

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

Ruhollah Dorostkar¹, Sajad Khosravi², 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 bioterrorism 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 developing. 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

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 به، به، ایران

^۳ دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

امروزه با توسعه علم میکروبی شناسی، بیوتکنولوژی و ژنتیک سلولی و مولکولی، شناخت بشر از میکرواورگانیزم‌ها افزایش یافته 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 تاکید می‌کند. شناسایی دقیق این گونه عوامل نه تنها برای تأیید یک عملیات بیوتروریسمی، بلکه برای انجام به موقع اقدامات مناسب متناسب با عامل بیولوژیک به کاررفته جهت محافظت از سلامت عمومی باید از اهمیت زیادی برخوردار است. عوامل بیوتروریسم همان گونه 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

مقدمه

امروز با توسعه علم میکروبیولوژی، بیوتکنولوژی و ژنتیک سلولی و مولکولی، شناخت بشر از میکرواورگانیزمها افزایش یافته و امکان ساخت سلاح‌های بیولوژیک با اثرات فراگیر را افزایش داده است. از سوی دیگر رویدادهای بیوتروستی 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 این گونه عوامل نه تنها برای تأیید یک عملیات بیوتروستی، بلکه برای انجام به موقع اقدامات مناسب متناسب با عامل بیولوژیک به کاررفته جهت محافظت از سلامت عمومی باید از اهمیت زیادی برخوردار است. در این راستا قابل ذکر است که یک سری از آزمایشگاه‌های میکروبی شناسایی 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 بیولوژیک ارائه دهد (۱). شبکه پاسخ آزمایشگاهی بر اساس قابلیت آزمایش کردن عوامل بیوتروستی و شناسایی آن‌ها به چهار سطح آزمایشگاهی ساخته تقسیم می‌شود: آزمایشگاه‌های سطح A: آزمایشگاه‌های بالینی استاندارد هستند که می‌توانند نمونه‌هایی از عوامل احتمالی بیوتروستی 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 آنتراکس، یرسینیا 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 شده‌های 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 بیوتروستی 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 بیوتروستی در سطح بالا تحت شرایط خاص کنترل هستند. در این راستا، آزمایش‌ها مختلفی برای شناسایی و شناسایی عوامل تولید بیوتروست پیشنهاد شده است. اگرچه بسیاری از این فناوری‌ها ادعا می‌کنند سریع، دقیق و قابل اعتماد 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 ذکر شده آن‌ها را مورد بررسی قرار می‌گیریم (۲، ۳).

عوامل بیوتروستم

در انتقال عوامل بیماری‌زای بیوتروستم، انتقال ثانویه و بروز عفونت در محل‌های مورد حمله تأیید جزئیات 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 ایالات متحده 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 طراحی شده باشند به دلیل تولید راحت و در دسترس بودن و همچنین پتانسیل شیوع و مرگ‌ومیر بالا (۵).

روش‌های تشخیص باکتری‌های مورد استفاده در

بیوتروستم

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 ارگانیزم با روش‌های مناسب می‌شود. مرحله شناسایی نیز اغلب یک عمل زمان بر است، زیرا برخلاف ارگانیزم‌های 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 قابل استفاده برای همه نمونه‌ها برای انواع آنالیت‌های هدف باشد. به علاوه روش آماده‌سازی 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 آماده‌سازی نمونه همه موارد فوق را نمی‌توانند انجام دهند و این روش‌ها معمولاً وقت‌گیر بوده و محدود به انواع خاصی از نمونه‌هاست. در حال حاضر بسیاری از روش‌های آماده‌سازی نمونه تحت آزمایش هستند. این روش‌ها شامل دست کاری شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی نمونه هستند (۱۶).

مشکلات شناسایی عوامل بیوتروریسم

عوامل بیوتروریسم 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 می‌باشند. امروزه روش‌هایی مورد توجه قرار دارند که توانایی شناسایی طیف وسیعی از عوامل بیولوژیک با پتانسیل کاربرد در بیوتروریسم به صورت همزمان داشته باشد. این وسایل بایستی قابل حمل 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 نحوی که کمترین غلظت این عوامل را شناسایی و تعیین مقدار نمایند. این موضوع در بحث عوامل شیمیایی مورد استفاده در تروریسم اهمیت ویژه‌ای می‌یابد. 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 پایگاه‌های اطلاعاتی Scopus، Web of sciences، Pubmed و Magiran استخراج گردید. با توجه به گسترده بودن مطالب از کلید واژه‌های مختلف و استراتژی جستجوی متغیری در هر بخش استفاده گردید.

روش‌های شناسایی عوامل بیوتروریسم

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 الگوی DNA تبدیل می‌کند (۱۳، ۱۴). با توجه به ماهیت کمی qPCR، اغلب برای استفاده در سنجش‌های زیستی نسبت به PCR استاندارد مطلوب‌تر 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 ارگانیزم یا کم‌تر 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 غیرنوکلئیکی 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) نوعی تغییر در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 (qPCR) PCR 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 آگزون از اینترون‌ها، و می‌توان از نظر بالینی برای تشخیص بیماری‌های ژنتیکی و نظارت بر داروهای درمانی استفاده کرد (۱۴، ۱۵). 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

و حساسیت بالا به کاربرده شده است هر چند که تعداد مطالعات در این زمینه بسیار محدود است (۲۰). همچنین در یک مطالعه از روش الایزای توسعه داده شده جهت شناسایی پادتن های اختصاصی بولوتونیوم نورو توکسین استفاده شده است (۲۱).

روش توالی یابی کل ژنوم (WGS)

روش توالی یابی کل ژنوم که به صورت کامل با نام انگلیسی Whole Genome Sequencing معرفی می شود در کنار PCR یکی از مهم ترین پیشرفتهای علمی قرن گذشته است. اگرچه برای اجرای نمونه های بزرگ و یا نظارت مداوم بر روی محیط زیست، هنوز زمان گیر و پرهزینه باقی مانده است، اما فناوری توالی با سرعت باورنکردنی با کاهش هزینه، افزایش طول خواندن، و توان تولید نمونه با سرعت تقریباً نمایی در حال توسعه است (۲۲). این تکنیک بر مبنای تعیین توالی کل ژنوم یک ارگانیزم 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 ارگانیزم های عامل سلاح های بیولوژیک از جمله باکتری ها و ویروس ها، دچار تحول ژنتیکی سریع می شوند و دارای تنوع زیادی هستند و در نتیجه تغییرات مهمی در ژنوم زیربنایی ایجاد می شود و باکتری به سمت سویه های کشنده تر تکامل می یابد (۲۳). توالی Sanger روش اصلی برای تعیین توالی DNA بوده است اگرچه آهسته و پرهزینه است. پس از توالی ارگانیزم، توالی ژنومی آن می تواند 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 باکتری های زنده کلستریدیوم بوتولیزم و باسیلوس انتراسیس به عنوان دو عامل بیولوژیک با پتانسیل استفاده در بیوتروریسمبا عملکرد مناسب استفاده شد (۲۴).

گاز کروماتوگرافی-اسپکترومتر جرمی (GC-MS)

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

مرحله جداسازی سخت RNA استفاده شده است. این تکنیک می تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای روش سنتی RT-PCR ارائه شود (۱۴). در حال حاضر، SARS-CoV-2، آزمایش سرویس سلامت همگانی (NHS) برای تشخیص ویروس عامل کوید ۱۹، مبتنی بر تکنیکی است که واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) خوانده می شود. این تکنیک می تواند مواد ژنتیکی ویروس را در نمونه های گرفته شده از بینی یا دهان فرد تشخیص دهد. این روش کارایی بسیار زیادی دارد؛ اما نتیجه ی آزمایش فقط زمانی مثبت می شود که ویروس هنوز در بدن فرد موجود باشد (۱۵).

الایزا (ELISAs)

برای شناسایی این عوامل و ارگانیزم ها از روش های Immunoassays و ELISAs نیز استفاده می گردد. تکنیک الایزا در واقع خلاصه کلمه Enzyme-linked immunosorbent است و یک روش غربالگری که به طور عمده در علم بیوشیمی استفاده می گردد. 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 می شود هر چند که در این روش شناسایی مستقیم ویروس دنبال نمی شود بلکه پادتن های که در بدن شخص به حضور ویروس تولید می گردد را شناسایی می کند. (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 می باشد. این پروسه با نوترکیبی ژنتیکی دومین (domain) متغیر آنتی بادی برای باند شدن با آنتی ژن کد می شود و درجه بالایی از اختصاصیت را دارد (۱۷). این خاصیت آنتی بادی ها باعث شده است که آن ها اجزای ارزشمندی از سنجش های 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، آن ها همچنین به طور گسترده ای در تکنیک های مبتنی بر سطح مانند SPR و همچنین رویکردهای مبتنی بر NP مورد استفاده قرار می گیرند (۱۸). در میان تست های ایمونولوژی تست الایزا به طور گسترده در سراسر دنیا برای اندازه گیری پروتئین های ترشحی از میکرواورگانیزم ها مورد استفاده قرار می گیرد. الایزا یک سیستم ساده و چند بعدی است که امکان تعیین و اندازه گیری پادتن های تولیدی توسط میکرواورگانیزم ها را فراهم می آورد. از مزایای الایزا در مقایسه با روش PCR می توان به سرعت بالا، هزینه کم و عدم نیاز به امکانات خاص آزمایشگاهی می توان اشاره کرد (۱۹). در مطالعات گذشته نیز از روش الایزا (ELISA microarray assay) برای شناسایی همزمان چندین توکسین باکتریایی با پتانسیل بیوتروریسم با دقت

مولکول‌های هوا و از بین رفتن آن‌ها قبل از برخورد با شناساگر ایجاد می‌شود. و حدواسط بین کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنج جرمی قرار گرفته و نمونه‌ها رو از ستون کروماتوگرافی گازی به طیف‌سنج جرمی منتقل می‌کند (۲۷). در محفظه یونیزاسیون از یک منبع الکترونی به مولکول‌های وارد شده به محفظه بمباران الکترونی 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 جرمی ایده آل باید توانایی جداسازی جرم‌های جزئی را دارا باشد و امکان عبور تعداد کافی از یون‌ها را بدهد تا به شدت جریان‌های قابل اندازه‌گیری منجر شود. چندین آشکارساز برای طیف‌سنج‌های جرمی به طور تجاری موجود است، که از میان آن‌ها آشکارساز تکثیر دهنده الکترون (electron multiplier) بیش‌ترین کاربرد را دارد. یون‌های عبوری از تجزیه گر جرمی با استفاده از لنز‌های 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 لنزها تغییر مسیر نمی‌دهند، و به شناساگر نمی‌رسند، زیر رسیدن این پرتوها به شناساگر سبب ایجاد سیگنال‌های کاذب می‌شود. یون‌ها پس از برخورد با شناساگر الکترون‌های تولیدی را بیرون پرتاب می‌کند و با هر برخورد تا الکترون‌های 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 زیست‌سنجی فراهم می‌کند. MS سنتی شامل سه مرحله می‌باشد. ابتدا، آنالیت‌های (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 می‌کردند. با این حال، یونیزاسیون خشن منجر به تخریب نامنظم و غیرقابل اعتماد 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، بیواتالیت 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

کروماتوگرافی گازی فاز متحرک یک گاز می‌باشد که گاز حامل نامیده می‌شود تنها نقش گاز حامل در کروماتوگرافی 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 کروماتوگرافی 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 هلیوم 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). 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 پیش‌تر نیز اشاره شد انواع مختلف آشکارساز وجود دارد که برای ترکیبات مختلف طراحی شده‌اند. در کروماتوگرافی 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 هم‌دما 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 شناسایی 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، مایع‌ها 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 الکترون‌ها و اتم‌های تشکیل شده با

ابداعی برای تشخیص ترکیبات منحصر به فرد 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 بیوتورویسم در مطالعه Alam مورد بررسی قرار گرفت، که این روش‌ها شامل گروماتوماتوگرافی فاز مایع با کارایی بالا و الکترونیونیزاسیون به همراه RP-HPLC mass spectrometry (MS/MS -) به صورت انتقالی یا جایگزین بوده است. در این مطالعه سه پپتید مختلف با یون‌های دو قطعه‌ای از نظر تعداد و تأیید نوع آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند که هریک از این توکسین‌ها با یکی از سه روش تأیید شدند (۳۵). همچنین مطالعات دیگری MS را یک تکنولوژی دارای حساسیت بسیار بالا و کاربردی برای کشف توکسین‌های احتمالی در بیوتورویسم 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) توسعه یافته و بانک اطلاعاتی از پروفایل‌های 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 ارگانیزم 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 منحصر به فرد 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 نمونه یا ماتریکس دارد (۴۱). در روش‌های آنالیز نمونه‌ها با MS، نمونه‌ها معمولاً نیاز به مراحل اضافی نظیر استخراج کردن و به ویژه تغلیظ سازی آنالیت هدف دارند. این امر به ویژه در تشخیص عفونت‌های باکتریایی در سلول‌های کل که در آن پاتوژن هدف فقط در مقادیر بسیار جزیی در ماتریکس‌های 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

مویرگی عبور داده می‌شود و در معرض ولتاژ بالا قرار می‌گیرد و پس از آن به گاز یونیزه شده تبدیل می‌شود. این سیستم‌ها غالباً با آنالیزور 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 بیوانالیت‌ها را بر اساس مدت زمان حضورشان از طریق ردیاب جدا کرد. تهدیدات بیولوژیکی در بیوتورویسم در سال‌های اخیر نشان دهنده نیاز به حسگرهای زیستی است که قابلیت شناسایی و تشخیص عوامل خطر آفرین در زمینه بیوتورویسم را داشته باشد. این شناسایی بر پایه آشکار سازی پروب‌های مولکولی در آشکارساز با سیستم آنالیزور مخصوص می‌باشد. آنالیت‌های قابل شناسایی می‌تواند شامل سلول‌های باکتریایی، قارچ‌ها، ذرات ویروسی و یا مولکول‌های خاص مانند توکسین‌های پروتئینی یا مواد شیمیایی تولید شده از آن‌ها باشند. همچنین توالی اسیدهای نوکلئیک و پپتیدها نیز به عنوان کاوشگرهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۹، ۳۰).

تا به امروز تکنیک‌های کروماتوگرافی گازی برای کشف یا شناسایی میکرواورگانیزم‌ها تا حدی به کاررفته‌اند. بنابراین، گارنر روشی در سال ۱۹۶۵ را ارائه داد که شامل توصیف کروماتوگرافی از محصولات پیرولیز باکتری‌ها یا مواد با منشا بیولوژیکی، توسترها بود (۳۱). Yamakawa و Ueta امکان استفاده از خصوصیات کروماتوگرافی گازی اسیدهای چرب سلولی و کربوهیدرات‌ها 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 ردیاب‌های 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 غلظت‌های کم اثر سمی بر حیوانات یا گیاهان دارند، بو ایجاد می‌کنند و یا این‌ها را مهار می‌کنند. بنابراین میکرواورگانیزم‌ها، بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها 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 اکتینومیست‌ها است. به دلیل حساسیت برخی از آشکارسازهای به کاررفته در کروماتوگراف گازی، ممکن است

assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry 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 قابل شناسایی 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). در مقایسه با روش‌های تشخیصی معمول در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی که بر تست‌های 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 پروفایل‌های 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 پروتئین‌های مختلف را از باکتری یا اسپور تشخیص دهد مانند باسیلوس آنتراسیس، بورخولدریا مالمی، ایشرشیاکلی O157,175، کوکسیلا بورتنی و یرسینیا پستیس از جمله باکتری‌هایی هستند که توسط روش MALDI-TOF-MS با موفقیت شناسایی شده‌اند. 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 فاکتورهای ویروالانس پلاسمید است که می‌تواند امضای بیوشیمیایی منحصر به فرد مورد استفاده برای نشان دادن یک شناسایی مثبت را پیچیده کند. یک روش جایگزین، ESI-TOF منحصر به فرد برای تشخیص آمپلیکن PCR مناسب است. در این روش، اهداف PCR تقویت شده 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

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).

کروماتوگرافی 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 کروماتوگرافی 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. کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی عمدتاً برای شناسایی درشت مولکول‌های آلی به کار برده می‌شود. در این مطالعه استفاده از کروماتوگرافی 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 دنا توره (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 میکروساتلیت‌ها (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 سکانس‌های 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 توسعه یافته است. در این راستا روش matrix-

شناسایی است (۵۶). در این روش ارگانسیم‌ها از نظر مورفولوژیکی قابل تفکیک هستند. به علاوه، باکتری عامل تبیه نام کوکسیلا بورنتی توسط این میکروسکپ قابل شناسایی است. اگرچه به عنوان یک تست روتین استفاده نمی‌گردد (۵۴). در کاربردهای پژوهشی بسیاری از میکروسکپ الکترونی عبوری جهت بررسی جنبه‌های 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 قابل شناسایی 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 خانواده‌ها و جنس‌ها 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 وارسیلا 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 نانومتر قطر دارد (پاکس ویروس‌ها) (۵۴). همچنین ویروس‌های رشته‌ای مانند ماریبورگ 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 بسیار کوچک نظیر باکترویوفاژها هستند که قطری حدود ۲۰ نانومتر دارند و عمدتاً باکتری‌ها را آلوده می‌کنند (باکترویوفاژ). 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 هیپاتیت (۵۸)، پارو ویروس‌ها، هرپس ویروس‌ها و آدنو ویروس‌ها 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

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-روشی (REM-STEM) هستند.

میکروسکپ الکترونی روبشی

در مطالعات گذشته از میکروسکپ الکترونی روبشی برای شناسایی باکتری‌ها استفاده شده است. در یک مطالعه به طور ویژه از میکروسکپ الکترونی روبشی جهت شناسایی باکتری‌ها 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 از 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 قابل شناسایی 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 وپیل *Tropheryma whippelii* بعضی اوقات ممکن است در بیوپسی روده یافت شود. باکتری‌های دارای فرم‌های بدن ماریچی، مانند هلیکوباکتر پیلوری و هلیکو باکتر هلمانی به راحتی در بیوپسی‌های معده توسط میکروسکپ الکترونی عبوری قابل

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 بیماری‌زا 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 سوab یا سرم، تقویت قابل توجهی برای LAMP گزارش می‌دهند. هر دو نوع ویروس‌های DNA و RNA توسط LAMP قابل شناسایی 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 استفاده شده 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 به کاررفته 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 و ویروس مسؤل 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 آنفلانزای مرغی H5N1 و ویروس اوریون می‌باشد (۶۶-۷۰).

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 شود که 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 گروه‌های 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 توسعه یافته است (۶۳). در این روش تکثیر و شناسایی ژن می‌تواند در یک مرحله به وسیله قرار دادن مخلوط نمونه‌ها، آغاز گر، پروب‌ها و DNA پلیمری با قابلیت جانیشنی رشته و اجزای مورد عمل در یک دمای ثابت که حدود ۶۵ درجه سانتی‌گراد 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 تولید شده 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

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

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

۴	Cirino et al	۲۰۰۴	Bacillus antracis Yersinia pestis Francisella tularensis Clostridium botulinum and...	-	PCR	(۷۲)
۵	Demirev et al	۲۰۰۸	<i>F. tularensis</i> and <i>Y. pestis</i>	Lab.	Mass Spectrometry	(۷۳)
۶	Lasch et al	۲۰۱۰	Yersinia species	Robert-Koch Institut (RKI)	MALDI-TOF-MS	(۱۰)
۷	Jeng et al	۲۰۱۳	<i>F. tularensis</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Brucella</i> , <i>Burkholderia</i> , and <i>Rickettsia</i>	respiratory infections	PCR-Electrospray	(۷۴)
۸	Baldwin et al	۲۰۰۹	156 diverse bacterial isolates	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	<i>Burkholderia pseudomallei</i> and <i>Burkholderia mallei</i>	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 Neurotoxicogenic 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 spectrometry	(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)

نتیجه گیری

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 می‌تواند در شناسایی عوامل بیولوژیک با قابلیت بیوتروریسمی 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 کربوهیدرات‌ها 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 میکروسکپ‌های 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 تک‌دمایی 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 ذکر شده 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، جمع‌آوری مطالب، راهنمایی، اصلاح و نگارش نهایی و تهیه نسخه نهایی همکاری داشته‌اند. و نویسندگان به تأیید نهایی مقاله حاضر مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه

تضاد منافی 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. Pejmanhah S, Pejmanhah 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. Kliemann 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 *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* from each other, *Burkholderia thailandensis* and several members of the *Burkholderia 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'homme 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 neurotoxicogenic 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. Mavrikakis 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