اپیدمیولوژی بالینی و کنترل بیماری‌های مرتبط با

بیوتروریسم

کتاب دوّم / گفتار نهم

روش‌های تشخیص سریع عوامل بیولوژیک

فهرست مطالب

مقدمه ۵۰۵
روش‌های نوین تشخیص و طبقه بندی عوامل عفونی : ۵۰۶
روش PCR ۵۰۶
مرحله اول یا جداشدن دو رشته DNA ۵۰۷
مرحله دوم یا اتصال پرایمرها (Anealling) ۵۰۷
مرحله سوم (Extension) ۵۰۷
مقادیر استاندارد PCR ۵۰۸
مقادیر مواد مورد نیاز در یک PCR استاندارد : ۵۰۸
شرایط و برنامه چرخه‌های PCR ۵۰۸
- چرخه‌های حرارتی: ۵۰۸
آزمایشگاه استاندارد محیط PCR ۵۰۹
تعیین ردیف ژنها: ۵۱۲
کاوشگرهای ژنی (Gene probe) ۵۱۲
تراشه ژنی (Genechip) ۵۱۳
بیوسنسورها یا حسگرهای زیستی ۵۱۳
روش‌های ایمونولوژیک: ۵۱۳
تجزیه پروتئینی جهت تشخیص عوامل: ۵۱۴
فلوسیتومتری (Flow cytometry) ۵۱۵
گاز کروماتوگرافی و مس اسپکترومتری ۵۱۵
روش‌های تشخیص از راه دور یا دور سنجی (Remot sensing) ۵۱۷
آئروبیولوژی (Aerobiology) ۵۱۷
بررسی و کارایی روش‌های مختلف در تشخیص عوامل بیولوژیک: ۵۱۸
منابع: ۵۱۹

روش‌های تشخیص سریع عوامل بیولوژیک

دکتر علی کرمی
مرکز پزشکی تحقیقات دفاع بیولوژیک، پژوهشکده طب رزمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

مقدمه

توجه روزافزون به اهمیت سلاح‌های بیولوژیک و افزایش تهدیدهای به کارگیری این عوامل در جنگ‌ها، عملیات تروریستی و تهاجم مخفیانه به منابع اقتصادی، ضرورت تشخیص سریع عوامل بیولوژیک نظامی را بطور جدی مطرح ساخته است. هرچند بر خلاف عوامل شیمیایی و هسته‌ای که در مقادیر بسیار کم توسط دستگاه‌های تشخیصی بسیار سریع و حتی از فاصله دور قابل شناسایی می‌باشند عوامل بیولوژیک بدلیل پیچیدگی مولکولی مشکلاتی را در امر تشخیص سریع ایجاد می‌نمایند.

مشکل اساسی و اولیه در برنامه‌ریزی و آمادگی برای مقابله با جنگ‌های میکروبی، آگاهی از وقوع حمله و حضور عوامل بیولوژیک در منطقه است. روش‌های ذکر شده در منابع آموزشی دفاع برعلیه جنگ‌های بیولوژیک و روش‌های تشخیص وقوع حمله، عمدتا مبتنی بر علائمی است که پس از حضور و تاثیر عوامل در موجودات زنده ایجاد می‌شود. در واقع با این روش‌ها زمانی تشخیص صورت می‌گیرد که عامل، موثر واقع شده و در حال توسعه است، در حالی که تشخیص حضور عامل باید قبل از بروز علایم و صدمات بیشتر امکان‌پذیر باشد.

هدف از تشخیص سریع حمله یا حضور عوامل بیولوژیک، عبارت از آگاهی در زمان کوتاهی پس از وقوع حمله و قبل از مبتلا کردن (***ناتوانی یا مرگ یا آلوده نمودن اهداف مورد نظر، شامل انسان، منابع آب، دام‌ها و محصولات استراتژیک کشاورزی و غذایی***) است به نحوی که اوّلا بتوان با اعلام هشدار، اقدامات حفاظتی فردی و جمعی ضروری را انجام داد و ثانیا از توسعه عامل به سایر مناطق، جلوگیری کرده و نیروهای مسئول پدافند و امداد و درمان و بهداشتی به پاکسازی و قرنطینه و سایر اقدامات زمان حمله بیولوژیک بپردازند.

روش‌های آزمایشگاهی متداول تشخیص میکروب‌ها، استفاده از انواع کیت‌های تشخیصی، روش‌های غیرابزاری مانند آگلوتیناسون با لاتکس و روش‌های دستگاهی پیشرفته مانند Bactec که براساس خواص بیوشیمیایی به طور خودکار به تشخیص میکروب‌ها می‌پردازند، بدلیل محدودیت‌های که دارند برای اهداف مورد نظر در مناطق جنگی، مناسب نبوده و قادر به تفکیک عوامل بیولوژیک دستکاری شده با روش‌های مهندسی

ژنتیک و عوامل عفونی عادی نیست.

متاسفانه کاربردهای غیرصلح آمیز از روش‌های مهندسی ژنتیک می‌تواند یک میکروب غیربیماریزا را به عاملی بسیار کشنده تبدیل نماید. هم اکنون موارد بسیاری از پیوند نمودن ژن‌های سموم بسیار خطرناک مانند سم بوتولینوم، ریسین، آبرین، سم مار و عقرب و همچنین انتقال ژن‌های رمزکننده عوامل کشنده عفونی مانند وبا، طاعون، سیاه زخم به میکروب‌های بی خطر گزارش شده است و بدیهی است در صورت بکارگیری روش‌های فوق برای تشخیص این عوامل، آن‌ها را بی خطر شناسایی خواهد نمود.

توسعه روش‌های زیست شناسی مولکولی، شناسایی ژن‌های مسئول بیماری‌زایی و حدّت عوامل عفونی خطرناک (Virulence Factor) و ژن‌های رمزکننده سموم خطرناک (Toxgene) این امکان را فراهم ساخته است که بتوان با این روش‌ها با دقت و سرعت فراوان به شناسایی این میکروب‌های خطرناک پرداخت. کارایی این روش‌ها در عرصه عمل و مناطق جنگی، مورد آزمایش بوده به نحوی که در جنگ خلیج فارس نیروهای متحد غربی با احتمال بکارگیری عوامل بیولوژیک توسط عراق از این نوع روش‌ها استفاده وتجهیزات مورد نظر را بکار گرفتند.

روش‌های نوین تشخیص و طبقه بندی عوامل عفونی :

۱) واکنش زنجیره‌ای تولید DNA در لوله آزمایش (Polymerase Chain Reaction (PCR))
۲) کاوشگرهای ژنی
۳) بررسی اسیدهای نوکلئیک و تعیین ردیف آن‌ها
۴) تراشه‌های ژنی
۵) روش‌های ایمنی شناسی
۶) فلوسیتومتری ـ مس اسپکترومتری
۷) حِسگرهای زیستی

روش PCR

واکنش زنجیره‌ای تکثیر ژن یا Polymerase Chain Reaction سبب تحول در عرصه‌های متنوعی از علوم پایه، پزشکی، کشاورزی و بخصوص زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی گردیده است. این روش در سال ۱۹۸۷ توسط ***کری مولیس*** ابداع و ثبت گردید. اساس این روش براساس فرایند رونوشت برداری DNA توسط آنزیم پلی‌مراز است که در درون تمام سلول‌های زنده صورت می‌گیرد. بدین صورت که با طراحی دو پرایمر که ردیف کوتاهی ازDNA تک رشته‌ای شامل ۱۷ـ۲۵ باز به عنوان ابتدا و انتهای ژنی که قرار است تکثیر شود، و قرار دادن واحدهای ساختمانی مورد نیاز جهت رونوشت برداری شامل نوکلئوتیدهای، dATP dCTP, dGTP, dCTP در محیطی بافری مناسب و در دستگاه چرخه‌های حرارتی، آنزیم پلی‌مراز قادر است طی مراحل سه گانه زیر اقدام به تکثیر بخش مابین دو پرایمر نماید.

مرحله اول یا جدا شدن دو رشته DNA (Denaturation)

در این مرحله که در دمای ۹۵–۹۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد در اثر افزایش دما باندهای هیدرژنی بین جفت بازهای DNA شکسته و دو تک رشته ایجاد می‌شود.

مرحله دوم یا اتصال پرایمرها (Anealling)

در این مرحله که در دمای بین ۸۰–۴۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد (که براساس ردیف پرایمرها متفاوت می‌باشد و هر جفت پرایمر دارای دمای بهینه اتصال است) پرایمرها که مکمل بخش ابتدایی و انتهایی ژن مورد نظر می‌باشند به ردیف مکمل خود در تک رشته DNA موجود در محیط واکنش متصل می‌شوند.

مرحله سوم (Extension)

در این مرحله که در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد آنزیم پلی‌مراز موجود در محیط واکنش از انتهای ۳ محل اتصال پرایمر شروع به تکثیر و تکمیل DNA با نصب نوکلئوتیدهای موجود در محیط به جایگاه‌های خود بر روی تک رشته در ادامه ردیف پرایمر براساس **قانون مکملیت** می‌نماید.

سکانس بدین شکل که از انتهای محل اتصال پرایمر به رشته DNA مورد آزمایش شروع کرده و براساس موجود در آن باز مکمل آن را قرار می‌دهد. آنزیم‌های پلی‌مراز قادر هستند در هر ثانیه بین ۳۵ تا ۱۰۰ نوکلئوتید را در رشته متصل نمایند (بسته به نوع بافر و سایر شرایط محیطی و ساختار نمونه) بنابراین در عرض مدت کوتاهی براساس اندازه مابین دو پرایمر از دو تک رشته اولیه DNA مادر دو رشته کامل در بخش بین دو پرایمر تکثیر می‌گردد. در این زمان چرخه اول به پایان می‌رسد و تکرار می‌گردد. یعنی مجددا دما به ۹۴ درجه افزایش می‌یابد که سبب جدا شدن دو رشته DNA هم در نمونه و هم دو رشته قبلی حاصل تکثیر در لوله می‌شود و در پی آن با کاهش دما به دمای اتصال پرایمرها و چسبیدن پرایمرها به تک رشته‌های حاصل و افزایش دما به ۷۲ درجه، چرخه دوم تکثیر صورت می‌گیرد که نتیجه آن تولید ۴ قطعه DNA محصول می‌باشد.

این روند بین ۴۰–۲۵ چرخه تکرار می‌گردد و همچنان که مشاهده شد به طور افزاینده‌ای محصول، تولید می‌گردد به نحوی که از یک رشته DNA پس از ۳۰ چرخه، تعداد بیشماری رونوشت از محصول تهیه می‌گردد که با قرار دادن مقدار اندکی از محصول نهایی PCR در ژل اگاروز قابل مشاهده است.

با توجه به اینکه پلی‌مرازهای عادی، حساس به حرارت هستند لازم بود در هر چرخه آنزیم اضافه شود که با کشف پلی‌مراز مقاوم به حرارت از یک نوع باسیلوس گرمازی موسوم به Thermus aquaticus با یک مرحله اضافه کردن آنزیم در ابتدای PCR جدا شده از آب‌های گرم انجام واکنش، این واکنش تا بیش از ۴۰ چرخه عملی گردید.

با توجه به قدرت انجام چرخه‌های مختلف، این فرایند واجد حساسیت بسیار زیادی است به نحوی که

قادر به شناسایی ۰/۰۰۲ پیکوگرم DNA یا حضور چند باکتری در نمونه می‌باشد که کارایی بسیار با کاربردهای بسیار متنوع وجود PCR بالایی در تشخیص عوامل بیولوژیک دارد. انواع بسیار مختلف دارد مانند Long PCR ، Rapid PCR ، Insitu PCR ، Nested PCR Multiplex ، RT-PCR ، DOP-PCR Degenerate Oligonucleotide ، PCR-ELIZA Random PCR ، PCR از این روش جهت بررسی موتاسیون، شناسایی بیماری‌های Primed In Situ labeled (PRINS) وراثتی، شناسایی عوامل عفونی، مطالعه و کلونینگ ژن‌ها و یا هرگونه مطالعه بر روی ژن‌ها و پروتئین‌ها استفاده می‌شود و بـه عنوان یک روش اساسی و کارا در زیست شناسی مولکولی، میکرب شناسی ، ایمنی شناسی، بیوشیمی و علوم کاربردی مطرح است.

مقادیر استاندارد PCR

برای انجام واکنش PCR مقادیر استانداردی تعیین گردیده است که در ابتدای شروع کار می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. البته در مورد موضوع خاص مورد بررسی می‌توان مقادیر مناسب و بهینه جهت کسب نتایج مطلوب در هر آزمایشگاه را بطور نسبی تعیین نمود ولیکن قطعا برای هر آزمایشگاه و هر عامل و نوع نمونه، لازم است بهینه سازی‌ها صورت گیرد.

مقادیر مواد مورد نیاز در یک: PCR استاندارد :

غلظت پرایمرها : mM ۶-۱/. (از ۵ تا ۲۰ پیکومولار در میکرولیتر می‌تواند استفاده شود)

dATP, dCTP, GATP, Dttp,dNTP از هرکدام mM ۲۰۰-۱۰۰

از MgCl۲ به مقدار mM ۲/۵-۱

bufferx۱۰ :۲,۵ ul برای هر واکنش

آنزیم Taq_۲/۵-۱ واحد

DNA مقادیر مختلف

PH واکنش ۹-۸/۳

شرایط و برنامه چرخه‌های PCR

علاوه بر تهیه مواد و ترکیبات فوق نوع دستگاه PCR از عوامل بسیار مهم در انجام آزمایش و همچنین برنامه‌ای است که در آن چرخه‌های حرارتی یا Thermal Cycler & PCR Machine صورت می‌گیرد.

- چرخه‌های حرارتی:

از عوامل بسیار مهم در کسب نتایج مناسب از PCR برنامه ریزی مناسب چرخه‌های حرارتی است که در آن باید موارد زیر مد نظر باشد:

۱) زمان و دمای اولیه قبل از شروع چرخه‌های اصلی (Hot Start)

۲) زمان اولیه جدا شدن دو زنجیره (Denaturation)

۳) زمان و دمای مرحله اتصال پرایمرها (Anealling)

۴) زمان و دمای مرحله گسترش زنجیره (Extension)

۵) زمان و دمای نهایی گسترش زنجیره
۶) تعداد چرخه‌ها

زمان و دمای استاندارد یک PCR به شکل زیر می‌باشد

دما و زمان‌های ارائه شده براساس نوع دستگاه و مشخصات بخش در حال بررسی می‌تواند متفاوت باشد.

مرحله ۱ـ ۹۴ درجه ۵–۳ دقیقه موسوم به Hot Start
مرحله ۲ـ ۹۴ درجه ۱ دقیقه
مرحله ۳ـ ۸۰–۴۵ درجه ۱ دقیقه بسته به طول محصول متفاوت است.
مرحله ۴ـ ۷۲ درجه ۲–۱ دقیقه
مرحله ۵ـ ۷۲ درجه ۱۰–۵ دقیقه
تعداد چرخه ۴۰ـ۲۵ بسته به طول محصول متفاوت است.

مهمترین عامل در این بین دمای اختصاصی اتصال پرایمرها به DNA نمونه است که به روش‌های مختلفی تعیین می‌گردد.

روش محاسبه دمای اتصال پرایمرها

روش عادی احتساب ۲ درجه برای بازهای A,T و مقدار ۴ درجه برای بازهای G,C است که البته برای پرایمرهای زیر ۲۵ باز می‌تواند استفاده شود.

روش دیگر استفاده از برنامه‌ای متداول مولکولار بیولوژی مانند الیگو، DNASIS, DNASTAR و بسیاری دیگر از برنامه‌های موجود در شبکه اینترنت است که با دادن ردیف پرایمرها دمای اتصال آن را ارائه می‌دهد.

البته شرکت‌های تولید کننده پرایمر هنگام ارسال پرایمر دماهای مختلف اتصال پیشنهادی را برای هر پرایمر ذکر می‌کنند که برای شروع کار می‌توان از آن‌ها برای شروع کار استفاده کرد.

ولی قطعا باید جهت تعیین دمای اتصال مناسب هر پرایمر بهینه‌سازی صورت گیرد زیرا براساس نوع نمونه و شرایط کار و دستگاه تفاوتی بین دمای محاسبه شده نظری با دمای واقعی کار به دست می‌آید که دستگاه گرادیان در تعیین این دما بسیار کارساز است.

آزمایشگاه استاندارد محیط PCR

حساسیت فوق‌العاده واکنش PCR در عین حالیکه یک مزیت اساسی در تشخیص سریع عوامل است در صورت عدم رعایت نکات ایمنی می‌تواند مشکل‌ساز باشد. حضور مقادیر بسیار کم DNA می‌تواند سبب بروز

واکنش‌های متقاطع و آلودگی آزمایش گردد. یکی از معضلات اساسی این روش دیگری است که سبب بروز پاسخ‌های DNA آلوده شدن مواد اولیه به مواد دیگر مانند پرایمرها و نامناسب و یا اختلال در مسیر واکنش است.

در صورت عدم رعایت نکات ایمنی و بروز آلودگی رهایی از آن بسیار دشوار خواهد بود به همین دلیل مراکز تحقیقاتی و آزمایشگاه‌هایی که بطور مکرر و با تعداد زیاد آزمایش فوق را انجام می‌دهند و در عین حال نمونه‌های مختلفی وارد محیط کار می‌شود نکات ایمنی خاصی را در طراحی آزمایشگاه و روش کار اعمال می‌کنند تا از بروز این آلودگی‌ها بکاهند.

نکات اساسی این روش‌ها در جدا کردن محل سه عملیات اساسی برای انجام PCR است که می‌تواند بسیاری از مشکلات را حل کند:

- **بخش قبل از انجام آزمایش یا Pre PCR** : در این بخش نمونه‌ها مراحل مقدماتی تهیه و آماده شدن را طی می‌کنند. مانند استخراج ژنوم و مراحل تخلیص، رقیق کردن و غیره.

- **بخش انجام آزمایش یا PCR :** در این بخش عملیات اصلی PCR صورت می‌گیرد و دستگاه چرخه‌های حرارتی جهت پیشگیری از هرگونه آلودگی در آن قرار گرفته است. برای ترکیب کردن واکنش از هودهای مخصوصی استفاده می‌شود که مانع ورود مواد و آلودگی های خارجی به داخل لوله PCR می‌شوند. زمانی که دستگاه بکار خود ادامه می‌دهد از ورود هرگونه عامل آلودگی بداخل آن جلوگیری می‌شود.

- **عملیات پس از خاتمه چرخه‌ها یا Post PCR** : در این محل نمونه‌های خارج شده از دستگاه را برای، الکتروفورز آماده می‌سازند و آزمایش جداسازی باندها و رنگ آمیزی و مشاهده می‌تواند در این بخش صورت گیرد.

بنابراین برای کسب نتایج مناسب از این روش رعایت نکات ایمنی، جداسازی این سه بخش یا حداقل تهیه هودهای مخصوصی که مانع آلوده شدن واکنش می‌گردد توصیه می‌گردد علاوه بر آن رعایت نکات زیر می‌تواند منجربه کاهش آلودگی و افزایش کارایی شود :

- از وسایل استریل استفاده شود (لوله‌ها، سرپیپت‌ها و مواد مانند آب مقطر و غیره)
- در هنگامی که تعداد زیاد نمونه و لوله‌ها وجود دارد حتما master mix تهیه شود.
- مواد اولیه را حتما در محیط عاری از آلودگی نگهداری کنید.
- واکنش را در زیر هود مخصوص یا محیط مناسبی که جریان هوا در آن وجود ندارد تهیه کنید و در هنگام ترکیب مواد از صحبت کردن خودداری نمایید زیرا ذرات ریز بزاق و میکروب‌های هوا می‌تواند واکنش را

آلوده سازد.

- در هنگام تهیه multiplex PCR مراقب مخلوط شدن پرایمرهای اصلی و ذخیره باشید.
- داشتن آرامش و تمرکز در هنگام آزمایش و تهیه برگه مخصوص جهت آزمایش‌هائی که نشان دهنده مراحل ترکیب مواد، برنامه و محاسبات انجام شده است کمک بسیاری در پیشگیری از خطاهای احتمالی در ترکیب مواد است که یکی از اصلی ترین علل کسب نتایج متناقض می‌باشد. سعی کنید قبل از آزمایش تمام محاسبات لازم و مقادیر مورد نیاز را در یک برگه نوشته و سپس در مراحل کار با تیک زدن به هر ترکیبی که اضافه می‌کنید از سیر منطقی تهیه ترکیب مطمئن باشید.

ثبت شماره‌های دائمی برروی لوله‌ها بنحوی که در طول آزمایش ثابت بماند و سایر اطلاعات لازم می‌تواند از مخلوط شدن لوله‌ها در یک آزمایشگاه که با نمونه‌های بسیاری کار می‌کند جلوگیری نماید.

- از آنجا که رفع اشکالات در مسیر کار، نیازمند بررسی تک تک عوامل است، لذا هرگز دو عامل را با هم تغییر ندهید تا بتوانید عامل مشکل ساز را کشف کنید.

به عنوان مثال در حین انجام یکی از تحقیقات، در یک مرحله با پاسخ‌های بسیار نامناسب و غیرمنتظره‌ای مواجه شدیم که احتمال وقوع آلودگی در مراحل کار را نشان می‌داد. برای کشف علت عدم کسب پاسخ‌های مناسب و نتایج نادرست شروع به بررسی تک تک عوامل دخیل در واکنش از بافر تا آنزیم را نمودیم که dNTP در نهایت مشخص گردید آلوده شده است و خوشبختانه سایر مواد سالم مانده بود که موفق به رفع مشکل شدیم.

روش‌های بسیار سریعتری مانند PCR سریع نیز ابداع شده است که در زمانی کوتاهتر از ۱۵ دقیقه به تشخیص عامل عفونی می‌پردازد که همراه نمودن این سیستم با دستگاه فلوریمتر (Flourimeter) برای تشخیص پیشرفت فرایند با سرعتی فوق‌العاده امکان شناسایی عوامل بیولوژیک را فراهم ساخته است. در این روش از مواد نشاندار فلورسانتی استفاده می‌شود که با پیوند با مواد ژنتیکی در حال همانند سازی امکان اندازه‌گیری نور حاصل و تشخیص سریع را فراهم می‌سازد. این نوع دستگاه‌ها به Real Time PCR مشهور هستند زیرا نتیجه فرایند در زمان وقوع در نمایشگر رایانه نشان داده می‌شود و نیازی به بررسی محصول در ژل الکتروفورز نیست. از انواع اینگونه دستگاه‌ها می‌توان به نوع Rapid PCR، ، lightcycler اشاره نمود. با استفاده از این روش آزمایشگاه‌های سیاری ساخته شده که در منطقه عملیاتی به نمونه برداری و آزمایش مداوم می‌پردازد. با توجه به نیاز به تشخیص‌گرهای انفرادی، اخیرا دستگاه‌های فوق‌العاده کوچک انفرادی با حجم‌های واکنش بسیار کم و منبع تغذیه ۹ ولت ساخته شده که دارای محفظه واکنش از جنس سیلیکون می‌باشد و در مناطق نظامی و عملیاتی توسط افراد برای تشخیص سریع عوامل میکروبی استفاده می‌شود.

این نوع دستگاه موسوم به HANAA (Handheld Advanced Nucleic Acid Analyzer) که در کف دست قرار می‌گیرد و قادر است در عرض کمتر از ۱۰ دقیقه عوامل متعددی را شناسایی نماید.

شکل ۱ – دستگاه PCR کوچک دستی موسوم به HANAA

تعیین ردیف ژن‌ها:

برای افزایش دقت تشخیص به میزان قابل اعتماد، تعیین ردیف DNA یا RNA حاصل از آزمایش PCR به کمک دستگاه خودکار تعیین ردیف ژن و یا بررسی آن با الکتروفورز موئین، امکان پذیر است که به کمک اشعه بسیار باریک لیزر ردیف رمزهای ژنی خوانده می‌شوند. در این صورت رمزهای شناسایی شده بلافاصله به رایانه وارد شده و با مقایسه با بانک اطلاعات هزاران ژن عوامل بیولوژیک احتمالی که قبلا به حافظه آن داده شده نتیجه تشخیص بلافاصله و با دقت فوق‌العاده زیاد گزارش می‌گردد. این روش همانند انگشت نگاری ژنتیکی است و با توجه به ویژگی‌های خاص هر میکروب به شناسایی می‌پردازد و مستلزم صرف وقتی بین ۲ تا ۵ ساعت می‌باشد.

جدیدترین و سریعترین روش تعیین ردیف ژن‌ها که می‌تواند کاربرد خوبی در شناسایی عوامل داشته باشد به Pyrosequensing معروف است که توسط گروهی از محققین در دانشگاه صنعتی سوئد، ابداع گردیده و قادر است در عرض کمتر از چند دقیقه قطعات کوچکی از DNA را شناسایی نماید.

کاوشگرهای ژنی (Gene probe)

کاوشگرها ردیف کوچک و اختصاصی از DNA تک رشته‌ای هستند که از روی رمزهای ژنتیکی میکروب‌ها طراحی و سنتز شده و توسط مواد رادیواکتیو مانند سولفور ۳۵ یا فسفر ۳۲ و یا عوامل غیررادیواکتیو مانند فلورسانس، لومینسانس، دیگوکسی ژنین (Digoxygeni) و انواع آنزیم‌ها و مواد دیگر نشاندار می‌شوند. با اضافه کردن این کاوشگرها به نمونه در طی مراحل دورگه سازی (اتصال کاوشگر به ردیف مکمل خود) در صورت حضور عامل بیولوژیک مورد نظر کاوشگر به طور اختصاصی به ژنوم نمونه مجهول در محل مشخصی متصل می‌شود. با شستشوهای مکرر کاوشگرهای اضافی و یا کاوشگرهایی که به طور غیراختصاصی به جایگاه‌هایی غیر از محل اصلی و با پیوندی ضعیفتر در مقایسه با پیوند کامل در محل مورد نظر متصل شده اند حذف شده و در مراحل آشکار سازی براساس نوع ماده نشاندار شناسایی صورت می‌گیرد. می‌توان با مخلوطی از کاوشگرهای مختلف به بررسی شناسایی چند عامل بیولوژیک در نمونه مجهول پرداخت. آژانس تحقیقات پیشرفته دفاعی

آمریکا (Defence Advance Research Program Agency (DARPA)) با استفاده از کاوشگرهای نشاندار شده با مواد فلورسانس و روش PCR سریع دتکتورهای انفرادی عوامل بیولوژیک را تهیه نموده است. بیوسنسورهای مجهز به کاوشگرهای ژنی برای تشخیص ردیف خاصی از DNA عوامل بیولوژیک نیز قادر به تشخیص عوامل است. این بیوسنسورها حاوی ابزارهای پیزوالکتریک و اکوستیک امواج و همچنین روش فلورسانس داخلی (Total Internal Reflection Fluorscence (TIRF)) می‌باشد.

تراشه ژنی (Genechip)

روش کاملا نوینی در عرصه تشخیص بسیار سریع عوامل بیولوژیک، سرطان‌ها و بیماری‌های ژنتیکی است. دراین روش با استفاده از تراشه‌های الکترونیکی ده‌ها تا صدها هزار کاوشگر که براساس ردیف DNA عوامل بیولوژیک طراحی شده است روی آن نصب گردیده، امکان شناسایی انواع عوامل بیولوژیک وجود دارد.

به عنوان نمونه تراشه ژنی حاوی ۱۵۰۰۰ کاوشگر مختلف برای تشخیص سریع انواع ویروس ایدز طراحی شده است. علاوه بر این می‌توان با روش تشخیص همزمان چندین عامل (Simultaeneous In Situ Detection of Several Biological Agent با بکارگیری کاوشگرهای نشاندار شده‌ای که دستگاه بتواند با رنگ‌های مختلف آن‌ها را شناسایی نماید، امکان شناسایی عوامل مختلف بیولوژیک در یک نمونه وجود دارد. دلیل این عمل احتمال بکارگیریی بیش از یک عامل بیولوژیک در تهاجم میکروبی جهت افزایش کارایی، گمراه نمودن سیستم دفاع بیولوژیک و تاخیر در تشخیص است.

بیوسنسورها یا حسگرهای زیستی (Biosensors)

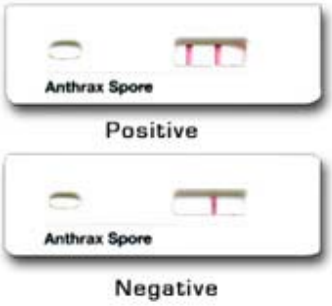
حسگرهای بیولوژیک که تلفیقی از زیست شناسی و الکترونیک است با به کارگیری گیرنده‌های اختصاصی که می‌تواند مبتنی بر سیستم‌های آنزیمی و یا واکنش‌های پادتن و پادگن باشد مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از گیرنده‌های بسیار اختصاصی عوامل بیولوژیک و پیوند آن با نشانگرهای الکترونیک می‌تواند به عنوان یک دتکتور فوق حساس و اختصاصی عمل کند بنحوی که با حضور غلظت بسیار کمی از عامل و پیوند آن با گیرنده اختصاصی با ارسال امواجی سبب فعال شدن بخش الکترونیک حسگر شده و در نتیجه هشدار حضور عامل به دستگاه‌ها و مراکز کنترل، صادر گردد.

روش‌های ایمونولوژیک:

یکی دیگر از روش‌های ارزشمند تشخیصی که کارایی آن در عرصه علوم پزشکی مشخص شده است روش الیزا (ELISA) است که بدلیل دقت و سرعت، مورد توجه مراکز دفاع نظامی قرار گرفته است و نیروهای نظامی غربی عمل کننده درجنگ خلیج فارس بدلیل ترس از به کار بردن عوامل بیولوژیک توسط عراق از این روش در آزمایشگاه سیار تشخیص عوامل بیولوژیک که قادر است در عرض مدت کوتاهی حضور چند عامل بیولوژیک در منطقه عملیات را در مقادیر بسیار کم تشخیص دهد استفاده نمود. با حرکت خودرو در منطقه، نمونه هوا بطور مداوم جمع آوری و توسط بیولومینومتر موجود در آزمایشگاه سیار وجود عوامل بیولوژیک در نمونه را

تشخیص می‌دهد سپس یک فلوسیتومتر با شکستن ذرات بیولوژیک به اجزاء آن به بررسی اینکه آیا این عوامل محیطی هستند یا باکتری عامل بیماریزا، می‌پردازد و سپس دو دستگاه دیگر با استفاده از واکنش آنتی بادی و آنتی ژن به بررسی حضور عوامل بیولوژیک جنگی در نمونه می‌پردازد. این عمل با مخلوط کردن نمونه با پادتن‌های ضد عوامل مانند سم بوتولینوم ، سم ریسین، عامل سیاه زخم و عوامل دیگر می‌پردازد. مدت آزمایش بین ۱۰ تا ۱۲ دقیقه طول می‌کشد.

تست‌های نواری (Smart Tickets) (نوار باریکی از کاغذ حساس که در آن پادتن‌های اختصاصی عوامل بیولوژیک قرار دارد و در حضور عامل مورد نظر در نمونه با واکنش آنزیمی تغییر رنگ می‌دهد) به دلیل سهولت استفاده در مناطق جنگی به شدت مورد توجه قرار گرفته و در عرض کمتر از چند دقیقه تشخیص صورت می‌گیرد. نیروهای ناتو به دتکتورهایی از این نوع مجهز هستند که قادر به تشخیص عوامل بیولوژیک شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها و سموم بیولوژیک است.



آژانس تحقیقات پیشرفته دفاعی آمریکا به تهیه یک دتکتور بیولوژیک با استفاده از فیبر نوری پوشیده با پادتن‌های اختصاصی ضد عوامل بیولوژیک پرداخته است. وزن این دستگاه یک کیلوگرم است و آزمایش‌ها، موفقیت آن در تشخیص سم بوتولینوم به میزان ۵ نانوگرم در میلی لیتر را در عرض کمتر از یک دقیقه نشان داده است و سایر عوامل مانند سم ریسین، و عوامل سیاه زخم و طاعون با تعداد ۱۰۰۰ باکتری در میلی لیتر را میتوان با این دستگاه تشخیص داد.

تجزیه پروتئینی جهت تشخیص عوامل:

از پیشرفته ترین روش‌های تشخیص عوامل بیولوژیک تعیین نقشه پروتئینی آن‌ها به کمک روش‌های مولکولی مانند الکتروفورز با لوله موئین است که بخصوص برای تشخیص سموم یا پپتیدهای با منشاء بیولوژیک مانند برادی کینین، وازوپرسین، اکسی توسین، بومبزین، و انکفالین‌ها به کار می‌رود که در عرض ۱۰ دقیقه همه این پپتیدها از هم تفکیک شده و مورد شناسایی واقع می‌شوند. با توجه به اینکه در ساختار این مواد DNA وجود ندارد از روش‌های بررسی ژنی مانند PCR نمی‌توان به تشخیص آن‌ها پرداخت.

فلوسیتومتری (Flow cytometry)

از روش فلوسیتومتری جهت بررسی خصوصیات سلول‌ها استفاده می‌شود ولی اغلب این دستگاه‌ها بسیار بزرگ و غیرقابل حمل هستند. اخیرا فلوسیتومتر بسیار کوچک، دقیق و قابل حملی موسوم به فلوسیتومتر کوچک (مینی فلو) ساخته شده که در خودرو تشخیص عوامل بیولوژیک ارتش آمریکا موسوم به بیدز BIDS (Biological Integrated Detection System) استفاده می‌شود. آئروسل‌های (ذرات کوچک قابل تنفس = افشانه) حاوی عوامل بیولوژیک در یک نمونه مایع به اجزاء کوچکتر خود شکسته می‌شوند و یک نوع رنگ با فرمول خاص به آن اضافه می‌شود سپس نمونه به مرکز جریان سریعی از مایعی تزریق می‌شود که از روزنه‌ای عبور یک باریکه نوری به آن تابیده می‌شود و نور حاصل از بازگشت، اندازه‌گیری می‌شود. در صورت وجود سلول‌های باکتری در نمونه، نورهای منعکس شده از آن در زوایا و طول موج‌های مختلف با استفاده از فیلترهای مخصوص و لوله تقویت کننده‌ای جمع آوری شده و اطلاعات مربوطه در مورد شکل و اندازه و همچنین میزان نور آن با روش Pattern recognition مورد بررسی قرار می‌گیرد. بدین طریق باکتری‌ها از بین سایر عوامل بیولوژیک محیطی مانند دانه‌های گرده و گرده قارچ‌ها و غیره تفکیک می‌شوند. اخیرا فلوسیتومتری با روش جدید فسفورسانس، طراحی شده است که می‌تواند ۶۰ نوع عامل بیولوژیک را به طور همزمان تشخیص دهد. این دستگاه قادر است با روش‌های نوری و الکتریکی با سرعت ۱۰۰۰ سلول در ثانیه با نمونه برداری مداوم به تشخیص حضور عوامل بپردازد. جهت تشخیص ذرات بسیار ریز مانند ویروس‌ها و پروتئین‌ها، از دانه‌های بسیار ریز و مخصوصی که سطح آن‌ها از پادتن‌های ضد عوامل بیولوژیک پوشانده شده استفاده می‌شوند. در صورت حضور عوامل بیولوژیک ویروسی از طریق پادتن‌های اختصاصی به این ذرات متصل شده و با شنناسایی ذرات، تشخیص صورت می‌گیرد.

گاز کروماتوگرافی و مس اسپکترومتری

از این روش‌ها قبلا برای تشخیص عوامل شیمیایی استفاده شده است ولی تلاش برای استفاده از آن برای تشخیص عوامل بیولوژیک بدلیل بزرگی و شکننده بودن عوامل بیولوژیک برای مس اسپکتروسکوپی مناسب امکانپذیر نبوده است. آژانس تحقیقات دفاعی ارتش انگلیس توانسته است حضور پروتئین و ویروس‌ها را توسط مس اسپکترومتر نشان دهد. این مشکل توسط محققین این آژانس با استفاده از سیستم یونیزه کننده به روش افشانه الکتریکی (Electerospray Ionization) که امکان انجام آن را در فاز مایع، امکان پذیر ساخته مرتفع شده است که در آن عامل بیولوژیک، بطور کاملا دست نخورده باقی می‌ماند. این روش همچنین سبب می‌شود که یون‌ها چندین شارژ مختلف داشته باشند که سبب کاهش نسبت جرم به شارژ تا نقطه‌ای می‌شود که قابل اندازه‌گیری برای دستگاه است.

روش دیگر استفاده از **دستگاه مالدی** (MALDI) Matrix assisted laser desorption ionization) است. در این روش از یک تابش بسیار سریع لیزر برای یونیزه کردن ملکول‌های درشت بیولوژیک قرار گرفته بر روی یک سطح استفاده می‌شود. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی ارتش آمریکا در حال تهیه نوع بسیار کوچک

مالدی همراه با مس اسپکترومتر برای تشخیص عوامل بیولوژیک در منطقه جنگی است.

در دستگاه تشخیص عوامل بیولوژیک ارتش انگلیس موسوم به BDS (Biological Detection System) که در جنگ خلیج فارس به کار گرفته شد از روش آنزیمی استفاده شد. آنزیم بکار رفته لوسیفراز بود که برای تشخیص حضور ATP که در تمام سلول‌های زنده وجود دارد استفاده می‌شد. این روش قادر است حضور ۱۰۰۰ سلول باکتری را در نمونه در عرض چند دقیقه تشخیص دهد. آژانس تحقیقات وزارت دفاع انگلیس در حال تهیه یک لومینومتر جریان مداوم (Continuose-Flow luminometer) است که با سرعت بالا و روشی آسان حضور ATP را در غلظت کم اندازه گیری کند. این روش می‌تواند برای ساخت سیستم هشدار دهنده حضور غلظت بسیار کم مواد میکروبی در عرض چند دقیقه به جای ساعت‌ها و روزها در روش‌های متداول استفاده شود.

روش‌های دیگری چون **مس اسپکترومتر** با افشانه الکتریکی برای تشخیص حضور عوامل بیولوژیک در ابر آئروسل توسط مرکز جنگ‌های میکروبی کانادا طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است که به دستگاه سیبـــــاد (Canadian Integrated Biological Agent Detection System) (CIBADS)) یا سیستم تشخیص عوامل بیولوژیک کانادا موسوم است. نوع جدید این دستگاه موسوم به CIBAD II برای مرکز تحقیقات دفاعی سافیلد کانادا (Defence Research Stabilishment Suffield) (DRES) ساخته می‌شود که واجـد بخش‌های تشخیص و شناسایی عامل است که شامل ابزارهـــای نمونه گیری، دستگـــاه تشخیص ذرات فلورسنت فلاپس (Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer) (FLAPS)) و حسگرهای هواشناسی و گیرنده تعیین موقعیت ماهواره‌ای (Global Positioning System) (GPS)) است.

ادعا می‌شود که این دستگاه تنها سیستم تشخیصی در جهان است که قادر است حضور عوامل زنده را از بین سایر ذرات موجود در نمونه‌های هوا تشخیص دهد. سیستم قادر است عوامل شیمیایی و بیولوژیک در غلظت‌های بسیار کم تا حدود پنج ذره عامل میکروبی در یک لیتر هوا را تشخیص دهد و دستگاه فلاپس می‌تواند با بررسی میزان فلورسانس ایجاد شده در اثر تابش لیزر ماوراء بنفش تعیین کند که ذرات بیولوژیک هستند یا غیربیولوژیک، آزمایش‌های صحرایی با این دستگاه انجام شده است و قادر است با جمع آوری نمونه‌ها و ارسال آن به دستگاه شناسایی که براساس روش‌های پادتن و پادگن و یا سایر روش‌های شناسایی عمل می‌کند به شناسایی عامل بپردازد. تمام مراحل جمع آوری نمونه تا شناسایی دقیق عامل ۱۵ دقیقه طول خواهد کشید. وزن سیستم شناسایی عوامل بیولوژیک CIBADS II به ۴۵ کیلوگرم می‌رسد و کاملا بطور خودکار عمل کرده و ۱ کیلووات انرژی مصرف می‌کند.

ارتش آمریکا سال گذشته خودرو مجهز به سیستم فلاپس و مس اسپکترومتر تشخیص عوامل شیمیایی بیولوژیک را وارد سرویس نظامی خود نموده، دستگاه دتکتور بیولوژیک نصب شده برروی چرخ بال که در سال ۹۶ وارد کار شد واجد سیستم‌های تشخیص و هشدار می‌باشد که بیشتر در سرویس‌های خارجی و نیروهای عمل کننده در سایر کشورها و مناطق پر خطر عمل می‌کنند.

فرماندهی سیستم‌های دریایی آمریکا به عنوان مرکز اصلی ارائه دستگاه‌های تشخیص عوامل بیولوژیک برای نیروهای آمریکایی مستقر در سایر مناطق جهان است که دستگاه دتکتور بیولوژیک (IBADS) Interin Biological Agent Detection System) را در اختیار آنان قرار می‌دهد. در سال ۱۹۹۶ تعداد ۲۴ دستگاه از این دتکتورها در مقر نیروهای هوایی آمریکا مستقر در کره جنوبی نصب شد.

روش‌های تشخیص از راه دور یا دور سنجی (Remot sensing)

ایدآل ترین حالت جهت پیشگیری از صدمات سلاح‌های بیولوژیک تشخیص حضور عوامل بیولوژیک قبل از رسیدن ابر آئروسل به منطقه استقرار نیروها می‌باشد. تشخیص ذرات و آئروسل‌ها در اتمسفر که در هواشناسی پیشرفته کاربرد فراوان دارد به دور سنجی موسوم است که پیشرفته ترین آن لیدار (LIDAR) Iight Detection and Ranging) می‌باشد که برای تشخیص حضور عوامل بیولوژیک در ابر آئروسل پخش شده در فواصل دور نیز می‌تواند بکار رود که با ارسال امواج لیزر با طول موج و نوسان مشخص و برخورد به ابر آئروسل و بازگشت آن به آنتن‌های مخصوص توسط برنامه‌های پیشرفته رایانه‌ای جذب مولکولی محاسبه و اطلاعات ساختاری ذرات موجود در آئروسل، مورد شناسایی قرار می‌گیرد. این دستگاه دارای انواع ثابت و متحرک است. نوع متحرک این سیستم بر روی چرخ بال نصب شده و قادر است حضور ابر آئروسل بیولوژیک را در فاصله ۳۰ کیلومتری تشخیص دهد این عمل با پردازش و محاسبه لحظه‌ای علائم دریافتی (Real Time Signal Processing) به کمک پردازشگرهای حاوی اطلاعات بیولوژیک صورت می‌گیرد. دستگاه تشخیص سریع عوامل بیولوژیک با سیستم تحریک نور ماوراء بنفش بوسیله تریپتوفان عمل می‌کند و به (SR-BSDS) (Short Range Biological Standoff Detection System) موسوم است. هزینه ساخت این دستگاه حدود ۱۰ میلیون دلار است. در ضمن بخش تحقیقات دفاع بیولوژیک ارتش آمریکا دستگاه دیگری از همین سیستم با توان تشخیص در فواصل بیشتر قابل نصب بر روی چرخ بال تا فاصله ۱۵ کیلومتر را نیز در اختیار دارد.

از دتکتورهای دیگر عوامل بیولوژیک و نمونه بردارهای هوا برای آئروسل‌های بیولوژیک می‌توان به واحد نمونه برداری و تشخیص دهنده متحرک آئروسل‌های بیولوژیک یا ماسو (MASU) (Mobile Aerosole Sampling Detection Unit) که طرح مشترک کانادا و انگلیس برای ساخت دتکتورهای سریع عوامل بیولوژیک است اشاره کرد که با استفاده از نمونه بردارهای بسیار خوب دیکوتوموس (Dichotomus Sampler) و تعیین اندازه آئروسل به کمک دستگاه‌های اندازه‌گیر آئرودینامیک ذرات (Aerodynamic Particle Sizer) و همچنین اندازه‌گیرهای آئروسل‌های بیولوژیک ۶ ، ۸ و یا ۱۰ طبقه موسوم به اندرسن (که قادر است اندازه آئروسل‌های بیولوژیک عوامل زنده را مشخص کند) با لحاظ کردن عوامل منطقه مانند اطلاعات جغرافیایی (سرعت باد، جهت باد، رطوبت، دما و پوشش منطقه) دینامیک ابر آئروسل بیولوژیک، پراکندگی و غلظت آنرا محاسبه و اعلام می‌نماید.

آئروبیولوژی (Aerobiology)

خودرو تشخیص عوامل بیولوژیک آمریکا (بیدز) با استفاده از یک نمونه بردار و اندازه گیر آئروسل

آئرودینامیک با حجم بالا (High Volume Aerodynamic Particle Sizer) که بطور مداوم از هوا نمونه برداری کرده و از یک مجرا عبور می‌دهد اندازه آئروسل‌ها تعیین می‌شوند. بدین روش که خروجی یک اشعه بسیار باریک و دقیق لیزر به دو اشعه تقسیم می‌شود و به دو نقطه در مسیر مجرای عبور آئروسل‌ها متمرکز می‌گردد نور بازتاب توسط ذرات در مسیر عبور نمونه به یک لوله تقویت کننده امواج جمع آوری و تقویت می‌شود. زمانی که طول می‌کشد تا ذره از بین دو شعاع عبور کند برای اندازه‌گیری قطر ذره استفاده می‌شود.

ارتش آمریکا بودجه‌ای بالغ بر ۳۱/۸ میلیون دلار برای ساخت دستگاه تشخیص دقیق عوامل بیولوژیک در محل (Joint Biological Point Detection System (JBPDS)) برای جایگزینی با سیستم‌های بیدز و IBADS در نظرگرفته است که در خودروها، کشتی‌ها، مقرها و ایستگاه‌های شناسایی ثابت و سیار نصب خواهد شد. هدف تهیه دستگاهی با اندازه کوچک، وزن کم و قدرت تشخیص سریع، سموم بیولوژیک، ویروس‌ها و باکتری‌ها در زمانی کوتاه است و برای دستیابی به این هدف از تمام فنآوری‌های نوین شامل کاوشگرهای ژنی، مس اسیکترومتری با افشانه الکتریکی و فلوسیتومتری با مواد پایدارتر و شیمی تشخیص ساده تر استفاده می‌شود.

وزارت نیرو و آزمایشگاه ملی لوس آلاموس آمریکا سه نوع از دستگاه‌های تشخیص آئروسل از راه دور را تهیه کرده که قادر به نصب بر روی هلیکوپتر و خودرو می‌باشد. سال گذشته فرماندهی نیروی هوایی آمریکا نصب این دستگاه‌ها را بر روی هلیکوپترهای Black Hawk تایید نمود. این دتکتورها براساس سیستم لیدار کار می‌کنند و قادر هستند که تمام آئروسل‌های بیولوژیک را براساس میزان پخش، غلظت، موقعیت، و اطلاعات دیگر برای اهداف تاکتیکی و فاصله ۱۰۰ کیلومتر برای اهداف استراتژیک شناسایی نمایند. دتکتور بیولوژیک راه دور دیگری توسط شرکت Schwartz Electro Optics با بودجه ۱۱ میلیون دلار از طرف فرماندهی دفاع بیولوژیک ـ شیمیایی آمریکا تهیه شده است. این دتکتور لیزری بر روی هلیکوپترهای UH-٦٠ نصب شده و با استفاده از سیستم پایدار کننده برای افزایش کارایی نیروهای مخصوص برای شناسایی دقیق جایگاه و مقر سلاح‌های شیمیایی و بیولوژیک دشمن و سیستم انتقال آن‌ها در فاصله ۵۰ کیلومتری می‌باشد.

اهداف درازمدت این تحقیقات تهیه خودرویی برای تشخیص عوامل بیولوژیک و شیمیایی است که بدون نیاز به کاربر انسانی به طور مداوم به تشخیص سریع و هشدار حضور عوامل بپردازد. بدیهی است با افزایش سرعت و دقت دستگاه‌های تشخیص سریع عوامل بیولوژیک امکان پیشگیری از صدمات گسترده این سلاح‌ها که هر روز به عنوان تهدید بیشتری مطرح می‌گردند فراهم می‌شود.

بررسی و کارایی روش‌های مختلف در تشخیص عوامل بیولوژیک:

هیچ روش منفردی که بتواند تمام عوامل بیولوژیک و بیوتروریستی را با دقت کامل و در کم ترین زمان تشخیص دهد وجود ندارد. زیرا عوامل بیولوژیک شامل عوامل میکروبی (ویروس، ریکتزیا، باکتری، قارچ و عوامل نوترکیب) و همچنین سموم پروتئینی (بوتولینوم، ریسین، ابرین و سم استافیلوکوک) و سموم غیرپروتئینی مانند مایکوتوکسین‌ها نیازمند روش‌های شناسایی خاص خود هستند. روش‌های مولکولی مبتنی بر اسیدنوکلئیک (DNA

RNA) با آنکه توانایی بسیاری در شناسایی عوامل متعدد بیولوژیک می‌باشند ولیکن برای شناسایی سموم، لازم است از روش‌های دقیق ایمونولوژیک استفاده نمود.

البته فناوری نوین Micro assay که می‌تواند هم جهت تشخیص مواد ژنتیکی و هم پروتئین‌ها و سایر ترکیبات آلی به کار رود سرعت و دقت کار را افزایش داده است ولیکن به دلیل هزینه بسیار بالا هنوز در معدودی آزمایشگاه‌های پیشرفته جهان کاربرد دارد و جهت کاربردهای تشخیصی گسترده کاربرد ندارد. البته با ارزان شدن و توسعه این روش‌ها همانند روش PCR به طور گسترده تری استفاده خواهد شد.

بررسی روش‌های مختلف با کارایی مناسب نشان می‌دهد که از بین تمام روش‌های موجود، روش PCR یکی از بهترین روش‌های تشخیص سریع عوامل بیولوژیک می‌باشد.

از روش‌های ارزشمند دیگر **روش‌های نواری** است که با استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال اختصاصی عوامل در عرض ۱۵ دقیقه می‌تواند با دقت نزدیک به ۹۰٪ به شناسایی تعدادی از این عوامل بپردازد. قیمت این کیت‌ها در حال حاضر گران می‌باشد (۴۰ دلار برای هر کیت یک‌بار مصرف) در عین حال حتما در صورت پاسخ مثبت توسط روش‌های دیگر ارزیابی شود.

روش‌های **ایمونوفلورسانت** با استفاده از پادتن‌های مونوکلونال نیز واجد ارزش بسیاری است. این روش‌ها علاوه بر تشخیص عوامل بیولوژیک ذکر شده جهت تشخیص سموم نیز بکار می‌روند.

نکته مهم این است که در صورت بررسی نمونه‌های مختلف جهت تشخیص حضور عوامل بیولوژیک زنده به روش‌های سریع، حتما به طور همزمان باید بررسی به روش‌های متداول برای هر عامل براساس پروتکل‌های استاندارد آن (کشت و ایزولاسیون) صورت گیرد.

منابع:

1) Computerized Nuclear, Biological and Chemical (NBC) Analysis System. The Commerce Business Daily, 8/21/96.

2) Whitten, W, B., M. J. Shapiro, J. M. Ramsey, and B. V. Bronk. Appl. Opt. 34 (1995): 32.3-07.

3) Flemimger et al; Applied and Environmental Microbiology, 1995, p. 4357-4361.

4) Brecht et al; "Optical Probes and Transducers"; Biosensors & Bioelectronics ; PP. 923-936, 1995.

5) Vemon Loeb and Walter Pincus, Detector Reads DNA, New Device can Sense Germ Arms, Washington Post, March 3, 1999; page A20.

6) "The Utility of Sampling and Analysis for Compliance Monitoring of thr BWC," Jonathan B. Tucker, Editor, February 1997, Lawrence Livermore National Laboratory (Proceedings of a workshop held in Washington, DC in October 1996)

7) Chemical-biological agent mass spectrometer being built at ORNL. Washington Fax 07/09/199 ۸July 9. 1998

8) Wittwer CT, et al. The LightCycler: a microvolume multisample :with rapid temperature control. Biotechniques 1997; 22 (1) 176-81.

9) U. S. Crops, Animals Vulnerable To Biological Warfare, Fox News, October 27, 1999.

10) Kim Y, et al. Bacterial fingerprinting by flow cytometry :bacterial species discrimination. Cytometry 1999; 36(4) 324-32.

11) Belgrader P, Rapid Pathogen detection using a microchip PCR array instrument. Clin Chem 1998; 44(10): 2191-4.

========== فرازهائی از متن ==========

متاسفانه کاربردهای غیرصلح‌آمیز روش‌های مهندسی ژنتیک می‌تواند یک میکروب غیربیماریزا را به عاملی بسیار کشنده تبدیل نماید. هم اکنون موارد بسیاری از پیوند نمودن ژن‌های سموم بسیار خطرناک مانند سم بوتولینوم، ریسین، آبرین، سم مار و عقرب و همچنین انتقال ژن‌های رمزکننده عوامل کشنده عفونی مانند وبا، طاعون، سیاه زخم به میکروب‌های بی خطر گزارش شده است و بدیهی است در صورت بکارگیری روش‌های فوق برای تشخیص این عوامل، آن‌ها را بی خطر شناسایی خواهد نمود.

هیچ روش منفردی که بتواند تمام عوامل بیولوژیک و بیوتروریستی را با دقت کامل و در کم ترین زمان تشخیص دهد وجود ندارد. زیرا عوامل بیولوژیک شامل عوامل میکروبی (ویروس، ریکتزیا، باکتری، قارچ و عوامل نوترکیب) و همچنین سموم پروتئینی (بوتولینوم، ریسین، ابرین و سم استافیلوکوک) و سموم غیرپروتئینی مانند مایکوتوکسین‌ها نیازمند روش‌های شناسایی خاص خود هستند.