Journal of Military Medicine
2020, Volume 22, Issue 5
Pages: 476-491
10.30491/JMM.22.5.476

New Methods for Identifying Microorganisms as potential bioterrorism agents with Emphasis on Chromatography-Mass Spectrophotometry (GC-MS): Narrative Review

Ruhollah Dorostkar [1], Sajad Khosravi [2], Ali Poormohammadi [3]*

[1] Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] School of Public Health, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran
[3] School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 22 June 2020 **Accepted**: 3 August 2020

Abstract

Today, with the development of microbiology, biotechnology, and cellular and molecular genetics, human knowledge of microorganisms has increased and the possibility of making biological weapons with pervasive effects has increased. On the other hand, bioterrorist events and the construction of laboratories and sites for the production of biological weapons in many developed and developing countries emphasize the need for rapid identification and determination of these bio-threatening agents. Accurate identification of such agents is important not only for the validation of a bioterrorism operation, but also for the timely implementation of appropriate measures for the biological agent to protect public health. As mentioned above, the biotheroism agents are very diverse and wide-ranging, hence it is always difficult and complex to identify these agents. Various methods have been introduced for detecting them. Some methods have been used for years, but some are still develoing. There are many problems in identifying and diagnosing bioterrorism agents, some of them are specific to one method, but some are common to all commonly used methods and developing methods. Therefore, this study aimed to investigate and review studies on the new methods of identifying microorganisms with bioterrorism potential from 2000 to 2020 as a review study.

Keywords: Bioterrorism, Chromatography, Mass-Spectrophotometry, Microorganism.

*Corresponding author: **Ali Poormohammadi**, Email: apoormohammadi000@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۲۲، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۹
صفحات: ۴۹۱-۴۷۶
10.30491/JMM.22.5.476

استفاده از روش‌های نوین شناسایی میکرواورگانیزم‌های عامل بیوتروریسم با تاکید بر کروماتوگرافی- اسپکتروفتومتری (GC-MS): مطالعه مروری

روح الله درستکار[۱]، سجاد خسروی[۲]، علی پورمحمدی[۳]*

[۱] مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۲] معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی بم، بم، ایران
[۳] دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

امروزه با توسعه علم میکروب‌شناسی، بیوتکنولوژی و ژنتیک سلولی و مولکولی، شناخت بشر از میکرواورگانیزم‌ها افزایش‌یافته و امکان ساخت سلاح‌های بیولوژیک با اثرات فراگیر را افزایش داده است. از سوی دیگر رویدادهای بیوتروریستی و ساخت آزمایشگاه‌ها و پایگاه‌های تولیدکننده سلاح‌های بیولوژیک در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه لزوم شناسایی و تشخیص سریع این عوامل تهدیدکننده زیستی تأکید می‌کند. شناسایی دقیق این‌گونه عوامل نه تنها برای تأیید یک عملیات بیوتروریسمی، بلکه برای انجام به موقع اقدامات مناسب متناسب با عامل بیولوژیک به‌کاررفته جهت محافظت از سلامت عمومی باید از اهمیت زیادی برخوردار است. عوامل بیوترویسم همان‌گونه که اشاره شد بسیار متنوع و وسیع الطیف هستند و از این رو شناسایی این عوامل همواره دشوار و پیچیده بوده و روش‌های بسیار متنوعی برای آنها وجود دارد. برخی از روش‌ها از سال‌های پیش مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند، اما برخی همچنان در حال توسعه هستند. در شناسایی و تشخیص عوامل بیوتروریسم مشکلات بسیار زیادی وجود دارد که برخی از آن‌ها مختص به یک روش بوده، اما تعدادی در همه روش‌های مورد استفاده و در حال توسعه مشترک می‌باشند. این مطالعه با هدف بررسی روش‌های نوین شناسایی میکرواورگانیزم‌هایی با پتانسیل بیوتروریسم در قالب یک مطالعه مروری که از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۰ انجام شده‌اند را بررسی می‌کند.

کلیدواژه‌ها: بیوتروریسم، کروماتوگرافی، اسپکتروفتومتری طیف‌سنج جرمی، میکرواورگانیزم.

*نویسنده مسئول: **علی پورمحمدی**. پست الکترونیک: apoormohammadi000@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۰۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۵/۱۳

مقدمه

امروز با توسعه علم میکروب‌شناسی، بیوتکنولوژی و ژنتیک سلولی و مولکولی، شناخت بشر از میکرواورگانیزم‌ها افزایش‌یافته و امکان ساخت سلاح‌های بیولوژیک با اثرات فراگیر را افزایش داده است. از سوی دیگر رویدادهای بیوتروریستی و ساخت آزمایشگاه‌ها و پایگاه‌های تولیدکننده سلاح‌های بیولوژیک در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه لزوم شناسایی و تشخیص سریع این عوامل تهدیدکننده زیستی تأکید می‌کند. شناسایی دقیق این‌گونه عوامل نه تنها برای تأیید یک عملیات بیوتروریسمی، بلکه برای انجام به موقع اقدامات مناسب متناسب با عامل بیولوژیک به‌کاررفته جهت محافظت از سلامت عمومی باید از اهمیت زیادی برخوردار است. در این راستا قابل‌ذکر است که یک سری از آزمایشگاه‌های میکرب‌شناسی بالینی که به شبکه پاسخ آزمایشگاهی دسترسی دارند، توسط مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (The Centers for Disease Control and Prevention: CDC) طراحی شده است تا راهنمایی‌های ساختاری برای تأیید، تشخیص و گزارش عوامل تهدیدکننده بیولوژیکی ارائه دهد (۱). شبکه پاسخ آزمایشگاهی بر اساس قابلیت آزمایش کردن عوامل بیوتروریسم و شناسایی آن‌ها به چهار سطح آزمایشگاهی ساخته تقسیم می‌شود: آزمایشگاه‌های سطح A: آزمایشگاه‌های بالینی استانداردی هستند که می‌توانند نمونه‌هایی از عوامل احتمالی بیوتروریسم را با استفاده از روش‌های کلاسیک تجزیه و تحلیل و در بیمارستان‌ها شناسایی کنند. این آزمایشگاه‌ها اولین خط تشخیص هستند و با عوامل احتمالی مانند باسیلوس آنتراسیس، یرسنیا پستیس و فرانسیسلا تولارنسیس آشنا می‌شوند. آزمایشگاه‌های سطح A تجزیه و تحلیل‌های تشخیصی را انجام می‌دهند که توسط CDC به آن‌ها ارائه می‌شود. آزمایشگاه‌های سطح B می‌توانند شناسایی جدا شده های مشکوک را تأیید کنند و معمولاً آزمایشگاه‌های بهداشت عمومی هستند. آزمایشگاه‌های سطح C از روش‌های مولکولی و روش‌های تایپینگ برای شناسایی بیشتر یا تأیید قطعی گونه‌های شناسایی شده از عوامل و سویه‌های عوامل بیوتررویسم استفاده می‌کنند. آزمایشگاه‌های سطح D واقع در CDC و موسسه تحقیقات پزشکی ارتش آمریکا در ارتش آمریکا قرار دارند و قادر به انجام تعیین خصوصیات ایزوله‌های بیوترویسمی در سطح بالا تحت شرایط خاص کنترل هستند. در این راستا، آزمایش‌ها مختلفی برای شناسایی و شناسایی عوامل تولید بیوتروریست پیشنهاد شده است. اگرچه بسیاری از این فناوری‌ها ادعا می‌کنند سریع، دقیق و قابل‌اعتماد هستند، اما تعداد کمی از آنها تحت شرایط مشابه واقعیت مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. ما در این مطالعه به بررسی تکنولوژی‌های موجود و در حال توسعه مستند به منظور تشخیص و شناسایی عوامل بیولوژیک که پتانسیل استفاده به سلاح بیولوژیک را دارند می‌پردازیم و مزایا و معایب ذکرشده آن‌ها را مورد بررسی قرار می‌گیرد (۲, ۳).

عوامل بیوتروریسم

در انتقال عوامل بیماری‌زای بیوتروریسم، انتقال ثانویه و بروز عفونت در محل‌های مورد حمله تأیید جزییات حمله را با مشکل مواجه می‌کند. برای محدود کردن عفونت و شیوع آن، شناسایی نوع عامل و روش‌های محدودکننده مانند واکسیناسیون و عوامل ضد میکروبی می‌تواند مهم باشد. به علاوه شرایط و موقعیت در نوع عوامل بیولوژیکی مورد استفاده به ویژه از نظر عفونت و انتقال آن و حدت و کشنده بودن می‌تواند موثر باشد. وزارت بهداشت و خدمات انسانی ایالات‌متحده آمریکا (CDC) عوامل بیولوژیکی را در سه دسته اصلی طبقه‌بندی کرده است (A-C). گروه A شامل عواملی با بالاترین درجه اهمیت و پرخطرترین دسته هستند به دلیل اینکه به راحتی انتشار می‌یابند و یا از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شوند و پتانسیل ایجاد مرگ‌ومیر بسیار بالایی دارند و تأثیر مهمی بر بهداشت عمومی دارند (۴). عوامل گروه B دومین گروه دارای اولویت هستند، انتشار نسبتاً آسان در نظر گرفته شده است و اگرچه به نظر می‌رسد که میزان مرگ‌ومیر در این گروه کمتر است، بسیار ناتوان‌کننده هستند و شیوع و بیماری در آنها متوسط است. گروه C عوامل بیماری‌زای در حال ظهور که ممکن است برای انتشار گسترده در میان توده مردم در آینده طراحی‌شده باشند به دلیل تولید راحت و در دسترس بودن و همچنین پتانسیل شیوع و مرگ‌ومیر بالا (۵).

روش‌های تشخیص باکتری‌های مورد استفاده در بیوتروریسم

تشخیص وجود جمعیت کمی از گونه‌های باکتریایی فردی در یک نمونه از یک محیط طبیعی یا در نمونه‌های بالینی معمولاً یک فرایند وقت‌گیر است که شامل رشد در محیط انتخابی و اغلب جداسازی و شناسایی بعدی ارگانیسم با روش‌های مناسب می‌شود. مرحله شناسایی نیز اغلب یک عمل زمان بر است، زیرا برخلاف ارگانیسم های بالاتر، مورفولوژی نمی‌تواند به عنوان تنها معیار شناسایی باکتری‌های واقعی استفاده شود. در حالت ایده آل، روش جداسازی، تمرکز، و خالص‌سازی باید به عنوان هدف اصلی مد نظر و قابل‌استفاده برای همه نمونه‌ها برای انواع آنالیت های هدف باشد. به علاوه روش آماده سازی نمونه باید به گونه‌ای باشد که بتواند به سرعت ماتریکس نمونه را که باعث تداخل در شناسایی عامل هدف می‌شود را حذف نماید و آنالیت یا عامل هدف را تغلیظ کند. اما در حال حاضر اکثر روش‌های آماده سازی نمونه همه موارد فوق را نمی‌توانند انجام دهند و این روش‌ها معمولا وقت‌گیر بوده و محدود به انواع خاصی از نمونه‌هاست. در حال حاضر بسیاری از روش‌های آماده سازی نمونه تحت آزمایش هستند. این روش‌ها شامل دست کاری شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی نمونه هستند (۱۶).

مشکلات شناسایی عوامل بیوترویسم

عوامل بیوترویسم همان‌گونه که اشاره شد بسیار متنوع و وسیع‌الطیف هستند و از این رو شناسایی این عوامل همواره دشوار و پیچیده بوده و روش‌های بسیار متنوعی برای آنها وجود دارد. برخی از روش‌ها از سال‌های پیش مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند، اما برخی همچنان در حال توسعه هستند. در شناسایی و تشخیص عوامل بیوتروریسم مشکلات بسیار زیادی وجود دارد که برخی از آنها مختص به یک روش بوده، اما تعدادی در همه روش‌های مورد استفاده و در حال توسعه مشترک می باشند. امروزه روش‌هایی مورد توجه قرار دارند که توانایی شناسایی طیف وسیعی از عوامل بیولوژیک با پتانسیل کاربرد در بیوترویسم به صورت همزمان داشته باشد. این وسایل بایستی قابل‌حمل بوده، کاربری ساده داشته باشند و پیچیده نباشند. روش‌هایی که تا کنون ارائه شده‌اند ممکن تعدادی از این ویژگی‌ها را فراهم نمایند اما همگی آن‌ها ارائه نمی‌دهند (۷-۹). یکی دیگر از فاکتور بسیار مهم در روش‌های شناسایی عوامل بیوتروریسم حساسیت مناسب روش پیشنهادی است، اکثر روش‌های متداول حساسیت‌های پایین تا متوسطی را ارائه می‌دهند به تحوی که کمترین غلظت این عوامل را شناسایی و تعیین مقدار نمایند. این موضوع در بحث عوامل شیمیایی مورد استفاده در تروریسم اهمیت ویژه‌ای می یابد. از این رو در این مطالعه با هدف بررسی روش‌های نوین شناسایی میکرواورگانیزم‌هایی با پتانسیل بیوتروریسم در قالب یک مطالعه مروری که از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۰ انجام شده‌اند را بررسی می‌کند. برای این منظور کلیه مقالات مرتبط در پایگاهای اطلاعاتیWeb of sciences، Scopus، Pubmed و Magiran استخراج گردید. با توجه به گسترده بودن مطالب از کلید واژه های مختلف و استراتژی جست جوی متغیری در هر بخش استفاده گردید.

روش‌های شناسایی عوامل بیوتروریسم

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) که مخفف آن PCR می‌باشد در زیست‌شناسی مولکولی است و به منظور تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص به تعداد هزار یا میلیون‌ها نسخه به کار می‌رود. این تکنیک ابزاری آسان و ارزان‌قیمت برای تکثیر یک قطعه خاص از DNA است و برای اهدافی همچون تشخیص و نظارت بر بیماری‌های ژنتیکی، شناسایی عوامل بیولوژیک و شناسایی مجرمان (در پزشکی قانونی) و مطالعه عملکرد یک بخش هدف از DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰). PCR روشی فوق‌العاده حساس برای سنجش توالی اسید نوکلئیک، با حد تشخیص اثبات‌شده از یک کپی هدف واحد است. طبیعت و قابلیت اطمینان PCR آن را به یک روش استاندارد طلایی مورد استفاده در اکثر غربالگری نمونه‌ها و تقویت در تشخیص اسید نوکلئیک در میزبان قالب‌های مختلف مورد سنجش تبدیل کرده است. PCR همچنین دارای انواع عملکردی زیادی است، از جمله (qPCR) و RT-PCR که رونوشت‌های RNA یا ژن‌های RNA ویروسی را به یک الگویDNA تبدیل می‌کند (۱۴،۱۳). با توجه به ماهیت کمی qPCR، اغلب برای استفاده در سنجش‌های زیستی نسبت به PCR استاندارد مطلوب تر است. در qPCR، یک سیگنال fluorescent تولید می‌شود و به طور متناسب افزایش می‌یابد. این روش به عنوان یک روش متداول در شناسایی عوامل میکروبی حتی با پتانسیل استفاده در بیوتروریسم، می‌تواند تعداد ۱۰ ارگانیسم یا کم تر را در مدت زمان کوتاهی شناسایی کند. هر چند که PCR برای آنالیز یک نمونه عاری از آلودگی می‌تواند استفاده شود و جهت شناسایی توکسین‌های میکروبی و سایر مواد غیرنوکلوئیکی قابل استفاده نیست، که یک محدودیت عمده این روش در نظر گرفته می‌شود (۱۱،۱۲). بنابراین این روش عمدتاً قابلیت کاربرد برای ویروس‌ها با ژنوم RNA را ندارد.

PCR رونویسی معکوس

از میان روش‌های مختلف PCR که در قسمت پیشین اشاره گردید، RT -PCR ، همچنین با عنوان Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) شناخته می‌شود، نوعی تغییر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که به طور معمول میزان بیان RNA را اندازه‌گیری می‌کند. بنابراین به طور اختصاصی می‌تواند برای ویروس به کار گرفته شود. در RT-PCR، DNA تکمیلی (cDNA) با رونویسی معکوس از الگوهای RNA با رونوشت کردن معکوس انجام می‌شود. این روش برای مطالعه کیفی بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌تواند با کمترین میزان PCR (qPCR) برای تعیین سطح RNA ترکیب شود. RT-PCR در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی برای مطالعه بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد، به عنوان مثال در آزمایش‌ها برای تمایز اگزون از اینترون‌ها، و می‌توان از نظر بالینی برای تشخیص بیماری‌های ژنتیکی و نظارت بر داروهای درمانی استفاده کرد (۱۵،۱۴). RT-PCR برای تولید محصولات RT-PCR به یک الگوی RNA، آنزیم، نوکلئوتیدها، بافر و گرماسنجان نیاز دارد. کیت‌ها برای ساده‌سازی روند موجود هستند. این روش امروزه به صورت گسترده مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته و مطالعات و آزمایشات بالینی به عنوان تست استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این راستا در یک مطالعه در سال ۲۰۰۶ از روش RT-PCR برای شناسایی Poxvirus استفاده گردید و گزارش شد که ترکیبی از کشت سلولی و تشخیص RT-PCR، امکان تشخیص بسیار سریع و زودرس مقادیر ذرات پوگزویروس عفونی را در یک نمونه مشکوک ممکن می‌کند (۱۳).

در یک مطالعه در سال ۲۰۱۷ یک روش RT-PCR ساده برای تشخیص سریع ویروس RNA در یک SBPH منفرد و بدون

مرحله جداسازی سخت RNA استفاده‌شده است. این تکنیک می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای روش سنتی RT-PCR ارائه شود (۱۴). درحال‌حاضر، SARS-CoV-2، آزمایش سرویس سلامت همگانی (NHS) برای تشخیص ویروس عامل کوید ۱۹، مبتنی‌بر تکنیکی است که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) خوانده می‌شود. این تکنیک می‌تواند مواد ژنتیکی ویروس را در نمونه‌های گرفته‌شده از بینی یا دهان فرد تشخیص دهد. این روش کارایی بسیار زیادی دارد؛ اما نتیجه‌ی آزمایش فقط زمانی مثبت می‌شود که ویروس هنوز در بدن فرد موجود باشد (۱۵).

الایزا (ELISAs)

برای شناسایی این عوامل و ارگانیسم ها از روش‌هایی Immunoassays وELISAs نیز استفاده می‌گردد. تکنیک الایزا در واقع خلاصه کلمه Enzyme-linked immunosorbent است و یک روش غربالگری که به طور عمده در علم بیوشیمی استفاده می‌گردد. این تکنیک در ابتدا برای کنترل کیفیت گیاه شناسی استفاده شد، سپس به عنوان روشی برای تشخیص بیماری های عفونی به کار گرفته شد. الایزا امروزه به عنوان یک تکنیک استاندارد برای کشف ویروس در خون انسان استفاده می‌شود هر چند که در این روش شناسایی مستقیم ویروس دنبال نمی‌شود بلکه پادتن‌های که در بدن شخص به حضور ویروس تولید می‌گردد را شناسایی می‌کند. (۱۰،۱۶). در مطالعه Collins و همکاران روش Immunoassays بر روی مدل های انسان و موش انجام شد که بر اساس واکنش آنتی ژن آنتی بادی در سیستم ایمنی مهره داران برای مقابله با عامل خارجی و مهاجم برای محدود کردن عفونت می‌باشد. این پروسه با نوترکیبی ژنتیکی دومین (domain) متغیر آنتی بادی برای باند شدن با انتی ژن کد می‌شود و درجه بالایی از اختصاصیت را دارد (۱۷). این خاصیت آنتی بادی ها باعث شده است که آن‌ها اجزای ارزشمندی از سنجش‌های مختلف ایمنی که به طور معمول برای تحقیقات علمی، تشخیص بالینی و به عنوان روش درمانی مطرح شوند. علاوه بر سنجش ها فقط بر روی اتصال آنتی بادی، مانند آگلوتیناسیون و ELISA، آن‌ها همچنین به طور گسترده ای در تکنیک های مبتنی بر سطح مانند SPR و همچنین رویکردهای مبتنی بر NP مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸). در میان تست های ایمنولوژی تست الایزا به طور گسترده در سراسر دنیا برای اندازه‌گیری پروتئین‌های ترشحی از میکرواورگانیزم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. الایزا یک سیستم ساده و چند بعدی است که امکان تعیین و اندازه‌گیری پادتن های تولیدی توسط میکرواورگانیزم هه را فراهم می آورد. از مزایای الایزا در مقایسه با روش PCR می‌توان به سرعت بالا، هزینه کم و عدم نیاز به امکانات خاص آزمایشگاهی می‌توان اشاره کرد (۱۹). در مطالعات گذشته نیز از روش الایزا (ELISA microarray assay) برای شناسایی همزمان چندین توکسین باکتریایی با پتانسیل بیروترویسم با دقت و حساسیت بالا به کاربرده شده است هر چند که تعداد مطالعات در این زمنیه بسیار محدود است (۲۰). همچنین در یک مطالعه از روش الایزای توسعه داده شده جهت شناسایی پادتن های اختصاصی بولوتونیوم نوروتوکسین استفاده‌شده است (۲۱).

روش توالی یابی کل ژنوم (WGS)

روش توالی یابی کل ژنوم که به صورت کامل با نام انگلیسی Whole Genome Sequencing معرفی می‌شود در کنار PCR یکی از مهم‌ترین پیشرفتهای علمی قرن گذشته است. اگرچه برای اجرای نمونه‌های بزرگ و یا نظارت مداوم بر روی محیط زیست، هنوز زمان گیر و پر هزینه باقی مانده است، اما فناوری توالی با سرعت باورنکردنی با کاهش هزینه، افزایش طول خواندن، و توان تولید نمونه با سرعت تقریبا نمایی در حال توسعه است (۲۲). این تکنیک بر مبنای تعیین توالی کل ژنوم یک ارگانیسم در واحد زمان است. تعیین توالی اغلب به عنوان مرز اصلی بعدی در طراحی و توسعه بیوسنسور در نظر گرفته شود، که قادر به ارائه توالی و هویت دقیق هر عامل بیماری زا است. این اغلب حیاتی است، زیرا بسیاری از ارگانیسم های عامل سلاح‌های بیولوژیک از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها، دچار تحول ژنتیکی سریع می‌شوند و دارای تنوع زیادی هستند و در نتیجه تغییرات مهمی در ژنوم زیربنایی ایجاد می‌شود و باکتری به سمت سویه‌های کشنده تر تکامل می یابد (۲۳). توالی Sanger روش اصلی برای تعیین توالی DNA بوده است اگرچه آهسته و پرهزینه است. پس از توالی ارگانیسم، توالی ژنومی آن می‌تواند به عنوان مرجع مورد استفاده برای تعیین تغییرات در ژنوم جهش یافته، نوع و سایر خصوصیات ژنتیکی استفاده شود (۲۲). در یک مطالعه در سال ۲۰۱۱ توسط Segerma و همکاران بر روی استفاده از روش توالی یابی کل ژنوم به عنوان یک روش سریع و دارای حساسیت برای شناسایی عوامل ترور بیولوژیک در مواد غذایی و حتی زنجیره غذایی به کار گرفته شد. در این مطالعه از یک تکنیک به نام دیاگرام هات پلیت گرمایی برای ترسیم و تجسم توالی ژنوم باکتری‌های زنده کلستریدیوم بوتولیسم و باسیلوس انتراسیس به عنوان دو عامل بیولوژیک با پتانسیل استفاده در بیوتروریسمبا عملکرد مناسب استفاده شد (۲۴).

گاز کرماتوگرافی-اسپکترومتر جرمی (GC-MS)

کروماتوگرافی گازی (GC) در سال ۱۹۵۲ به وسیله جیمز و مارتین برای جدا کردن مقادیر کم اسیدهای چرب به‌کاربرده شد. یک روش فیزیکی است که برای جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات آلی فرار به‌کاربرده می‌شود. این دستگاه عمدتاً برای جداسازی ترکیبات آلی فرار به کار می‌رود هر چند که با تعویض آشکار ساز می‌تواند برای ترکیبات غیر آلی نظیر اکسید های نیتروژن استفاده گردد. روش مذکور اولین بار توسط یک دانشمند روسی برای جداسازی رنگدانه‌های گیاهی استفاده شد. در

کرماتوگرافی گازی فاز متحرک یک گاز می‌باشد که گاز حامل نامیده می‌شود تنها نقش گاز حامل در کرماتوگرافی گازی حمل مواد به جلو و خارج کردن آن‌ها به خارج از ستون است. در واقع فاز متحرک هیچ نقش مستقیمی در جداسازی ترکیبات نداشته و یکی از تفاوت‌های کرماتوگرافی مایع و گاز همین موضوع می‌باشد. گاز حامل باید یک گاز بی‌اثر باشد تا با فاز ساکن، حلال و یا نمونه واکنش ندهد، به همین دلیل معمولاً از نیتروژن یا هلیم استفاده می‌شود. در دمای ثابت، فشار و سرعت جریان گاز به طرف ستون را با تنظیم کننده‌ی فشار و جریان سنج، ثابت نگه می‌دارند (۲۵, ۲۶). جدا شدن مواد در ستون، نظیر فرایند استخراج است. نمونه که در فاز گاز محلول است از بالای ستون وارد می‌گردد و اجزای آن بر حسب ضریب توزیع خود بین دو فاز مایع و گاز تقسیم می‌شوند. در نتیجه اجزای موجود در نمونه بر حسب تمایلی که ستون برای نگهداری آن‌ها دارد از یکدیگر جدا شده و به وسیله عبور گاز حامل، اجزا جدا می‌شوند و به ترتیبی که متناسب با عکس تمایل نگهداری ستون برای آن‌ها است، از انتهای ستون خارج شده، وارد آشکارساز می‌گردند. در آشکارساز اجزاء جدا شده موجود در گاز حامل مورد شناسایی و اندازه‌گیری قرار می‌گیرند. همان‌گونه که پیش تر نیز اشاره شد انواع مختلف آشکار ساز وجود دارد که برای ترکیبات مختلف طراحی شده‌اند. در کرماتوگرافی گازی ستون نقش قلب دستگاه را ایفا می‌کند و با تغییرات دمایی می‌تواند سبب جداسازی ترکیبات هدف گردد. دمای ستون GC را می‌توان روی دمای خاصی تنظیم کرده و به صورت هم دما جداسازی را انجام داد. همچنین در برخی موارد که اجزای نمونه در ستون به خوبی جدا نمی‌شوند، برای جداسازی بهتر از روش برنامه‌ریزی دمایی استفاده می‌شود. در این روش دمای ستون را طبق برنامه‌ای از پیش تعیین شده و با سرعتی مناسب افزایش می‌دهند تا مواد به تدریج از یکدیگر جدا شوند. برخی از کاربردهای مهم کروماتوگرافی گازی (GC)در فناوری نانو عبارتست از جداسازی و شناسائی برخی از ترکیبات آلی، تعیین ساختار ترکیبات آلی در لاستیک و آنالیز برخی داروهای نانو ذرات (۲۵).

طیف‌سنجی جرمی (MS) روش تجزیه‌ای است که از آن می‌تواند اطلاعات کمی و کیفی درباره وزن مولکولی و ساختار مولکولی ترکیبات آلی و معدنی به دست آورد. این روش می‌تواند در تجزیه کمی و کیفی نمونه‌ها و تعیین مواد آلی مختلف مورد نظر محققان مورد استفاده قرار بگیرد. با استفاده از این تکنولوژی می‌توان مخلوط گازها، مایع ها و در برخی موارد مخلوط جامدات را به طور کمی تجزیه نمود. عموماً از یک نرم‌افزار برای تکمیل تجزیه می‌توان استفاده نمود (۲۶،۲۷). این روش تجزیه کمی را با غلظت‌های در سطح ppb در دسترس قرار می‌دهد. در GC-MS پمپ‌ها قادر هستند خلاء مورد نیاز برای عملکرد مناسب طیف‌سنج جرمی که در محدوده ۶-۱۰ تور است را فراهم نمایند. این خلاء برای جلوگیری از برخورد الکترون ها و اتم های تشکیل‌شده با مولکول‌های هوا و از بین رفتن آن‌ها قبل از برخورد با شناساگر ایجاد می‌شود. و حدواسط بین کرماتوگرافی گازی و طیف‌سنج جرمی قرارگرفته و نمونه‌ها رو از ستون کرماتوگرافی گازی به طیف‌سنج جرمی منتقل می‌کند (۲۷). در محفظه یونیزاسیون از یک منبع الکترونی به مولکول‌های واردشده به محفظه بمباران الکرتونی می‌شوند که در خلاء بسیار بالا سبب یونیزاسیون آن‌ها می‌گردد. و قطعات یونی مختلف به وجود می‌آید. یون‌های تولیدی ممکن است تک بار، چند بار یا بار مثبت و منفی باشند. در تجزیه گر جرمی، یون‌ها با توجه به نسبت جرم به بار شان (M/Z) جداسازی می‌شوند. یک تجزیه گر جرمی‌آیده آل باید توانایی جداسازی جرم های جزیی را دارا باشد و امکان عبور تعداد کافی از یون‌ها را بدهد تا به شدت جریان‌های قابل اندازه‌گیری منجر شود. چندین آشکارساز برای طیف‌سنج های جرمی به طور تجاری موجود است، که از میان آن‌ها آشکار ساز تکثیر دهنده الکترون (electron multiplier) بیش‌ترین کاربرد را دارد. یون‌های عبوری از تجزیه گر جرمی با استفاده از لنز های متمرکز از مسیر مستقیم عبوری از تجزیه گر منحرف شده و به سطح شناساگر برخورد می‌کند. ذرات گامای تولیدی در منبع یونیزاسیون الکترونی، توسط این لنز ها تغییر مسیر نمی‌دهند، و به شناساگر نمی رسند، زیر رسیدن این پرتو ها به شناساگر سبب ایجاد سیگنال های کاذب می‌شود. یون‌ها پس از برخورد با شناساگر الکترون های تولیدی را بیرون پرتاب می‌کند و با هر برخورد تا الکترون های بیشتری تولید می‌شود که در نهایت جریان قوی قابل اندازه‌گیری تولید می‌کند (۲۸).

GC-MS یکی از بهترین نمونه‌های رویکرد مبتنی بر ابزار دقیق، مدتهاست که برای تعیین گونه‌های شیمیایی موجود در یک نمونه استفاده می‌شود. بر خلاف رویکردهای دیگر در این گروه، MS بر اساس نسبت ذرات به بار (ذرات در واحد) ذاتی خود، مولکولهای (زیستی) را ردیابی می‌کند، که امضای بیوشیمیایی بی نظیری را برای هر زیست سنجی فراهم می‌کند. MS سنتی شامل سه مرحله می‌باشد. ابتدا ، آنالیت های (زیستی) به MS وارد می‌شوند و برای تبدیل به گاز از طریق منبع یونیزاسیون به یونها تجزیه می‌شوند. سپس آنالایزر جرم یون‌های حاصل را بر اساس نسبت m/z خود، که بطور رسمی توسط یک آشکارساز خوانده می‌شوند جدا می‌کند. با توجه به ماهیت تخریب مولکولی، ابزار اولیه MS برای مولکول‌های کوچک که الگوهای تخریب آن‌ها نسبتاً ساده بود، به خوبی کار می کردند. با این حال، یونیزاسیون خشن منجر به تخریب نامنظم و غیرقابل‌اعتماد برای زیست مولکول‌های بزرگتر مانند پروتئین‌ها شد. بنابراین، دو روش یونیزاسیون نرم برای جای دادن به این مولکولهای زیستی، دفع جذب/یونیزاسیون لیزر با کمک ماتریس (MALDI) و یونیزاسیون الکتروپری (ESI) انجام شد (۲۲). در MALDI ، بیوانالیت در یک ماتریس تعبیه شده است که پس از آن برای تولید یونها تحت تابش قرار می‌گیرد، در حالی که در ESI ، آنالیت در یک حلال حل می‌شود، که از طریق

مویرگی عبور داده می‌شود و در معرض ولتاژ بالا قرار می‌گیرد و پس از آن به گاز یونیزه شده تبدیل می‌شود. این سیستم ها غالباً با آنالایزر زمان گازی شدن (time-of-flight)(TOF) همراه می‌شود. از آنجا که میزان عبور آنالیتهای (زیستی) از طریق ردیاب متناسب با نسبت m/z است از این رو امکان‌پذیر است که بیوانالیت ها را بر اساس مدت زمان حضورشان از طریق ردیاب جدا کرد. تهدیدات بیولوژیکی در بیوتروریسم در سال‌های اخیر نشان دهنده نیاز به حسگر های زیستی است که قابلیت شناسایی و تشخیص عوامل خطر آفرین در زمینه بیوتروریسم را داشته باشد. این شناسایی بر پایه آشکار سازی پروب های مولکولی در آشکارساز با سیستم آنالایزر مخصوص می‌باشد. آنالیت های قابل‌شناسایی می‌تواند شامل سلول‌های باکتریایی، قارچ‌ها، ذرات ویروسی و یا مولکول‌های خاص مانند توکسین های پروتئینی یا مواد شیمیایی تولیدشده از آن‌ها باشند. همچنین توالی اسیدهای نوکلئیک و پپتیدها نیز به عنوان کاوشگر های زیستی مورد استفاده قرار میگیرند (۲۹, ۳۰).

تا به امروز تکنیک های کروماتوگرافی گازی برای کشف یا شناسایی میکرواورگانیزم‌ها تا حدی به‌کاررفته اند. بنابراین، گارنر روشی در سال ۱۹۶۵ را ارائه داد که شامل توصیف کروماتوگرافی از محصولات پیرولیز باکتری‌ها یا مواد با منشا بیولوژیکی، توسترون‌ها بود (۳۱). Yamakawa و Ueta امکان استفاده از خصوصیات کروماتوگرافی گازی اسیدهای چرب سلولی و کربوهیدرات ها را در طبقه‌بندی باکتری‌ها نشان دادند (۳۲). رویکردی برای تشخیص سریع یا تمایز میکرواورگانیزم‌ها که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته است شامل استفاده از کروماتوگراف گازی با ردیاب های بسیار حساس برای شناسایی محصولات باکتریایی است که یا فرار هستند یا می‌توانند به مشتقات فرار تبدیل شوند. بسیاری از ترکیبات فرار در طی رشد آن‌ها توسط میکرواورگانیزم‌ها سنتز می‌شوند (۳۳)، و آشکارسازهای حساس ممکن است در تشخیص حضور تعداد کمی از باکتری‌ها با تشخیص تولید محصولات خاص مفید باشند. چنین روش‌هایی ممکن است در تشخیص باکتری‌ها نیز کاربرد داشته باشد. بسیاری از گونه‌های میکرواورگانیزم‌ها، احتمالاً بیشتر، ترکیبات غیر معمول یا احتمالاً بی نظیری را تشکیل می‌دهند. پیرولیز همراه با کروماتوگرافی گازی نیز به منظور تمایز بین باکتری‌های جنس میکروبی فردی، گونه‌ها یا سویه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. به عنوان مثال ترکیباتی که در غلظت های کم اثر سمی بر حیوانات یا گیاهان دارند، بو ایجاد می‌کنند و یا این ها را مهار می‌کنند. بنابراین میکرواورگانیزم‌ها، بسیاری از آنتی بیوتیک ها یا سموم حیوانات تنها توسط سویه‌های منتخب یک گونه جداگانه یا توسط چند گونه از جنس واحد تولید می‌شوند و برای مثال بوی خاک معمولاً مشخصه خاص اکتینومیست ها است. به دلیل حساسیت برخی از آشکارسازهای به‌کاررفته در کروماتوگراف گازی، ممکن است ابداعی برای تشخیص ترکیبات منحصربه‌فرد در عین حال ناشناخته طراحی شود که ممکن است به عنوان ابزاری اضافی یا سریع برای تشخیص و طبقه‌بندی باکتری‌ها باشد (۳۴).

عملکرد چندگانه همزمان برای سه توکسین مورد استفاده در بیوتروریسم در مطالعه Alam مورد بررسی قرار گرفت، که این روش‌ها شامل گروماتوماتوگرافی فاز مایع با کارایی بالا و الکترویونیزاسیون به همراه mass spectrometry(RP-HPLC - MS/MS) به صورت انتقالی یا جایگزین بوده است. در این مطالعه سه پپتید مختلف با یون‌های دو قطعه ای از نظر تعداد و تأیید نوع آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند که هریک از این توکسین ها با یکی از سه روش تأیید شدند(۳۵). همچنین مطالعات دیگری MS را یک تکنولوژی دارای حساسیت بسیار بالا و کاربردی برای کشف توکسین های احتمالی در بیوتروریسم از مواد غذایی تأیید کردند که استفاده از این روش در سال‌های اخیر کاربرد بیشتری داشته است (۳۶–۳۹).

اسیدهای چرب سلولی خاص مهم‌ترین نشانگرهای شیمیایی هستند که اغلب در طبقه‌بندی باکتری‌ها و طبقه‌بندی مورد استفاده قرار می‌گیرند. سیستم شناسایی میکروبی تجاری مبتنی بر کروماتوگرافی گازی توسط Identification System (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 U.S.A توسعه‌یافته و بانک اطلاعاتی از پروفایل های اسیدهای چرب سلولی باکتریایی را فراهم می‌کند. با این حال، این روش چند محدودیت جدی دارد. اولین مورد مرتبط با شرایط کشت میکرواورگانیزم هدف است که ارگانیسم باید در شرایط رشد استاندارد کشت داده شود. این نیاز به دلیل این واقعیت است که ترکیب اسیدهای چرب تحت تأثیر محیط رشد و دمای انکوباسیون قرار دارند (۴۰). دوم، آماده سازی نمونه برای این روش شامل چندین مرحله وقت‌گیر و پیچیده است (یعنی صابون‌سازی، متیلاسیون، استخراج و شستشو). با وجود این محدودیت‌ها، Krejci و Kroppenstedt (۲۰۰۶) با استفاده از این روش تجاری، اسیدهای چرب خاصی را توصیف کردند که منحصربه‌فرد برای گونه‌های Burkholderia هستند و به طور بالقوه می‌توانند برای تشخیص و تمایز آن‌ها استفاده شوند (۴۰). لازم به ذکر است که استفاده از آنالیزور MS به عنوان یک سیستم قدرتمند در شناسایی عوامل بیولوژیک بر مبنای ترکیبات تولیدی از آن‌ها معرفی شده است، اما همواره این روش نیاز به مراحل خاصی جهت آماده سازی نمونه‌یا ماتریکس دارد (۴۱). در روش‌های آنالیز نمونه‌ها با MS، نمونه‌ها معمولاً نیاز به مراحل اضافی نظیر استخراج کردن و به ویژه تغلیظ سازی آنالیت هدف‌دارند. این امر به ویژه در تشخیص عفونت‌های باکتریایی در سلول‌های کل که در آن پاتوژن هدف فقط در مقادیر بسیار جزیی در ماتریکس های پیچیده از باکتری‌ها و سایر مواد اسید نوکلئیک موجود در نمونه‌های بیولوژیکی یا محیطی وجود دارد، بسیار مهم است. کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی مایع (LC) که

از برجسته‌ترین راه‌هایی هستند که با استفاده از MS می‌توان نمونه‌های غلیظ شده را از قبل جداسازی و آماده کرد که در نهایت توسط MS شناسایی و تعیین مقدار گردد (۴۲-۴۴).

کرماتوگرافی مایع-اسپکترومتر جرمی (LC-MS)

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography) یکی از روش‌های مهم در علم شیمی است که برای جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری مقادیر کم از مواد مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس جداسازی در روش‌های کروماتوکرافی تمایل نسبی هر جز به فاز ساکن به هنگام عبور فاز متحرک بر روی فاز ساکن است. به این صورت که گونه‌ای که تمایل بیشتری به فاز ساکن دارد با سرعت کمتری در طول ستون حرکت می‌کند و گونه‌ای که تمایل بیشتری به فاز متحرک دارد با سرعت بیشتری از ستون عبور می‌کند. کرماتورگافی مایع با عملکرد عالی عمدتاً برای شناسایی درشت مولکول‌های آلی به‌کاربرده می‌شود. در این مطالعه استفاده از کرماتوگرافی مایع با عملکرد عالی مجهز شده به اسپکترومتر جرمی به دلیل توانایی شناسایی مواد بیوسنتز تولیدی از میکرواورگانیزم‌ها است که به واسطه آن‌ها می‌توان نوع میکرواورگانیزم را شناسایی کرد (۴۵). کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در حالت دناتوره (DHPLC) یک رویکرد جدید و امیدوارکننده برای تجزیه و تحلیل، نظارت و شناسایی باکتری‌ها است. این یک فناوری خودکار است که باعث جداسازی محصولات PCR با استفاده از یک سیستم جفت-یون فاز معکوس سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (IP RP HPLC) می‌شود. نقش اصلی کروماتوگرافی در این زمینه در تهیه و غنی‌سازی نمونه است، اما نشان داده می‌شود (D-HPLC) با استفاده از یک روش اندازه‌گیری موثر ابزاری موثر برای اندازه‌گیری مواد بیوسنتز است. این روش در درجه اول برای تشخیص تغییرات توالی DNA استفاده می‌شود. مانند درج، حذف، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژنومی (SNPs)، و میکروساتلیت ها (۴۵). در مطالعه Barlaan برای مشخص کردن تمایز ژنی در 16S rRNA در سویه‌های باکتریایی بر اساس اثرگذاری و حساسیت آن برای تعیین و تمایز سکانس های ژنتیکی مختلف استفاده شد (۴۶).

تکنیک جذب و یونش لیزری با ماتریکس(MALDI)

در طیف‌سنجی جرمی تکنیک جذب و یونش لیزری با ماتریکس که با نام انگلیسی matrix-assisted laser desorption/ionization شناخته می‌شود یک تکنیک یونیزاسیون است که از انرژی لیزر با جذب ماتریکس برای ایجاد یون از مولکول‌های بزرگ با کمترین میزان تجزیه استفاده می‌شود. امروزه روش جذب و یونش لیزری با ماتریکس در ترکیب با سایر روش‌ها نظیر اسپکترومتر جرمی جهت شناسایی دقیق میکرواورگانیزم‌ها توسعه‌یافته است. در این راستا روش-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry یا MALDI-TOF MS روشی است که اخیراً به عنوان یک تکنیک قدرتمند برای شناسایی میکرواورگانیزم‌ها ظهور کرده است. در این تکنیک با استفاده از تابش نور لیزر، نمونه‌ها با وزن مولکولی بالا بدون احتمال تفکیک مولکول قابل‌شناسایی هستند در این روش نمونه‌ی محلول با یک نسبت مشخص در یک ماتریکس مناسب رقیق می‌شود. سپس با قرار گرفتن روی یک صفحه فلزی در معرض تابش نور لیزر قرار می‌گیرد و با انتقال الکترون، نمونه به صورت یون مثبت در می‌آید. سپس یون‌ها وارد محفظه فضای پرواز طیف‌سنج می‌شوند. از تکنیک MALDI-TOF MS برای شناسایی بیو مولکول‌ها (همانند پروتئین‌ها، پپتیدها، DNA و...)، مولکول‌های آلی بزرگ (همانند پلیمرها و دندریمرها) و سایر ماکرو مولکول‌ها استفاده می‌شود (۴۷, ۴۸). در مقایسه با روش‌های تشخیصی معمول در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی که بر تست های بیوشیمیایی استوار هستند و نیاز به زمان انکوباسیون طولانی دارند، این روش مزیت تشخیص باکتری‌ها و قارچ‌ها به طور مستقیم از کلونی باکتری‌ها و قارچ‌های رشد یافته در محیط کشت را دارد. تشخیص در این روش طی چند دقیقه و با مراحل ساده اتفاق می‌افتد. قسمتی از کلونی میکروب نامشخص در هدف نمونه قرار داده می‌شود و با ماتریکس پوشانده می‌شود. طیف‌های جرمی تولیدشده توسط نرم افزارهای اختصاصی آنالیز شده و با پروفایل های ذخیره‌شده مقایسه می‌گردد. بنابراین روش MALDI/TOF در حال تبدیل به روش استاندارد تشخیص گونه‌ها در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی است (۴۸).

MALDI-TOF-MS به عنوان یک روش جایگزین و بهینه قادر است بسیاری از پروتئین مختلف را از باکتری یا اسپور تشخیص دهد مانند باسیلوس آنتراسیس، بورخولدریا مالئی، ایشرشیاکلی O157,175، کوکسیلا بورنتی و یرسینیا پستیس از جمله باکتری‌هایی هستند که توسط روش MALDI-TOF-MS با موفقیت شناسایی‌شده‌اند. MALDI-TOF همچنین امکان شناسایی مستقیم باکتری‌ها را فراهم می‌کند (۴۹). ژنوم باکتریایی اغلب میزان بالایی از تنوع را نشان می‌دهند که همراه با وجود فاکتور های ویرولانس پلاسمید است که می‌تواند امضای بیوشیمیایی منحصربه‌فرد مورد استفاده برای نشان دادن یک شناسایی مثبت را پیچیده کند. یک روش جایگزین، ESI-TOF منحصربه‌فرد برای تشخیص آمپلیکن PCR مناسب است. در این روش، اهداف PCR تقویت‌شده از بخش‌های مختلف ژنوم باکتری تقویت می‌شوند، از جمله اهداف عمومی و همچنین اهداف اختصاصی گونه‌ها محصولات PCR در ESI-TOF تغذیه می‌شوند، که می‌تواند ترکیب دقیق نوکلئوتید محصول را فراهم کند، اگرچه نمی‌تواند توالی مشخص را تعیین کند (۵۰, ۵۱).

میکروسکوپ الکترونی

میکروسکپ الکترونی(Electron Microscope) یکی از تجهیزات آزمایشگاهی است که در تمام آزمایشگاه‌های پژوهشی و صنعتی استفاده می‌شود . میکروسکپ الکترونی انواع مختلفی دارد که میکروسکپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکپ الکترونی بازتابی (REM)، میکروسکپ الکترونی انتقالی (TEM) و میکروسکپ الکترونی انتقالی–روبشی (REMER STEM) هستند.

میکروسکپ الکترونی روبشی

در مطالعات گذشته از میکروسکپ الکترونی روبشی برای شناسایی باکتری‌ها استفاده‌شده است. در یک مطالعه به طور ویژه از میکروسکپ الکترونی روبشی جهت شناسایی یاکتری‌ها در شبکه آب آشامیدنی استفاده شد(۵۲). میکروسکپ الکترونی عبوری یکی از ابزارهای مورد استفاده در فناوری‌ها و علوم مختلف از جمله نانو فناوری است. در این میکروسکپ جهت بزرگ نمایی به جای استفاده از نور از الکترون استفاده می‌شود که می‌تواند به شیوه بمباران الکترونی، تصاویری از اجسامی به کوچکی ۱۰ نانومتر تهیه کند. در یک مطالعه در سال ۲۰۱۶ از یک روش آماده سازی و آنالیز با استفاده میکروسکپ الکترونی روبشی جهت شناسایی باکتری‌ها و ویروس‌هایی نظیر ابولا استفاده گردید (۵۳).

میکروسکپ الکترونی عبوری

میکروسکپ الکترونی عبوری یا انتقالی از یک پرتو الکترونی با ولتاژ بالا برای روشن کردن نمونه و ایجاد تصویر استفاده می‌کند. میکروسکپ الکترونی عبوری ابزاری ویژه در مشخص نمودن ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می‌شود که مطالعات ریزساختاری مواد با قدرت تفکیک بالا و بزرگ نمایی خیلی زیاد را امکان‌پذیر می‌سازد . علاوه بر این از میکروسکپ الکترونی عبوری جهت مطالعات ساختارهای بلور، تقارن، جهت گیری و نقایص بلوری می‌توان استفاده نمود (۵۴, ۵۵). میکروسکپ الکترونی عبوری علاوه بر کاربردهای که در زمینه باکتری شناسی تشخیصی دارد می‌توان از آن برای شناسایی ساختارهای میکروبی مورد استفاده قرار گردد و همچنین برای شناسایی آنتی ژن‌های موجود در سلول‌های باکتریایی و در تعیین برخی از باکتری‌ها در نمونه‌های بیوپسی مفید است. به عنوان مثال، باکتری‌های اسپیروکت در روده از نمونه‌های بیوپسی به وسیله میکروسکپ الکترونی عبوری قابل‌شناسایی هستند، که در آن، با میکروسکپ نوری، ممکن است شناسایی آنها با خطا انجام گردد. باکتریهای دیگر مانند مایکوباکتریوم آویوم موجودات درون سلولی پیچیده یا باکتریهای بیماری ویپل Tropheryma whippelii بعضی اوقات ممکن است در بیوپسی روده یافت شود. باکتریهای دارای فرم های بدن مارپیچی، مانند هلیکوباکتر پیلوری و هلیکو باکتر هلمانی به راحتی در بیوپسی های معده توسط میکروسکپ الکترونی عبوری قابل شناسایی است (۵۶). در این روش ارگانیسم ها از نظر مورفولوژیکی قابل تفکیک هستند. به علاوه، باکتری عامل تببه نام کوکسیلا بورنتی توسط این میکروسکپ قابل‌شناسایی است. اگرچه به عنوان یک تست روتین استفاده نمی‌گردد (۵۴). در کاربردهای پژوهشی بسیاری از میکروسکپ الکترونی عبوری جهت بررسی جنبه های مختلف باکتریایی نظیر تحرک، چسبندگی و انتقال پلاسمید و اسپور (در گونه‌های تشکیل دهنده اسپور) مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته‌اند. در بسیاری از گونه‌های باکتریایی، یک شکل شناخته شده از آن‌ها وجود دارد. حرکت یا شنا این باکتری توسط تاژک انجام می‌شود، این ساختارها عموماً به وسیله میکروسکوپ‌های نوری قابل‌شناسایی و تبعیض از سایر ساختارهای مشابه نیستند. میکروسکپ الکترونی عبوری تاژک باکتریایی کاملاً متفاوت از تاژک و مژگانی که در موجودات بالاتر را نشان می‌دهد. همچنین ساختار دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی و مثبت متفاوت است که با استفاده از میکروسکپ الکترونی عبوری قابل تفکیک است (۵۷). ویروس‌ها در خانواده ها و جنس ها از نظر ظاهری و مورفولوژیکی طبقه‌بندی می‌شوند. بنابراین از ویژگی‌های ظاهری ویروس‌ها می‌توان برای شناسایی آن‌ها استفاده کرد اما لزوماً به عنوان معیار شناسایی در نظر گرفته نمی‌شود. به عنوان مثال، ویروس آبله مرغان، تبخال و واریسلا از نظر ظاهر با ویروس تبخال ایجاد کننده زخم‌های سرد (تبخال دهان) و هرپس سیمپلکس یکسان است. کوچکترین ویروس کامل انسان قطر آن در حدود ۱۸ تا ۱۸ نانومتر است (پارو ویروس‌ها) و بزرگترین آن‌ها حدود ۲۵۰ نانومترقطر دارد (پاکس‌ویروس‌ها) (۵۴). همچنین ویروس‌های رشته ای مانند ماربورگ و ابولا وجود دارد که منجر به تب خونریزی با میزان مرگ و میر بالا می‌شود و قطر آن‌ها حدود ۸۰ نانومتر است. ویروس‌های با قطر بسایر کوچک نظیر باکترویوفاژها هستند که قطری حدود ۲۰ نانومتر دارند و عمدتاً باکتری‌ها را آلوده می‌کنند (باکتریوفاژ). میکروسکپ الکترونی انتقالی در تشخیص ویروس آبله (smallpox) از طریق نمونه‌های که از آبسه‌های پوستی یا نمونه‌های گرفته شده بوسیله خراش روی سطح پوست به عنوان یک روش سریع تشخیص در مطالعات گذشته معرفی شده است (۵۴). همچنین استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی جهت شناسایی ویروس‌های هپاتیت (۵۸)، پارو ویروس‌ها، هرپس ویروس‌ها و آدنو ویرروس‌ها به کار گرفته شده است (۵۹). استفاده از روش‌های ایمونولوژیک، مانند تولید آنتی بادی‌ها در برابر ویروس خاص و استفاده از ابزارهای بیولوژی مولکولی مانند PCR حاکی از دانش قبلی در مورد ویروس است. اما شناسایی ویروس ناشناخته جدید بستگی به خصوصیات اولیه ویروس‌های با مطالعات TEM دارد. مطالعه نمونه‌ها با استفاده از میکروسکپ الکترونی TEM ممکن است به شناسایی ویروس سریع برسد، یا اطلاعات کافی در مورد فرآیند پاتولوژیک ارائه بدهد. علاوه بر این، از آنجا که میکروسکپ الکترونی یک روش سریع است، می‌تواند در نظارت بر

ویروس‌هایی که می‌توانند به عنوان سلاح‌های بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد (۵۹-۶۱).

میکروسکپ الکترونی عبوری در ردیابی ذرات مشابه کرونا ویروس در نمونه‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود که برای شناسایی ویژگی‌های مورفولوژی یا ریخت شناسی ویروس کرونا می‌تواند استفاده شودکه نوع انتقالی TEM در شناسایی کرونا ویروس جدید (SARS-Cov-2) هم به کار گرفته شده است. TEM در ویروس شناسی اساسی و برای تشخیص سریع عفونت ویروسی با رنگ آمیزی منفی ذرات ویروسی را از پس زمینه جدا می‌کند و اطلاعات دقیق مورفولوژیکی (در مورد تقارن و حضور یا عدم حضور یک پاکت)، تسهیل در شناسایی خاص ویروس‌ها، یا حداقل طبقه‌بندی آن‌ها را به گروه های مورفولوژیکی مشابه ارائه می‌دهد (۶۲).

تکثیر تک دمایی وابسته به حلقه

روش تقویت اسید نوکلئوتید جدید یا تقویت ایزوترمال حلقوی با نام loop-mediated amplification (LAMP) یک روش تقویت حلقه واسطه است که توسط شرکت Eiken Chemical، ژاپن توسعه‌یافته است (۶۳). در این روش تکثیر و شناسایی ژن می‌تواند در یک مرحله به وسیله قرار دادن مخلوط نمونه‌ها، آغاز گرها، پروب ها و DNA پلیمرایزی با قابلیت جانیشنی رشته و اجزای مورد عمل در یک دمای ثابت که حدوده ۶۵ درجه سانتی گراد است که تکثیر با کارایی بالا را میسر می‌سازد، طوریکه در طی مدت ۱۵ تا ۶۰ دقیقه DNA 10^{9} تا 10^{10} بار تکثیر می‌شود. در این واکنش مقادیر زیادی از محصولات نهایی همراه مقادیر زیادی پیروفسفات تولید می‌شود. کدورت سفید تولیدشده در این آزمایش ممکن است به صورت چشمی قابل مشاهده باشد. بنابراین، وجود کدورت نشانگر تشکیل ناحیه ژنومی هدفمند است(۶۴). تشخیص چشمی همچنین با اضافه کردن یک رنگ واسطه که اغلب SYBR Green I به مخلوط نهایی، حاصل می‌شود. هنگامی که نور UV اعمال می‌شود، حضور محصول خاص توسط فلورسانس سبز شناخته می‌شود. پیگیری واکنش در زمان واقعی می‌تواند با مشاهده چشمی حاصل شود همچنین کدورت را با ابزاری به نام توربیدیمتر اندازه‌گیری می‌شود که این امر می‌تواند به شناسایی کمی از عوامل بیماری زا کمک کند (۶۴).

در شرایط بهینه، واکنش LAMP می‌تواند زمان‌های بسیار کوتاه انجام شود، این فرایند ایزوترمال است و می‌تواند در یک حمام آب گرم ساده انجام شود. و حساسیت این روش بسیار بالا است و از نظر حساسیت با PCR قابل مقایسه است، و همچنین کم‌تر تحت تأثیر DNA غیر هدف و مولکول‌های بازدارنده قرار می‌گیرد. برخی از محققان حتی با افزودن مستقیم مخلوط واکنش به نمونه‌های سواب یا سرم، تقویت قابل توجهی برای LAMP گزارش می‌دهند. هر دو نوع ویروس‌های DNA و RNA توسط LAMP قابل‌شناسایی هستند و تشخیص چندین بیماری مهم در حال ظهور و یا با ظهور مجدد توسط این تکنیک قبلاً گزارش شده است (۶۴). در این راستا در یک مطالعه Kuhara و همکاران در سال ۲۰۰۷ از LAMP برای شناسایی HHV-6 و HHV-8 استفاده کردند، که با موفقیت شناسایی آن‌ها انجام شد. همچنین برای شناسایی پارو ویروس B19 استفاده‌شده و آن را به عنوان یک تکنیک جدید و جایگزین روش‌های دیگر مانند آنالیزهای سرولوژیکی و PCR پیشنهاد کرده‌اند (۶۵). RT-LAMP برای تشخیص ویروس‌های عامل تب خونریزی دهنده مانند ویروس ابولا به‌کاررفته است (۶۳). در یک مطالعه محققان گزارش داده‌اند که حساسیت سیستم به ۲۰ نسخه در لوله آزمایش است و شناسایی آن در ۳۰ دقیقه امکان‌پذیر است. مجموعه‌های اولیه برای LAMP نیز برای شناسایی هر ۴ سروتیپ Dengo ساخته شده است. یک گروه تحقیقاتی دیگر استفاده از LAMP را برای تشخیص سارس ویروس مسئول توسعه سندرم شدید تنفسی حاد، SARS گزارش داده است. لیست پروتکل‌های موفق برای تشخیص LAMP نیز شامل عوامل بیماری‌زایی مانند ویروس West Nile، ویروس Chikungunya، ویروس انسفالیت ژاپنی، ویروس آنفولانزای مرغی H5N1 و ویروس اوریون می‌باشد (۶۶-۷۰).

جدول-۱. روش‌های نوین شناسایی میکرواورگانیزم‌ها با پتانسیل استفاده به عنوان سلاح بیولوژیک

شماره	نویسنده	سال	نوع ارگانیسم	منبع ارگانیسم	روش	منبع
۱	Arnon et al.	۲۰۰۱	Toxins	mice	bioassay	(۷۱)
۲	Collins et al	۲۰۱۸	-	Mouse and Human	Immunoassays	(۱۷)
۳	Byrne et al	۲۰۰۹	Ecoli Strain And toxins	Rabbit	ELISA	(۱۸)

۴	Cirino et al	۲۰۰۴	Bacillus antracis Yersinia pestis Francisella tularensis Clostridium botulinum and…	-	PCR	(۷۲)
۵	Demirev et al	۲۰۰۸	*F. tularensis* and *Y. pestis*	Lab.	Mass Spectrometry	(۷۳)
۶	Lasch et al	۲۰۱۰	Yersinia species	Robert-Koch Institut (RKI)	MALDI-TOF-MS	(۱۰)
۷	Jeng et al	۲۰۱۳	F. tularensis, B. anthracis, Y. pestis, Brucella, Burkholderia, andRickettsia	respiratory infections	PCR−Electrospray	(۷۴)
۸	Baldwin et al	۲۰۰۹	156 diverse bacterial is olates	human and/or animal pathogen	PCR/ESI-MS	(۵۰)
۹	Sampath et al	۲۰۱۲	Bacillus antracis	United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases (USAMRIID)	PCR/ESI-MS	(۷۵)
۱۰	Kaleta et al	۲۰۱۱	Gram-Positive and Gram-Negative bacteria	Blood Culture (ICU)	PCR/ESI-MS	(۷۶)
۱۱	March et al	۲۰۱۳	Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei	Human blood Soil Rhizosphere (ATCC)	Gas Chromatography−Mass Spectrometry (190 , acssens)	(۴۱)
۱۲	Chenau J et al	۲۰۱۴	Yersinia pestis	Food	cell immunocapture and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (193, acssens)	(۷۷)
۱۳	Barlaan et al	۲۰۰۵	Several Species	National Collections of Industrial, ،Marine Bacteria , Food (NCIMB),…	DHPLC	(۴۶)

۱۴	Hurtle et al	۲۰۰۲	Most (36 of 39) species of bacteria	areas with a high degree of homology	DHPLC	(۷۸)
۱۵	Franciosa et al	۲۰۰۴	Botulinum Neurotoxigenic Clostridia (Type A, B, E, and F)	Istituto Superiore di Sanità collection	DHPLC	(۷۹)
۱۶	Ghosh et al	۲۰۱۳	Bacillus anthracis	soil	Surface Plasmon Resonance Biosensor(SPR)	(۸۰)
۱۷	Hong et al	۲۰۱۱	Tuberculosis	-	Surface Plasmon Resonance Biosensor(SPR)	(۸۱)
۱۸	Tims et al	۲۰۰۴	Bacillus anthracis Spores	spiked powders	Wave Fiber-Optic (Biosensor FOBS)	(۸۲)
۱۹	Hao et al	۲۰۰۹	Bacillus anthracis	-	quartz crystal microbalance (QCM)	(83)
۲۰	Berkenpas et al	۲۰۰۶	Escherichia coli O157: H7	-	Surface Acoustic Wave Sensors (SAW)	(۸۴)
۲۱	McGovern et al	۲۰۰۸	Bacillus sp.	ATCC	Microcantilever (MCL)	(۸۵)
۲۲	Alam et al	۲۰۱۶	Clostridium perfringens epsilon toxin (ETX), staphylococcal enterotoxin B (SEB), shiga toxin (STX)	food	liquid chromatography- and mass spectrom- etry	(۸۶)
۲۳	Mavrakis et al.	۲۰۰۲	Marburg virus (MBGV)	-	Electron microscopy	(۸۷)
۲۴	Reed et al.	۲۰۰۳	monkeypox (a virus similar to smallpox	-	Electron microscopy	(۸۸)
۲۵	Kuhara et al.	۲۰۰۷	human herpesvirus	-	loop-mediated isothermal amplification	(۶۵)
۲۶	Karami, Ali, et al.	۲۰۱۲	Salmonella	-	Fluorescent Loop-Mediated Isothermal Amplification	(۶۴)

نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی روش‌های نوین شناسایی میکرواورگانیزم‌ها با پتانسیل بیوتروریسم در قالب یک مطالعه مروری انجام شد. طبق مطالعات بررسی شده استفاده از روش‌های با سرعت بالا می‌توانند در شناسایی عوامل بیولوژیک با قابلیت بیوترویسمی با اهمیت بیشتری مورد توجه قرار بگیرد. از میان روش‌های مورد بررسی روش‌های کرماتوگرافی، کرماتوگرافی طیف‌سنجی جرمی حائز اهمیت بسیاری هستند که با توجه به مطالعات گذشته می‌توان برای هر گروه از عوامل بیولوژیک دستورالعمل خاص شناسایی آن‌ها را تدوین و به عنوان روش‌هایی با حساسیت بسیار بالا مورد استفاده قرار بگیرند. کرماتوگرافی به همراه طیف‌سنجی جرمی امکان طبقه‌بندی باکتری با شناسایی اسیدهای چرب سلولی و کربوهیدرات ها را فراهم می‌کند. رویکردی که برای تشخیص سریع یا تمایز میکرواورگانیزم‌ها مورد بررسی قرار گرفته است به ویژه برای شناسایی محصولات باکتریایی که یا فرار هستند یا می‌توانند به مشتقات فرار تبدیل شوند. همچنین میکروسکپ های اکترونی از نوع عبوری می‌توانند در شناسایی انواع باکتری‌ها و ویروس‌ها مورد استفاده قرار بگیرند و ویژگی‌های سطحی آن‌ها را با دقت و حساسیت بالا تامین نمایند. تکثیر تک دمایی وابسته به حلقه یکی دیگر از روش‌های ساده، سریع و با حساسیت بالا است که در دو دهه اخیر جهت شناسایی طیف وسیعی از ویروس‌ها به کار گرفته شده است. لذا به نظر می‌رسد تجهیز آزمایشگاه‌های مختص به شناسایی عوامل بیولوژیک با پتانسیل بیوتروریسمی به تجهیزات ذکرشده جهت شناسایی زود هنگام این عوامل ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی: این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی پروژه جایگزین خدمت در ستاد کل نیروهای مسلح که در شورای مورخ ۹۷/۷/۳۰ به شماره ۳۲۲۳/۱۶۱۲/۹۷۰۶۵۳/۳ تصویب گردیده است. بدین وسیله از دانشگاه بقیه الله اساتید محترم ناظر تشکر و قدردانی می‌گردد.

نقش نویسندگان: تمامی نویسندگان در طرح اولیه این پژوهش، جمع آوری مطالب، راهنمایی، اصلاح و نگارش نهایی و تهیه نسخه نهایی همکاری داشته اند. و نویسندگان به تأیید نهایی مقاله حاضر مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع:

1. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. Clinical microbiology reviews. 2005;18(4):583-607. doi:10.1128/CMR.18.4.583-607.2005
2. Pejmankhah S, Pejmankhah S, Mirhaghi A. Effect of bioterrorism training through lecture and educational pamphlet on knowledge of medical staff in hospitals of iranshahr, iran in 2010. 2012.
3. Shoham D. Bioterrorism. Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing. 2010:1-127. doi:10.1002/9780470571224.pse339
4. Bronze MS, Greenfield RA. Biodefense: principles and pathogens: Horizon Bioscience Norfolk (UK); 2005.
5. Pappas G, Panagopoulou P, Akritidis N. Reclassifying bioterrorism risk: are we preparing for the proper pathogens? Journal of infection and public health. 2009;2(2):55-61. doi:10.1016/j.jiph.2009.03.002
6. Mirnejad R. Laboratory diagnosis and biological safety aspects of war, biological software. Journal of Medical Sciences. 2003;4(4):273-80.
7. Klietmann WF, Ruoff KL. Bioterrorism: implications for the clinical microbiologist. Clinical Microbiology Reviews. 2001;14(2):364-81. doi:10.1128/CMR.14.2.364-381.2001
8. Tucker JB. Historical trends related to bioterrorism: An empirical analysis. Emerging Infectious Diseases. 1999;5(4):498. doi:10.3201/eid0504.990406
9. Gharatappeh A, Memariyani M, Lellahi S, Tajvidi M, Doragi E. Early detection of bioterrorism agents by nano-sensors. EBNESINA. 2008;11(1):35-40.
10. Lasch P, Drevinek M, Nattermann H, Grunow R, Stämmler M, Dieckmann R, et al. Characterization of Yersinia using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. Analytical chemistry. 2010;82(20): 8464-75. doi:10.1021/ac101036s
11. Fykse E, Langseth B, Olsen J, Skogan G, Blatny J. Detection of bioterror agents in air samples using real-time PCR. Journal of applied microbiology. 2008;105(2):351-8. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03750.x
12. He J, Kraft AJ, Fan J, Van Dyke M, Wang L, Bose ME, et al. Simultaneous detection of CDC category" A" DNA and RNA Bioterrorism agents by use of multiplex PCR & RT-PCR enzyme hybridization assays. Viruses. 2009;1(3):441-59. doi:10.3390/v1030441
13. Nitsche A, Stern D, Ellerbrok H, Pauli G. Detection of infectious poxvirus particles. Emerging infectious diseases. 2006;12(7):1139. doi:10.3201/eid1207.060093
14. Xu Q, Liu H, Yuan P, Zhang X, Chen Q, Jiang X, et al. Development of a simplified RT-PCR without RNA isolation for rapid detection of RNA viruses in a single small brown planthopper (Laodelphax

striatellus Fallén). Virology journal. 2017;14(1):90. doi:10.1186/s12985-017-0732-6
15. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance. 2020;25(3). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
16. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Methods in enzymology. 70: Elsevier; 1980. p. 419-39. doi:10.1016/S0076-6879(80)70067-8
17. Collins AM, Jackson KJ. On being the right size: antibody repertoire formation in the mouse and human. Immunogenetics. 2018;70(3):143-58. doi:10.1007/s00251-017-1049-8
18. Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O'Kennedy R. Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. Sensors. 2009;9(6):4407-45. doi:10.3390/s90604407
19. Hatamifar M, Mosavari N, Kazemi J. Designing of Indirect ELISA system using secreted antigens of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis for Diagnosis of paratuberculosis. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2017;11(2):26-33.
20. Jenko KL, Zhang Y, Kostenko Y, Fan Y, Garcia-Rodriguez C, Lou J, et al. Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins. Analyst. 2014;139(20):5093-102. doi:10.1039/C4AN01270D
21. Čapek P, Dickerson TJ. Sensing the deadliest toxin: technologies for botulinum neurotoxin detection. Toxins. 2010;2(1):24-53. doi:10.3390/toxins2010024
22. Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI, Charette SJ. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. Journal of microbiological methods. 2017;138:60-71. doi:10.1016/j.mimet.2016.02.016
23. Fournier P-E, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. Genome medicine. 2014;6(11): 114. doi:10.1186/s13073-014-0114-2
24. Segerman B, De Medici D, Schulz ME, Fach P, Fenicia L, Fricker M, et al. Bioinformatic tools for using whole genome sequencing as a rapid high resolution diagnostic typing tool when tracing bioterror organisms in the food and feed chain. International journal of food microbiology. 2011;145: S167-S76. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.027
25. Skoog D, Leary J. Principles of instrumental analysis. Saunders College Publ., Philadelphia. Principles of instrumental analysis 4th ed Saunders College Publ, Philadelphia. 1992.
26. Bruner F. Gas chromatographic environmental analysis: principles, techniques, instrumentation: VCH New York; 1993.
27. Kitson FG, Larsen BS, McEwen CN. Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide: Academic Press; 1996.
28. Mondello L, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review. Mass spectrometry reviews. 2008;27(2):101-24. doi:10.1002/mas.20158
29. Tait E, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. Identification of volatile organic compounds produced by bacteria using HS-SPME-GC-MS. Journal of chromatographic science. 2014;52(4):363-73. doi:10.1093/chromsci/bmt042
30. Saraf A, Larsson L. Use of gas chromatography/ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of chemical markers of microorganisms in organic dust. Journal of Mass spectrometry. 1996;31(4):389-96. doi:10.1002/(SICI)1096-9888
31. Garner W, Gennaro R, editors. Gas chromatographic differentiation of closely related species of microorganisms. Abstracts, 150th Meeting Amer Chem Soc, Atlantic City, NJ, Sept; 1965.
32. Yamakawa T, Ueta N. Gaschromatographic studies of microbial components. I. Carbohydrate and fatty acid constitution of Neisseria. The Japanese journal of experimental medicine. 1964;34:361.
33. Moss CW, Lewis VJ. Characterization of Clostridia by Gas Chromatography: I. Differentiation of Species by Cellular Fatty Acids. Appl Environ Microbiol. 1967;15(2):390-7. doi:10.1128/AEM.15.2.390-397.1967
34. Larsson L, Mårdh P. Gas chromatographic characterization of mycobacteria: analysis of fatty acids and trifluoroacetylated whole-cell methanolysates. Journal of clinical microbiology. 1976; 3(2): 81-5.
35. Yang Y, Boysen RI, Chowdhury J, Alam A, Hearn MT. Analysis of peptides and protein digests by reversed phase high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry using neutral pH elution conditions. Analytica chimica acta. 2015;872:84-94. doi:10.1016/j.aca.2015.02.055
36. Hines HB, Lebeda F, Hale M, Brueggemann EE. Characterization of botulinum progenitor toxins by mass spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2005;71(8):4478-86. doi:10.1128/AEM.71.8.4478-4486.2005
37. Dupuis A, Hennekinne JA, Garin J, Brun V. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. Proteomics. 2008;8(22):4633-6. doi:10.1002/pmic.200800326
38. Schmidt JG, Boyer AE, Kalb SR, Moura H, Barr JR, Woolfitt AR. Mass spectrometry-based methods for detection and differentiation of botulinum neurotoxins. Google Patents; 2009.
39. McGrath SC, Schieltz DM, McWilliams LG, Pirkle JL, Barr JR. Detection and quantification of ricin in beverages using isotope dilution tandem mass spectrometry. Analytical chemistry. 2011;83(8): 2897-905. doi:10.1021/ac102571f
40. Krejčí E, Kroppenstedt RM. Differentiation of species combined into the Burkholderia cepacia complex and related taxa on the basis of their fatty acid patterns. Journal of Clinical Microbiology. 2006; 44(3):1159-64. doi:10.1128/JCM.44.3.1159-1164.2006
41. Li D, March J, Bills T, Holt B, Wilson C, Lowe

W, et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for rapid identification and differentiation of B urkholderia pseudomallei and B urkholderia mallei from each other, B urkholderia thailandensis and several members of the B urkholderia cepacia complex. Journal of applied microbiology. 2013;115 (5):1159-71. doi:10.1111/jam.12310
Niessen W, Tinke A. Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation. Journal of Chromatography A. 1995;703(1-2):37-57. doi:10.1016/0021-9673(94)01198-N
43. Ho Y-P, Reddy PM. Identification of pathogens by mass spectrometry. Clinical Chemistry. 2010; 56(4): 525-36. doi:10.1373/clinchem.2009.138867
44. García-Cañas V, Lorbetskie B, Bertrand D, Cyr TD, Girard M. Selective and quantitative detection of influenza virus proteins in commercial vaccines using two-dimensional high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. Analytical chemistry. 2007;79(8):3164-72. doi:10.1021/ac0621120
45. Frueh FW, Noyer-Weidner M. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2003;41 (4): 452-61.doi:10.1515/CCLM.2003.068
46. Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, Takeuchi K. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. Journal of microbiological methods. 2005;61(3):399-412. doi:10.1016/j.mimet.2005.01.002
47. Delavy M, Cerutti L, Croxatto A, Prod'hom G, Sanglard D, Greub G, et al. Machine Learning Approach for Candida albicans Fluconazole Resistance Detection Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Frontiers in microbiology. 2020;10:3000. doi:10.3389/fmicb.2019.03000
48. Bowman AS, Asare SO, Lynn BC. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis for characterization of lignin oligomers using cationization techniques and 2, 5-dihydroxyacetophenone (DHAP) matrix. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2019;33(8): 811-9. doi:10.1002/rcm.8406
49. Boyer AE, Gallegos-Candela M, Quinn CP, Woolfitt AR, Brumlow JO, Isbell K, et al. High-sensitivity MALDI-TOF MS quantification of anthrax lethal toxin for diagnostics and evaluation of medical countermeasures. Analytical and bioanalytical chemistry. 2015;407(10):2847-58. doi:10.1007/s00216-015-8509-5
50. Baldwin CD, Howe GB, Sampath R, Blyn LB, Matthews H, Harpin V, et al. Usefulness of multilocus polymerase chain reaction followed by electrospray ionization mass spectrometry to identify a diverse panel of bacterial isolates. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009;63(4):403-8. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.12.012
51. Hannis JC, Manalili SM, Hall TA, Ranken R, White N, Sampath R, et al. High-resolution genotyping of Campylobacter species by use of PCR and high-throughput mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 2008;46(4):1220-5. doi:10.1128/JCM.02158-07
52. Ridgway H, Olson B. Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking-water distribution system. Appl Environ Microbiol. 1981;41(1):274-87. doi:10.1128/AEM.41.1.274-287.1981
53. Golding CG, Lamboo LL, Beniac DR, Booth TF. The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. Scientific reports. 2016;6:26516. doi:10.1038/srep26516
54. Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. Micron. 2006;37(2):91-106. doi:10.1016/j.micron.2005.10.001
55. Rahmani AR, Leili M, Azarian G, Poormohammadi A. Sampling and detection of corona viruses in air: A mini review. Science of The Total Environment. 2020;740:140207. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140207
56. McNulty C, Dent J, Curry A, Uff J, Ford G, Gear M, et al. New spiral bacterium in gastric mucosa. Journal of Clinical Pathology. 1989;42(6):585-91. doi:10.1136/jcp.42.6.585
57. DePamphilis M, Adler J. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from Escherichia coli and Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology. 1971;105(1):384-95. doi:10.1128/JB.105.1.384-395.1971
58. Berke T, Matson D. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. Archives of virology. 2000;145(7):1421-36. doi:10.1007/s007050070099
59. Goldsmith CS, Miller SE. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. Clinical microbiology reviews. 2009;22(4):552-63. doi:10.1128/CMR.00027-09
60. Kuiken T, Fouchier R, Rimmelzwaan G, Osterhaus A. Emerging viral diseases in waterbirds. Waterbirds Around the World. 2006:418-21.
61. Schoub BD. Surveillance and management of influenza on the African continent. Expert review of respiratory medicine. 2010;4(2):167-9. doi:10.1586/ers.10.10
62. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science. 2020;367 (6485):1444-8. doi:10.1126/science.abb2762
63. Kalvatchev Z, Tsekov I, Kalvatchev N. Loop-mediated amplification for sensitive and specific detection of viruses. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2010;24(1):1559-61. doi:10.2478/V10133-010-0004-8
64. Karami A, Bagheri B, Ahmadi Z, Pourali F. Comparing Fluorescent Loop-Mediated Isothermal Amplification and PCR in Detecting Salmonella. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2012;22(95):48-55.

65. Kuhara T, Yoshikawa T, Ihira M, Watanabe D, Tamada Y, Katano H, et al. Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. Journal of virological methods. 2007; 144(1-2):79-85. doi:10.1016/j.jviromet.2007.03.021
66. Notomi T, Taguchi F, Kanda H, Minekawa H, Itamura S, Odagiri T, et al., editors. RT-LAMP method provides a simple, rapid and specific detection system for SARS-CoV RNA. International Conference on SARS-one year after the (first) outbreak; 2004.
67. Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. Journal of clinical microbiology. 2004;42 (1): 257-63. doi:10.1128/JCM.42.1.257-263.2004
68. Parida M, Santhosh S, Dash P, Tripathi N, Lakshmi V, Mamidi N, et al. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of clinical microbiology. 2007;45(2): 351-7. doi:10.1128/JCM.01734-06
69. Toriniwa H, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Microbiology and immunology. 2006; 50(5):379-87. doi:10.1111/j.1348-0421.2006.tb03804.x
70. Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T, Kamada M, Sakiyama H, et al. Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Journal of medical virology. 2008;80(3):517-23. doi:10.1002/jmv.21106
71. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. Jama. 2001;285(8):1059-70. doi:10.1001/jama.285.8.1059
72. Cirino NM, Musser KA, Egan C. Multiplex diagnostic platforms for detection of biothreat agents. Expert review of molecular diagnostics. 2004;4(6): 841-57. doi:10.1586/14737159.4.6.841
73. Demirev PA, Fenselau C. Mass spectrometry in biodefense. Journal of mass spectrometry. 2008;43(11):1441-57. doi:10.1002/jms.1474
74. Asante J, Noreddin A, El Zowalaty ME. Systematic Review of Important Bacterial Zoonoses in Africa in the Last Decade in Light of the 'One Health'Concept. Pathogens. 2019;8(2):50. doi:10.3390/pathogens8020050
75. Sampath R, Mulholland N, Blyn LB, Massire C, Whitehouse CA, Waybright N, et al. Comprehensive biothreat cluster identification by PCR/electrospray-ionization mass spectrometry. PLoS One. 2012;7(6). doi:10.1371/journal.pone.0036528
76. Kaleta EJ, Clark AE, Johnson DR, Gamage DC, Wysocki VH, Cherkaoui A, et al. Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. Journal of clinical microbiology. 2011;49(1):345-53. doi:10.1128/JCM.00936-10
77. Chenau Jrm, Fenaille Fo, Simon Sp, Filali S, Volland H, Junot C, et al. Detection of yersinia pestis in environmental and food samples by intact cell immunocapture and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical chemistry. 2014;86 (12): 6144-52. doi:10.1021/ac501371r
78. Hurtle W, Shoemaker D, Henchal E, Norwood D. Denaturing HPLC for identifying bacteria. BioTechniques. 2002;33(2):386-91. doi:10.2144/02332rr05
79. Franciosa G, Pourshaban M, De Luca A, Buccino A, Dallapiccola B, Aureli P. Identification of type A, B, E, and F botulinum neurotoxin genes and of botulinum neurotoxigenic clostridia by denaturing high-performance liquid chromatography. Appl Environ Microbiol. 2004;70(7):4170-6. doi:10.1128/AEM.70.7.4170-4176.2004
80. Ghosh N, Gupta G, Boopathi M, Pal V, Singh A, Gopalan N, et al. Surface plasmon resonance biosensor for detection of Bacillus anthracis, the causative agent of anthrax from soil samples targeting protective antigen. Indian journal of microbiology. 2013;53(1):48-55. doi:10.1007/s12088-012-0334-3
81. Hong SC, Lee J, Shin H-C, Kim C-M, Park JY, Koh K, et al. Clinical immunosensing of tuberculosis CFP-10 in patient urine by surface plasmon resonance spectroscopy. Sensors and Actuators B: Chemical. 2011;160(1):1434-8. doi:10.1016/j.snb.2011.10.006
82. Tims TB, Lim DV. Rapid detection of Bacillus anthracis spores directly from powders with an evanescent wave fiber-optic biosensor. Journal of microbiological methods. 2004;59(1):127-30. doi:10.1016/j.mimet.2004.02.016
83. Hao R, Wang D, Zuo G, Wei H, Yang R, Zhang Z, et al. Rapid detection of Bacillus anthracis using monoclonal antibody functionalized QCM sensor. Biosensors and Bioelectronics. 2009;24(5):1330-5. doi:10.1016/j.bios.2008.07.071
84. Berkenpas E, Millard P, Da Cunha MP. Detection of Escherichia coli O157: H7 with langasite pure shear horizontal surface acoustic wave sensors. Biosensors and Bioelectronics. 2006;21(12):2255-62. doi:10.1016/j.bios.2005.11.005
85. McGovern J-P, Shih WY, Rest R, Purohit M, Pandya Y, Shih W-H. Label-free flow-enhanced specific detection of Bacillus anthracis using a piezoelectric microcantilever sensor. Analyst. 2008;133(5):649-54. doi:10.1039/b715948j
86. Alam S, Uppal A, Gupta P, Kamboj D. Multiple-reaction monitoring for multiplex detection of three bacterial toxins using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Letters in applied microbiology. 2017;64(3):217-24. doi:10.1111/lam.12706
87. Mavrakis M, Kolesnikova L, Schoehn G, Becker S, Ruigrok RW. Morphology of Marburg virus NP-RNA. Virology. 2002;296(2):300-7. doi:10.1006/viro.2002.1433
88. Reed KD, Melski JW, Graham MB, Regnery RL, Sotir MJ, Wegner MV, et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. New England Journal of Medicine. 2004;350(4):342-50. doi:10.1056/NEJMoa032299