‌شده است. کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی ۷۰تایی (70-mer oligonucleotide)، مناطق حفاظت‌شده (۱۶۰۰ کاوشگر) از ۱۴۰ ژنوم ویروسی را تشخیص می‌دهند و می‌توانند برای تشخیص ویروس‌هایی نظیر تب‌خال انسانی ۸، ویروس سینسیتیال تنفسی انسان، ویروس پاراآنفلوانزا نوع ۳، آدنوویروس‌ها و سروتیپ‌های رینوویروس‌ها استفاده شوند (۱۸).

در طول شیوع SARS در سال ۲۰۰۳، از ریزتراشه DNA برای شناسایی و تعیین توالی کرونا ویروس جداشده از بیماران SARS استفاده شد. نسخه‌های جدید و به‌روز ViroChipمی‌توانند ویروس‌های ۵۳ خانواده و ۲۱۴ جنس را با استفاده از ژنوم‌های کامل ویروسی تشخیص دهند. علاوه بر این، ViroChipبرای تشخیص عفونت حاد دستگاه تنفسی در کودکان نیز استفاده شد. به‌طور مشابه، آرایه دیگری به نام GreeneChipPm برای تشخیص سریع باکتری‌ها در نمونه‌های مختلف تولیدشده است. این پلتفرم شامل الیگونوکلئوتیدهای خالص (۲۹۴۹۵) از پایگاه داده GreeneChipVr v1.0است و برای تشخیص پاتوژن‌های باکتریایی، قارچی و تک‌یاخته‌ای، ۱۱۴۷۹ rRNA 16s و توالی rRNA 18s استفاده‌شده است. همچنین ریزآرایه الیگونوکلئوتیدی با چگالی پایین می‌تواند ویروس‌های نوروتروپیک (منتژیت و انسفالیت) را از نمونه‌های مایع مغزی نخاعی و مایع غیر مغزی نخاعی تشخیص دهد. همچنین امکان تشخیص اکوویروس‌ها، ویروس تب‌خال انسانی (HHV-2, -4, -5, -6BA,-6B, and -7)، ویروس هندی *Vesicular stomatitis* و polyoma- virus JC1 (۱۹) وجود دارد. در شیر و نمونه‌های مختلف دیگر موفقیت ریزآرایه به حساسیت سیستم برای تشخیص عوامل بیماری‌زا در یک نمونه بستگی دارد.

تکثیر هم‌دما

تکثیر هم‌دما یک تکنیک قوی برای تکثیر نمایی اسیدهای نوکلئیک در دمای واحد است. این تکنیک برای تکثیر یک توالی مشخص بدون نیاز به ترموسیکلر (Thermocycler) است، درنتیجه هزینه تجهیزات را کاهش داده و به‌راحتی برای پلتفرم‌های POC (point-of-care) قابل‌استفاده است. مراحل پردازش در تکثیر هم‌دما را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد: (۱) تکثیر توالی مشخص، (۲) ذوب دوطرفه آنزیمی و اتصال آغازگر و (۳) جابجایی رشته با استفاده از چندین آغازگر PCR و یا جابجایی رشته با استفاده از یک جفت «آغازگر حلقه‌ای» اضافی که می‌تواند منجر به تسریع در واکنش شود (۲۰).

میکروسیالات (Microfluidics)

فناوری میکروسیالی یکی از فناوری‌های نوین است که توانسته است با بهره‌گیری از خواص ویژه‌ی سیالات در مقیاس میکرو و نانولیتر، کاربردهای گسترده‌ای را به خود اختصاص دهد. یک دستگاه میکروسیالی، تراشه‌ای از جنس سیلیکون، شیشه یا الاستومر است که لوله‌هایی با ابعاد میکرونی در آن تعبیه‌شده و سیالات درون این لوله‌ها جریان پیدا می‌کنند. بر اساس نیاز می‌توان تراشه‌هایی طراحی کرد که عملیات موردنظر در آزمایش‌های معمول زیستی و پزشکی را در ابعاد کوچک انجام دهد. اصل اساسی در فناوری میکروسیال ایجاد یک جریان آرام بین کانال‌ها است. جریان سیال را می‌توان با پمپ‌های فشار مانند پمپ‌های سرنگ یا پمپ‌های الکتروکینتیک تنظیم کرد. پمپ‌های الکتروکینتیک، الکترواسمز را از طریق دیواره‌ها ایجاد می‌کنند تا فشار و جریان سیال را ایجاد کنند. میکروسیالات کاربردهای متعددی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی، سینتیک آنزیم‌ها، الکتروفورز مویرگی، سنجش ایمنی، فلوسایتومتری، دست‌کاری سلولی، تقویتPCR ، تجزیه‌وتحلیل DNA و تشخیص بالینی ارائه می‌دهند. تراشه‌های میکروسیالی نیاز به مقادیر کمی از نمونه و معرف در مجاری خود برای جداسازی آسان، تشخیص و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها دارند. به دلیل کوچک‌سازی سیستم، قابل‌حمل است، هزینه را کاهش می‌دهد و نیازی به نیروی ماهر ندارد؛ بنابراین، میکروسیالات می‌توانند طیف وسیعی از نیازهای آزمایشگاهی را در یک تراشه واحد ارائه دهند و می‌توانند به‌عنوان دستگاه POC در تنظیمات بالینی مورداستفاده قرار گیرند. پلتفرم سری BV M (BioVeris Corp. Gaithersburg, MD) آنتی‌ژن را از طریق الکتروشیمیایی و ELISA تشخیص می‌دهد. این دستگاه قادر به تشخیص *E. coli* (O157)، *S. Typhimurium* *Yersinia* sp. و سموم است. تراشه‌های میکروسیالی با استفاده از شیشه، سیلیکون یا پلی دی متیل سیلوکسان طراحی‌شده‌اند که با مقادیر کمی از نمونه و معرف، تشخیص و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها را انجام می‌دهد. به دلیل کوچک بودن سیستم، قابل‌حمل است و از مزایای دیگر آن کاهش هزینه و عدم نیاز به نیروی ماهر است. بنابراین، میکروسیالات می‌توانند طیف وسیعی از نیازهای آزمایشگاهی را در یک تراشه واحد ارائه دهند و می‌توانند به‌عنوان دستگاه POC در تنظیمات بالینی مورداستفاده قرار گیرند. پلتفرم میکروسیالی می‌تواند با روش‌هایی مانند PCR، تکثیر ایزوترمال و ریزآرایه‌ها ادغام‌شده و به‌سرعت عوامل بیماری‌زا را تشخیص دهد (۲۱).

نتیجه‌گیری

در عصر حاضر تکنیک‌های مولکولی نقشی بزرگ در تشخیص تهدیدات بیولوژیک ایفا نموده‌اند و کیت‌ها و دستگاه‌های مختلفی برای تشخیص سریع تعدادی از عوامل تهدید بیولوژیک و تقویت برنامه آمادگی دفاع زیستی در سطح تجاری تولیدشده است که دارای تأییدیه سازمان غذا و داروی آمریکا نیز هستند. همچنین تکنیک‌های مختلفی مانند ریزآرایه‌ها نیز می‌توانند انقلابی در تشخیص عوامل تهدیدات زیستی ایجاد کنند، اما وقت‌گیر بوده و مقدار زیادی داده تولید می‌کنند که برای تفسیر به کارکنان ماهر نیاز دارد؛ بنابراین، دستگاه‌ها یا پلتفرم‌هایی باید طراحی شوند که علاوه بر قدرت تشخیص، طیف وسیعی از عوامل تهدیدکننده را پوشش داده، ساده، کاربرپسند، کم‌هزینه، کم جا و قابل‌استفاده در برنامه‌های مختلف نظارتی باشند. توسعه فناوری‌های بومی برای تشخیص عوامل تهدید بیولوژیک در آب، دام، انسان، غذا، دارو و محیط‌زیست از مهم‌ترین گام‌های ارتقای سطح امنیت ملی است که برای دستیابی به این هدف، تقویت و حمایت از تحقیقات در حوزه تشخیص تهدیدات زیستی، شناسایی و مهندسی فناوری‌های برتر دنیا در کشور ضروری است.

منابع

1- Prockop, L.D., 2006. Weapons of mass destruction: overview of the CBRNEs (chemical, bio- logical, radiological, nuclear, and explosives). J. Neurol. Sci. 249, 4–50.

2- Shariat, A., 2021. The role of passive defense against agroterrorism attacks in the field of natural resources (case study of fungal agents). Passive Defense Quarterly 13(1):65-77 [Farsi].

3- Karami, A., 2012. Passive Defense in New Warfare, Impact of Novel Technologies. Journal of nurse and physician whithin war, 37, 22-42.

4- Huang, Y., Wei, H., Shi, Y.Z., Raoul, H., Yuan, Z., 2012. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. Virol. Sin. 27, 273–812.

5- Cox, C.R., Jensen, K.R., Mondesire, R.R., Voorhees, K.J., 2015. Rapid detection of Bacillus anthracis by γ phage amplification and lateral flow immunochromatography. J. Microbiol. Methods 118, 6–51.

6- Environics Oy., 2018. ENVI assay system; biodefence tests. Environics Oy. https://www. environics.fi/product/envi-assay-system/. Accessed 20 Jun 2018.

7- Bravata, D.M., Sundaram, V., McDonald, K.M., Smith, W.M., Szeto, H., Schleinitz, M.D., Owens, D.K., 2004. Evaluating detection and diagnostic decision support systems for bio-terrorism response. Emerg. Infect. Dis. (1), 100–108.

8- Pal, V., Sharma, M.K., Sharma, S.K., Goel, A.K., 2016. Biological warfare agents and their detection and monitoring techniques. Def Sci J. 66:13.

9- McHugh, S., Burnell, S., Shenhav, S., Svarovsky, S., Manneh, V., 2010. Novel time resolved fluorescence platform for near patient diagnostics. Oak Ridge Conference, Capturing Innovation: The Impact of Emerging Diagnostic Technologies; April 22–23; San Jose, CA.

10- Sin, M.L.Y., Mach, K.E., Wong, P.K., Liao, J.C., 2014. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. Expert Rev Mol Diagn, 14:225–44.

11- Pardee, K., Green, A.A., Ferrante, T., Cameron, D.E., DaleyKeyser, A., Yin, P., Collins, J.J., 2014. Paper-based synthetic gene networks. Cell, 159:940–54.

12- Vidic, J., Manzano, M., Chang, C.M., Jaffrezic-Renault, N., 2018. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. Vet Res, 48:11.

13- Drosten, C., Göttig, S., Schilling, S., Asper, M., Panning, M., Schmitz, H., Günther, S., 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and viruses, Lassa virus, Crimean- Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. (7), 2323–2330.

14- Mourya, D.T., Yadav, P.D., Mehla, R., Barde, P.V., Yergolkar, P.N., Kumar, S.R., 2012. Diagnosis of Kyasanur forest disease by nested RT-PCR, real-time RT-PCR and IgM cap- ture ELISA. J. Virol. Methods (2), 49–54.

15- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M.H., Hadian, J., 2018. Metabolite profiling and molecular responses in a drought-tolerant savory, *Satureja rechingeri* exposed to water deficit. 3 Biotech, 8(11), 477.

16- Barzon, L., Lavezzo, E., Militello, V., Toppo, S., Palu, G., 2011. Applications of next-generation sequenc- ing technologies to diagnostic virology. Int J Mol Sci, 12:7861–84.

17- Kuroda, M., Sekizuka, T., Shinya, F., Takeuchi, F., Kanno, T., Sata, T., Asano, S., 2012. Detection of a possible bioterrorism agent, Francisella sp., in a clinical specimen by use of next-generation direct DNA sequencing. J Clin Microbiol, 50:1810–2.

18- Wang, C.H., Lien, K.Y., Wu, J.J., Lee, G.B., 2011. A magnetic bead-based assay for the rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification. Lab Chip, 11:1521–31.

19- Boriskin, Y.S., Rice, P.S., Stabler, R.A., Hinds, J., Al-Ghusein, H., Vass, K., Butcher, P.D., 2004. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. J Clin Microbiol. 42:5811–8.

20- Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature, 350:91–2.

21- Ong, S.E., Zhang, S., Du, H., Fu, Y., 2008. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. Front Biosci, 13:2757–73.

Development of Sensor Technologies and Molecular Techniques for Detecting Biothreat Agents

Shariat A.

Tehran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Research Institute of Forests and Rangelands of Iran

Abstract

In an age where the world is more complex and unpredictable than ever before, and environmental pollution, climate change, population growth, and war are on the rise, biothreats are considered a serious threat to the health of communities. The main step in dealing with such threats is early detection. The methods used in this field are mainly divided into three groups: genetic techniques, immunological, or a combination of two techniques (immunogenetic). There are also techniques based on the physicochemical properties of the analytes. Each of these assays can be performed by conventional methods (such as classical PCR, real-time PCR, or simple antigen-antibody reactions) or modern technologies (such as gene probes, microarray technology, gene chips, biosensors, aptamers, phosphors). There are also integrated and automated diagnostic systems that combine different methods to enable sampling, easy extraction of genetic material, and rapid analysis and detection of analytes using genetic and immunological techniques. The results of this study showed that among the existing devices for detecting biothreat agents, those molecular methods that have field and operational applications with high accuracy and speed have the priority for detecting biothreat agents and play an effective role in passive defense.

Keywords: Biothreat, Biosensor, Diagnostic, Imonology, Microarrey