نشریه علمی پدافند غیرعامل

سال دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، (پیاپی ۳۸): صص ۱۰۵-۹۷

مطالعه سامانه‌های تشخیص مولکولی تهدیدهای زیستی مبتنی‌بر PCR با کاربرد میدانی

رضا بهمنی[۱]، محمد ابراهیم مینایی[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۵

چکیده

تشخیص دقیق و سریع عوامل تهدید زیستی نقش مهمی در کاهش آسیب‌پذیری، تداوم فعالیت‌های ضروری، ارتقای پایداری ملی و تسهیل مدیریت بحران در مقابله با این تهدیدها دارد. سامانه‌های تشخیصی عوامل بیولوژیک موجب کارآمدی در پدافند غیرعامل زیستی خواهد شد. در حال حاضر، در حوزه تشخیص سریع و دقیق عوامل زیستی در میدان، سامانه‌های متنوعی طراحی و ساخته شده که به روش توصیفی- تحلیلی و بر اساس شاخصه‌های کاربردی مورد بررسی قرار گرفته و مهم‌ترین آن‌ها معرفی شده است. با مطالعه رویکرد کشورهای مختلف، روش‌های تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک به دلیل دقت بالا و سرعت بیشتر نسبت به روش‌های قدیمی، مورد توجه و تمرکز قرار گرفته‌اند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در میان انواع سامانه‌های تشخیصی عوامل زیستی، روش‌های تشخیص مولکولی با کاربرد میدانی- عملیاتی و با دقت و سرعت بالا در اولویت توسعه و دستیابی به فناوری‌های تشخیص تهدیدات زیستی بوده که می‌تواند نقش مؤثری در پدافند غیرعامل ایفاء نماید.

کلیدواژه‌ها: سامانه‌های تشخیص مولکولی، تشخیص زیستی، تهدید زیستی، پدافند غیرعامل

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲- استادیار، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران، mminaii@ihu.ac.ir- نویسنده مسئول

۱- مقدمه

فناوری‌های تشخیص سریع، دقیق و حساس برای عوامل بیماری‌زا در تشخیص بالینی، کنترل بیماری، پایش محیط‌زیست، ایمنی مواد غذایی و در حوزه‌های دفاعی و امنیتی اهمیت بسیار زیادی دارند. آشکارسازی عوامل زیستی به دلیل پیچیدگی‌های ماکرومولکول‌های حیاتی بسیار دشوار است. روش‌های تشخیص کنونی عوامل زیستی دارای معایب مختلفی هستند و برای تشخیص با اطمینان بالا به بیش از یک روش تشخیصی نیاز می‌باشد. کشورهای مختلف بر روی روش‌های تشخیص ژنومی متمرکز شده‌اند و همچنین به‌دنبال روش‌های تشخیصی جدیدی برای برطرف کردن چالش‌های موجود می‌باشند [۱]. کاربرد تجهیزات شناسایی عوامل زیستی برای اولین پاسخ‌دهنده‌های اضطراری بستگی به ویژگی‌های تجهیزات تشخیص، نوع آلودگی زیستی و هدف واحدهای پاسخ‌دهنده اضطراری دارد. نتایج تحلیلی خوب از آنالیزکننده‌های مختلف بستگی به کیفیت نمونه محیطی و نحوه انتقال عامل زیستی به آنالیزکننده دارد. در حال حاضر، سامانه تشخیص بیولوژیک برای کاربرد میدانی و اولین پاسخ‌دهنده‌ها در مراحل تحقیق و توسعه است. برخی از دستگاه‌های موجود در بازار دارای کاربرد محدودی هستند (فقط به تعداد کمی از عوامل پاسخ می‌دهند) و معمولاً هزینه‌های بالا دارند. از آنجایی که سامانه‌های تجاری تشخیص عوامل زیستی قابلیت محدودی برای تشخیص و شناسایی دارند و همچنین هزینه‌های بالایی دارند، توصیه می‌شود اولین پاسخ‌دهندگان هنگام خرید هر دستگاهی که ادعا می‌شود قادر به تشخیص عوامل بیولوژیک است، بسیار دقت نمایند. این وضعیت در مقایسه با تجهیزات تشخیص شیمیایی بسیار متفاوت است؛ فن‌آوری‌های مختلف برای تشخیص مواد شیمیایی و مواد صنعتی سمی وجود دارد که می‌تواند توسط اولین پاسخ‌دهندگان اورژانسی خریداری شود. دلیل فقدان تجهیزات تشخیص زیستی این است که تشخیص عوامل بیولوژیک نیاز به حساسیت بسیار بالایی دارند (به دلیل پایین بودن دوز مؤثر برای ایجاد عفونت و گسترش بیماری) و همچنین نیاز به درجه بالای گزینش پذیری دارند (به علت پس‌زمینه زیستی متنوع در محیط) [۲].

واکنش به یک حادثه بالقوه زیستی مستلزم داشتن برخی صلاحیت‌ها نظیر تجزیه و تحلیل حادثه، شناسایی روش‌های انتشار، شناسایی عوامل تهدیدکننده زیستی، برنامه‌ریزی پاسخ، اجرای واکنش برنامه‌ریزی‌شده، ارزیابی پیشرفت و پایان دادن به حادثه است. هنگام بررسی یک حادثه با پودر مشکوک، برای تعیین اینکه ماده حاوی مواد زیستی است به تحقیقات بیشتر و انواع مختلفی از دستگاه‌های جمع‌آوری نمونه، سنجش‌های قابل توسعه میدانی، تجزیه و تحلیل و سامانه‌های تشخیصی نیاز دارد. اولین پاسخ‌دهنده‌ها برای به‌کارگیری سامانه‌های تشخیص، چندین عامل مهم از جمله موارد ذیل، را در نظر می‌گیرند [۳ و ۴]:

- نوع اطلاعات به‌دست‌آمده، مفید بودن و صحت نتایج (عملکرد)
- سهولت استفاده در میدان
- کل هزینه انجام آزمایش (به‌عنوان مثال، سخت‌افزار، مواد مصرفی، و نیازهای آموزشی)
- مدت زمان نگهداری، نگهداری ابزار و ارتقاء
- زمان کل برای پاسخ دادن نتایج
- وزن و اندازه.

سرعت انتقال، تأثیرگذاری و خسارات گسترده عوامل بیولوژیک موجب شده تا به یکی از اصلی‌ترین تهدیدهای امنیتی تبدیل شود و تشخیص، شناسایی، پیشگیری و پدافند در این حوزه اهمیت و ضرورت زیادی بیابد. روش‌های زیادی جهت شناسایی و تعیین هویت عوامل بیولوژیک وجود دارد. اگر چه ادعا شده بسیاری از آن‌ها سریع، دقیق و قابل اعتماد می‌باشند، اما واقعیت این است که تعداد محدودی از آن‌ها به‌طور کاربردی برای تشخیص عوامل بیولوژیک استفاده شده اند. توسعه ابزار جدیدی که قادر به آنالیز مستقیم، حساس و سریع این عوامل در میدان باشند، می‌تواند جهشی در روش‌های تشخیص ایجاد نماید. در این راستا، فناوری‌های جدیدی طراحی و ساخته شده است که لازم است شناسایی شود.

در این مقاله، مهم‌ترین سامانه‌ها با کاربرد میدانی که بتوانند عوامل تهدید زیستی را تشخیص و گزارش اولیه به گروه‌های پاسخ‌دهنده اضطراری ارائه نمایند، بررسی شده است.

۲- روش تحقیق

این تحقیق از نظر هدف کاربردی و از نظر روش گردآوری داده‌ها توصیفی- تحلیلی است و گردآوری اطلاعات با استفاده از مطالعه و بررسی اسناد و مدارک علمی و پژوهشی، اسناد کتابخانه‌ای، صنایع دفاعی، شبکه اینترنت و تعدادی از منابع اطلاعاتی آشکار صورت گرفته است. در این تحقیق، سامانه‌های تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک موجود در جهان بر اساس شاخصه‌های کاربرد میدانی- عملیاتی بررسی گردید.

۳- سامانه‌های تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک با کاربرد میدانی

با توجه به اینکه روش‌های مرسوم و متداول برای تعیین هویت عوامل میکروبی، مستلزم زمان و سعی و تلاش فراوان و همچنین تعیین طیف محدودی از عوامل زیستی است، گرایش‌ها به سمت روش‌های مولکولی برای تعیین هویت عوامل زیستی بسیار افزایش یافته است. روش‌های مولکولی، روش‌های فراگیر و جهانی در امر شناسایی و تشخیص عوامل بیولوژیک می‌باشد. به‌عبارت دیگر اکثر عوامل میکروبی از طریق روش‌های مولکولی، قابل تشخیص، خصوصاً تشخیص سریع هستند. موارد متعددی در مهر و موم‌های اخیر، توسعه روش‌های مولکولی تشخیص را تحت تأثیر قرار داده است. از جمله این موارد:

- دسترسی و پیشرفت در ابزار جداسازی مولکول‌ها و تعیین هویت اجزاء جداشده
- کاربرد رایانه جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات
- پیشرفت‌های سریع و شگفت‌آور در فنّاوری اسید نوکلئیک
- پیشرفت‌های وسیع در جداسازی میکرو و ماکرومولکول‌ها

رشد میکروب‌ها درون محیط کشت و در شرایط in-vitro حکم سامانه تکثیر زیستی را دارد و از طریق کشت خالص میکروب، میلیون‌ها کلون از یک میکروارگانیسم تک به‌وجود می‌آید که برای آزمون‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با پیشرفت فنّاوری، به نظر می‌رسد که تکثیر و ازدیاد اسید نوکلئیک در لوله آزمایش، جای تکثیر میکروب درون محیط کشت را می‌گیرد. فنّاوری ازدیاد اسید نوکلئیک در لوله آزمایش علاوه بر سرعت و دقت تشخیص بیشتر و هزینه کمتر، نسبت به رشد باکتری در محیط کشت مزایایی دارد. از جمله اینکه برخی باکتری‌ها قابل کشت نیستند یا به سختی و زحمت رشد می‌کنند. همچنین برخی باکتری‌ها رشد کند و آهسته‌ای دارند و یا این‌که کار مستقیم با آن‌ها خطرناک است. شاید بتوان گفت که مهم‌ترین و بهترین سامانه‌ای که در آن مولکول هدف افزایش تعداد می‌یابد روش PCR است.

بر اساس آزمایش‌های مبتنی بر PCR، ارگانیسم‌های خاص بر اساس توالی DNA آن‌ها شناسایی می‌شوند. آزمایش‌های PCR بر روی نمونه‌های مایع انجام می‌شود و به یک کیت نمونه‌برداری (گاهی اوقات شامل) برای برداشتن یک پودر مشکوک و حل کردن یا معلق کردن پودر سفید در یک بافر سازگار نیاز است. بسیاری از فرآیندهای آزمایش PCR منجر به تولید نهایی محصول رنگی با برچسب رنگ‌شده می‌شوند که با اجزای نوری یکپارچه (معمولاً مبتنی بر فلورسانس) اندازه‌گیری می‌شوند. اکثر تست‌ها حاوی یک کنترل داخلی مثبت برای اطمینان از اینکه اجزای سامانه و کیت‌های واکنش‌دهنده به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند، می‌باشند. آزمایش‌های مبتنی بر PCR سودمند هستند، زیرا آن‌ها بسیار حساس و اختصاصی هستند (هر چند اختصاصیت یک سامانه وابسته به طراحی یک آزمایش خاص است). در تعداد بسیار کمی از سامانه‌های PCR مبتنی بر عملکرد میدانی، آماده‌سازی نمونه و تغلیظ DNA و حذف بازدارنده PCR یکپارچه شده است، با این حال، به‌دلیل اینکه PCR بسیار حساس است، نمونه پس از نمونه‌برداری می‌تواند به‌طور قابل توجهی رقیق شود تا اثر مهارکننده‌های بالقوه را در واکنش کاهش دهد. مهم‌ترین معایب روش‌های مبتنی بر PCR، زمان نسبتاً طولانی (معمولاً ۳۰ تا ۹۰ دقیقه) است و برای برخی سامانه‌ها هزینه‌های نسبتاً بالا است. بعضی از آزمایش‌های بیش از یک "هدف" (قطعه خاصی را در یک عامل بیولوژیک) تشخیص داده و تشخیص مثبت چندین هدف در یک نمونه می‌تواند تشخیص یک عامل تهدیدکننده حیات را قطعی کند[۶-۵].

۳-۱- سامانه تشخیص BioFire Defense, LLC: FilmArray®

سامانه FilmArray® یک پلتفرم تمام خودکار مبتنی بر PCR کاملا چند منظوره است. سامانه شامل چهار جزء است: جایگاه وارد کردن نمونه، کیسه واکنش، دستگاه / آشکارساز و لپ تاپ. پس از وارد کردن محلول هیدراتاسیون و نمونه، تمام مراحل آماده‌سازی، استخراج، تکثیر و تشخیص به‌صورت خودکار انجام می‌شود. این سامانه کاملا به‌صورت خودکار است و با استفاده از آرایه‌هایی به شکل فیلم نازک عمل می‌کند. قابلیت تشخیص انواع ویروس و باکتری را دارد. استفاده از آن آسان است و وزن اندکی دارد (شکل ۱).

شکل (۱): سامانه تشخیص FilmArray® بر پایه PCR و اجزاء جانبی

نمونه از طریق یک سری محفظه در داخل کیسه واکنش عبور می‌کند. در محفظه اول سلول‌ها / اسپورها با تحریک مکانیکی با دانه‌های سرامیکی در یک محلول لیزکننده، لیز

می‌شوند. مجموعه بعدی محفظه‌ها با استفاده از دانه‌های مغناطیسی، اسیدهای نوکلئیک را خالص و تکثیر می‌کند. در آخرین محفظه، RNA به cDNA رونویسی معکوس می‌شود و اولین مرحله تکثیر PCR چندتایی انجام می‌شود. نمونه سپس رقیق شده و به ۱۲۰ چاهک واکنش ۱ میکرولیتری مجزا تقسیم می‌شود، هر کدام شامل واکنش‌دهنده‌ها و یک جفت پرایمر خاص برای مرحله دوم PCR تکی است. علاوه بر این، هر یک شامل پروب فلورسنت است که به DNA دو رشته متصل می‌شود. برای مشخص نمودن عوامل تهدیدکننده حیات مثبت از روش تجزیه و تحلیل نقطه ذوب با وضوح بالا به‌وسیله نمایش خاموش‌سازی نور فلورسنت پروب متصل به DNA دو رشته استفاده می‌شود. منحنی ذوب به طول، ترکیب DNA و میزان مکمل بودن DNA دو رشته وابسته است. نرم‌افزار نتایج را از نمونه‌های تکثیر و چندین نمونه مشخص برای تعیین اینکه آیا یک نمونه مثبت یا منفی گزارش شده است، ادغام می‌کند.

دستگاه BioFire Defence دارای یک پنل عوامل زیستی است که به‌طور هم‌زمان یک نمونه را برای حضور ۲۷ هدف (۱۶ عامل) بررسی می‌کند [۷].

- عوامل زیستی قابل شناسایی با دستگاه:

۱. باسیلوس آنتراسیس
۲. کلستریدیوم بوتولینوم
۳. سویه‌های بروسلا
۴. بروخولدریا مالئی/ سودومالئی
۵. ویروس ابولا
۶. ویروس ماربورگ
۷. یرسینیا پستیس
۸. کوکسیلا بورنتی
۹. سویه‌های ویروس واریولا
۱۲. فرانسیس تولارنسیس
۱۳. ریکتزیا پرووازکی
۱۴. ویروس انسفالیت اسبی شرقی
۱۵. ویروس انسفابیت اسبی غربی
۱۶. ویروس انسفالیت اسبی ونزوئلایی

۲-۳- سامانه تشخیصی BioFire Defense, LLC: RAZOR® EX

دستگاه RAZOR® EX یک سامانه مبتنی بر PCR برای تشخیص عوامل بیماری‌زا در میدان است. سامانه RAZOR® EX در یک کیف حمل شانه‌ای بسته و سامانه کامل و نمونه ۱۱ پوند وزن دارد. این سامانه شامل یک بسته باتری قابل شارژ داخلی است که می‌تواند انرژی سامانه را برای هشت سنجش تأمین کند. این سامانه به‌طور گسترده در میدان مورد استفاده قرار گرفته است (نظیر ازمون‌های دما، رطوبت، ارتعاش و افتادن) و در حال حاضر توسط طیف گسترده ای از پاسخ‌دهندگان اول (به‌عنوان مثال، پلیس و ادارات آتش‌نشانی) استفاده می‌شود. به‌دلیل نوع طراحی و بسته‌بندی دستگاه RAZOR® EX در شرایط بحرانی دمایی و محیطی قادر به فعالیت است. از دیگر ویژگی‌های مهم این سامانه سبک بودن، استفاده آسان و منبع ذخیره انرژی مناسب آن است (شکل ۲) [۸-۹].

شکل (۲): سامانه تشخیص RAZOR® EX به همراه بافر، معرف‌ها و سرنگ

این سامانه PCR را بر روی یک نمونه خام از سواب محلول شده در بافر انجام می‌دهد. به‌طور معمول، یک نمونه به "کیسه واکنش‌دهنده" تزریق می‌شود که شامل تمام واکنشگرهای تست (به‌عنوان مثال، آغازگرها، پروب‌ها، آنزیم‌ها و بافرها) مورد نیاز برای واکنش PCR است. رقت نمونه برای کاهش اثرات مهارکننده‌های PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد و سامانه مبتنی بر شکستن حرارتی برای آزادسازی DNA از سلول‌ها و ویروس‌ها است. در آماده‌سازی محفظه برای اجرا، چند مرحله آماده‌سازی دستی شامل مهارت‌های دستی است. در داخل محفظه، نمونه در ۱۲ کانال برای ۱۲ آزمایش PCR مستقل تقسیم می‌شود. برای پانل ۱۰ تایی عوامل بیولوژیک، ۱۰ کانال برای شناسایی بیماریزا استفاده می‌شود و ۲ کانال باقی‌مانده برای واکنش‌های کنترل برای اندازه‌گیری اثر مهارکننده‌هایی که ممکن است در نمونه وجود داشته باشد استفاده می‌شود. اگر نمونه حاوی مهارکننده‌های PCR باشد، کاربر نمونه را رقیق کرده و آزمایش را دوباره اجرا می‌کند [۸-۹].

❖ عوامل زیستی قابل شناسایی با دستگاه:

۱. باسیلوس آنتراسیس
۲. سویه‌های بروسلا
۳. اشریشیا کولی O157:H7
۴. سویه‌های سالمونلا
۵. کلستریدیوم بوتولینوم
۶. یرسینیا پستیس
۷. کوکسیلا بورنتی
۸. ویروس واریولا
۹. فرانسیسلا تولرانسیس

۳-۳- سامانه تشخیصی Biomeme: one3™

دستگاه Biomeme one3TM یک پلت فرم مبتنی بر PCR قابل حمل برای انجام PCR در زمان واقعی (RT-PCR) و تجزیه و تحلیل مولکولی هم‌دما است. این پلت فرم شامل چهار جزء است: یک ترموسایکلر عملگر توسط آی فون، کیت آزمایش میدانی، نرم‌افزار تلفن همراه iOS و یک سامانه مدیریت داده مبتنی بر فضای ابری برای پشتیبانی، تجزیه و تحلیل و نمایش نتایج در زمان واقعی. نمونه‌ها در یک حجم کوچک از آب بدون نوکلئاز معلق، و به یک لوله آزمایشگاهی حاوی اجزای واکنشگر لیوفیلیز شده منتقل می‌شوند، مخلوط شده و سپس به سه چاهک همراه با دو کنترل منتقل می‌شوند شکل (۳).

شکل (۳): سامانه تشخیص Biomeme: one3™

اپراتور ۳ چاهک را در سامانه one3TM قرار می‌دهد، درب را بسته و آزمایش را از طریق برنامه iOS بر روی آی فون آغاز می‌کند. میانگین زمان آزمون بین ۴۰ تا ۱۲۰ دقیقه است. پس از تجزیه و تحلیل کامل، نتایج بر روی آی فون به‌عنوان یک آستانه چرخه (Ct)، که تعداد چرخه‌های مورد نیاز برای اندازه‌گیری سیگنال فلورسانس برای رسیدن به سطحی است که نشان می‌دهد تهدیدکننده حیات هدف وجود دارد. ارتقاء نرم‌افزاری آینده، تعیین عدم حضور / حضور عوامل تهدیدکننده حیات بر اساس مقادیر آستانه برنامه‌ریزی‌شده Ct را خودکار می‌کند. نتایج دقیق، از جمله منحنی تکثیر و داده‌های خام، می‌توانند از آیفون صادر شود. همه داده‌های آزمون با GPS برچسب و رمزگذاری شده است و می‌تواند به‌صورت ایمن از طریق Wi-Fi یا اتصال سلولی به یک وب پورتال برای نظارت از راه دور نتایج آزمون و تجزیه و تحلیل بیشتر در زمان واقعی مورد استفاده قرار گیرد. سامانه Biomeme قابل تنظیم با دیگر PCRها در زمان واقعی، RT-PCR و آزمایش‌های ایزوترمال است که ممکن است بر روی پلت فرم اجرا شوند [۱۰].

❖ عوامل زیستی قابل شناسایی با دستگاه:

۱. باسیلوس آنتراسیس
۲. کلستریدیوم بوتولینوم
۳. استافیلوکوکوس آرئوس
۴. یرسینیا پستیس
۵. سویه‌های بروسلا
۶. فرانسیسلا تولارنسیس
۷. کوکسیلا بورنتی
۸. ویروس انسفالیت اسبی ونزوئلایی
۹. ویروس واریولا
۱۰. ویروس ابولا
۱۱. کلستریدیوم پرفرنجنس
۱۲. بروخلدریا مالئی
۱۳. کلامیدوفیلا پسیتاسی
۱۴. ریکتزیا
۱۵. ویبریو کلرا
۱۶. کریپتوسپوریدیوم

۳-۴- سامانه تشخیصی GeneReach USA: POCKIT™ Nucleic Acid Analyzer

دستگاه POCKIT ™ یک پلت فرم مبتنی بر PCR است که می‌تواند تا هشت نمونه را به موازات (از جمله کنترل‌های جداگانه) اندازه‌گیری کند. مراحل پیپتینگ و سانتریفوژ قبل از تجزیه و تحلیل مورد نیاز است. دستگاه POCKIT ™ با استفاده از PCR همرفت (convection) (به‌عنوان مثال، لوله PCR گرم می‌شود تا یک گرادیان دما داشته باشیم و محلول به‌وسیله جریان همرفت در گرادیان حرکت کند، که منجر به چرخه دمایی نمونه می‌شود). نتایج به‌صورت یک مثبت / منفی ساده بر روی صفحه نمایش LCD نمایش داده می‌شود (شکل ۴) [۱۱].

شکل (۴): سامانه تشخیص POCKIT™ Nucleic Acid Analyzer و سانتریفوژ

داده‌های فلورسانس خام برای پس‌زمینه و نمونه نیز بر روی یک کارت حافظه SD ذخیره می‌شود و می‌تواند برای کمک به تفسیر نتایج مشکوک مشاهده شود. دو طول موج تشخیص استفاده می‌شود: ۵۲۰ یا ۵۵۰ نانومتر (یا هر دو). این وسیله نیاز به برق 100-240 V، ۵۰AC /۶۰ Hz دارد و با باتری‌های لیتیوم یا شارژر ماشین سازگار می‌باشد. تست‌ها شامل کنترل‌های مثبت داخلی نمی‌شوند، بنابراین، کاربر باید هرگونه کنترل را به‌عنوان نمونه‌های اضافی اجرا کند. بنابراین، سه لوله واکنش برای اجرای یک کنترل مثبت و یک لوله خالی به‌صورت موازی با هر نمونه لازم است [۱۲].

❖ عوامل زیستی قابل شناسایی با دستگاه:

۱. باسیلوس آنتراسیس
۲. سویه‌های بروسلا
۳. بروسلا آبرتوس
۴. بروسلا ملی‌تنسیس
۵. ویروس دانگ
۶. سندرم تنفسی آسیای میانه کروناویروسی
۷. ویروس تب دره ریفت

۳-۵- سامانه تشخیصی GeneReach USA: POCKIT™ Micro Nucleic Acid Analyzer

یک پلتفرم کوچک قابل حمل مبتنی بر PCR است که می‌تواند چهار نمونه را به‌صورت هم‌زمان اندازه‌گیری کند. پس از چند مرحله انتقال مایع، ویال نمونه در دستگاه قرار داده می‌شود و تجزیه و تحلیل در کمتر از ۳۰ دقیقه برای اهداف DNA تکمیل می‌شود. سامانه POCKIT™ Micro با استفاده از PCR همرفت (convection) (به‌عنوان مثال، لوله PCR گرم می‌شود تا یک گرادیان دما داشته باشیم و محلول به‌وسیله جریان همرفت در گرادیان حرکت کند، که منجر به چرخه دمایی نمونه می‌شود). این فرایند به بهینه‌سازی / برنامه‌ریزی چرخه حرارتی نیاز ندارد. نتایج به‌صورت یک مثبت / منفی ساده بر روی صفحه نمایش LCD نمایش داده می‌شود (شکل ۵).

شکل (۵): سامانه تشخیص GeneReach USA: POCKIT™ Micro Nucleic Acid Analyzer

پس از جمع‌آوری نمونه (مواد جمع‌آوری نمونه ارائه نشده)، نمونه محلول‌سازی‌شده و محلول با واکنشگرهای پرایمر / پروب PCR مخلوط شده و به یک لوله واکنش منتقل می‌شود. لوله واکنش به‌طور مختصر برای حذف حباب‌ها چرخانده می‌شود و برای اندازه‌گیری در دستگاه قرار می‌گیرد. این ابزار می‌تواند بین یک تا چهار نمونه به‌طور موازی تجزیه و تحلیل کند و می‌تواند با باتری برای حداقل پنج آزمایش زمانی که به‌طور کامل شارژ می‌شود کار کند. این وسیله از یک طول موج ۵۲۰ نانومتر تشخیص تک کانال استفاده می‌کند. تست‌ها شامل کنترل‌های مثبت داخلی نمی‌شوند، بنابراین، کاربر باید هرگونه کنترل را به‌عنوان نمونه‌های اضافی اجرا کند. تست‌ها شامل کنترل‌های مثبت داخلی نمی‌شوند، بنابراین، کاربر باید هرگونه کنترل را به‌عنوان نمونه‌های اضافی اجرا کند. بنابراین، سه لوله واکنش برای اجرای یک کنترل مثبت و یک لوله خالی به‌صورت موازی با هر نمونه لازم است [۱۲].

❖ عوامل زیستی قابل شناسایی با دستگاه:

۱. باسیلوس آنتراسیس
۲. سویه‌های بروسلا
۳. بروسلا آبرتوس
۴. بروسلا ملی‌تنسیس
۵. سویه‌های بروسلا

۳-۶- سامانه تشخیصی Tetracore, Inc.: T-COR 8™

دستگاه Tetracore T-COR 8 ™ یک وسیله PCR قابل حمل با باطری است. این سامانه می‌تواند به‌طور هم‌زمان هشت نمونه

مستقل را بررسی کند. سامانه قابل حمل است و به مدت ۴ ساعت با باتری کار می‌کند. قابلیت خوانش در لحظه و سامانه حرارتی برنامه پذیر دارد. قابلیت تشخیص چندگانه و قابلیت تشخیص بیماری‌های دام و طیور را دارد (شکل ۶) [۱۳].

شکل (۶): سامانه تشخیص Tetracore, Inc.: T-COR 8™

در حال حاضر، دستگاه از چهار موج (قابل گسترش تا ۶) قابل تشخیص استفاده می‌کند. هر کارتریج حاوی سه هدف تهدیدکننده زیستی و یک کنترل مثبت داخلی است. گسترش ابزار به شش کانال تشخیص پتانسیل را برای دو عامل اضافی تهدید زیستی برای هر کارتریج اضافه خواهد کرد. در حال حاضر کارتریج ۲-agent و ۳-agent وجود دارد. این ابزار از رابط صفحه لمسی استفاده می‌کند و دارای یک اسکنر بارکد است. منحنی تقویت PCR را می‌توان در زمان واقعی مشاهده کرد و داده‌ها بر روی یک کارت ذخیره‌سازی داده ذخیره می‌شود. عمر باتری سامانه تقریباً ۴ ساعت است. نمونه به یک محلول بافر اضافه می‌شود و مخلوط حاصل به کارتریج حاوی تمام واکنش‌دهنده‌های مورد نیاز برای واکنش تکثیر DNA اضافه می‌شود. نتایج به‌طور مستقیم بر روی صفحه نمایش قابل مشاهده است و ابزار "ابر" آماده است و می‌تواند داده‌ها را منتقل کند و از طریق یک شبکه بی‌سیم یا اینترنت از راه دور دسترسی پیدا کند[۱۴].

- عوامل زیستی قابل شناسایی با دستگاه:

۱. باسیلوس آنتراسیس
۲. ویروس واریولا
۳. کلستریدیوم بوتولینوم
۴. بروخلدریا
۵. استافیلوکوکوس ارئوس
۶. سویه‌های بروسلا
۷. یرسینیا پستیاسی
۸. فرانسیسلا تولارنسیس

۳-۷- سامانه تشخیصی Bio-Seeq PLUS

دستگاه Bio-Seeq PLUS یک ابزار دقت بالا قابل حمل است که مقدار کمی از عوامل بیولوژیک خاص را، از جمله باکتری و ویروس، از طریق تکثیر DNA، شناسایی می‌کند. از فنّاوری LATE PCR ™ برای بهبود تشخیص و شناسایی قابلیت اطمینان‌تر و ظرفیت بیشتر استفاده می‌شود. نرم‌افزار دستگاه برای کاربرانی که تجربه کمی از آزمایش‌های زیستی کمی دارند، طراحی شده است (شکل ۷).

شکل (۷): سامانه تشخیص Bio-Seeq PLUS

این دستگاه ساخت کشور انگلستان است و در سال ۲۰۱۳ به‌روزرسانی شده، قابل حمل بوده و به‌منظور استفاده نظامی طراحی و ساخته شده است. نمونه‌سازی برای دستگاه بسیار آسان است. این واحد شامل صفحه کلید با کلیدهای بزرگ است که اجازه می‌دهد واحد با دستکش‌های محافظ مورد استفاده قرار گیرد. سامانه Bio-Seeq PLUS برای استفاده به‌عنوان یک روش تأیید در آزمایش‌های میدانی در هنگام انجام مأموریت میدانی که مشکوک به عامل بیماری‌زا است، بسیار مهم است. سامانه Bio-Seeq PLUS با خدمات، آموزش و حمایت اولویت‌بندی شده برای اطمینان از عملکرد مطلوب محصول پشتیبانی می‌شود. سامانه The Bio-Seeq_ PLUS یک دستگاه ۶ کاناله است که قادر به برنامه‌ریزی دما و زمان چرخه هر کانال به‌طور مستقل است. روش LATE PCR در حدود ۶۰ دقیقه بسته به شرایط محیطی ایجاد می‌شود. باتری لیتیومی قابل شارژ می‌تواند تا ۱۰ ساعت با یک‌بار شارژ اجرا شود[۱۵].

سامانه Bio-Seeq PLUS شامل طراحی و بهبود عملکردهای زیر است:

• سامانه گرمایی جدید برای قابلیت اطمینان بیشتر و ثبات درجه حرارت
• صفحه کلید جدید برای قابلیت اطمینان بیشتر و سهولت استفاده
• در هنگام استفاده از باتری داخلی می‌تواند با استفاده از منبع تغذیه خارجی شارژ شود
• قدرت خارجی سازگار با ولتاژ اروپا و ایالات متحده

دستگاه Bio-Seeq PLUS از فنّاوری پیشرفته LATE PCR بهره می‌برد. این فنّاوری باعث کاهش نتایج مثبت کاذب و اطمینان کلی نتایج را بهبود می‌بخشد. آزمایش Bio-Seeq PLUS همچنین از واکنش تقویت‌کننده LATE PCR تشخیص Smiths استفاده می‌کند که به نام PrimeSafe ™ شناخته می‌شود که تقریباً جفت شدن اشتباه از بین می‌رود [۱۶].

۳-۸- جدول مقایسه سامانه‌ها

سامانه‌های تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک موجود در جهان بر اساس شاخصه‌های کاربرد میدانی- عملیاتی در جدول شماره ۱ مرور شده است. شاخصه‌های مورد نظر برای تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک شامل زمان آزمایش، نیاز به آماده‌سازی نمونه، نمایش نتایج به‌صورت خودکار، وزن، منبع انرژی، هزینه و مدت زمان نگهداری بررسی شده است.

جدول (۱): سامانه‌های تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک با کاربرد میدانی

شاخصه ها	Film Array	RAZOR® EX PCR	Biomeme one3™	POCKIT™ PCR	POCKIT™ Micro PCR	T-COR 8™ PCR	Bio-Seeq PLUS
زمان آزمایش	۶۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	تقریبا ۱ ساعت	۶۰ دقیقه	تقریبا ۳۰ دقیقه	۲۰-۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
نیاز به آماده‌سازی نمونه	کم	کم	کم	متوسط	متوسط	کم	کم
نمایش نتایج به‌صورت خودکار	بله	بله	خیر	بله	بله	بله	بله
وزن	۲۰ پوند	۱۱ پوند	۱ پوند	۴،۶ پوند	۸۴/ پوند	۱۰ پوند	
منبع انرژی	110V AC	باطری (۸ آزمایش)	باطری و آداپتور	110V AC	باطری قابل شارژ	باطری	باطری (۱۰ ساعت)
هزینه	$39,500 برای دستگاه $1110 برای ۶ کیت	$38,500 برای دستگاه $200 برای هر آزمایش	$4950 برای دستگاه $760 برای کیت آزمایش	$8,000 برای دستگاه $380 برای ۴۸ واکنش	$900 برای دستگاه $380 برای ۴۸ واکنش	$28,500 برای دستگاه $768 برای یک پک ازمایش	$45,000. برای دستگاه $32 برای هر نمونه
مدت زمان نگهداری کیت	۶ ماه پس از تاریخ تولید	۶ ماه پس از تاریخ تولید	۵ سال پس از تاریخ تولید	۲۴ ماه پس از تاریخ تولید	۲۴ ماه پس از تاریخ تولید	۱۲ ماه پس از تاریخ تولید	۱۲ ماه پس از تاریخ تولید

۴- نتیجه‌گیری

سامانه‌های تشخیص عوامل زیستی در جهان به‌صورت گسترده در حال پیشرفت و توسعه است، در حالی که فناوری‌های موجود در کشور و فناوری‌هایی که در این مقاله بررسی شده‌اند با سطح پیشرفت آن در دنیا فاصله دارد. پدافند زیستی مجموع‌هایی از اقدامات شامل رصد و پایش، آشکارسازی، هشداردهی، تشخیص، تصمیم‌گیری و کنترل، حفاظت و پیشگیری، امداد و نجات، درمان، بازیابی و بازتوانی منابع، محدودسازی و رفع آلودگی در برابر یک تهدید زیستی می‌باشد. در این بین، تشخیص سریع و دقیق عوامل بیولوژیک با کاربرد میدانی موضوع بسیار اهمیت و در عین حال دشوار است.

توسعه فناوری‌های بومی تشخیص عوامل زیستی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گام‌های ارتقای سطح امنیت ملی در اولویت قرار دارد. برای دستیابی به این هدف تقویت و حمایت از تحقیقات در حوزه تشخیص سریع عوامل زیستی، شناسایی و مهندسی معکوس فناوری‌های برتر دنیا، انتقال دانش فنی آن از خارج و ساخت سامانه‌های بومی تشخیص عوامل زیستی ضروری است. در حالت ایدئال، توسعه و تکمیل سامانه‌های بومی پایش مستمر

عوامل زیستی، سامانه‌های بومی تشخیص سریع و اختصاصی (تشخیص کمی و کیفی با دقت بالا) در کوتاه‌ترین زمان باید مورد توجه قرار گیرد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در میان انواع سامانه‌های تشخیصی عوامل زیستی، روش‌های تشخیص مولکولی با کاربرد میدانی- عملیاتی و با دقت و سرعت بالا در اولویت توسعه و دست‌یابی به فناوری‌های تشخیص تهدیدات زیستی می‌باشد.

۵- منابع

۱. مینایی، محمد ابراهیم، سعادتی، مجتبی، نجفی، مصطفی، هنری، حسین، نظریان، شهرام، نانوبیوسنسورها ابزاری برای تشخیص عوامل بیولوژیک در تهدیدات بیولوژیکی و بیوتروریستی، فصلنامه پدافند غیرعامل، شماره ۱۲، ص ۱۱، زمستان ۱۳۹۱.

۲. مینایی، محمد ابراهیم، حسین‌زاده، مهدی، باقری‌پور، محمدجواد، تأثیر پدافند غیرعامل در حوزه پدافند جنگ نوین NBC، فصلنامه پدافند غیرعامل، شماره ۷، ص ۳۷، ۱۳۹۰.

3. A. A. Fatah, "An Introduction to Biological Agent Detection Equipment for Emergency First Responders," National Institute of Justice, NIJ Guide 101−00, 2015.
4. B. D. Mariani, D. S. Martin, A. F. Chen, H. Yagi, S. S. Lin, and R. S. Taun, "PCR-Molecular diagnostic Technology for Monitoring Chronic Osteomyelitis," Journal of Experimental Orthopaedics, vol. 19, 2014.
5. R. M. Ozanich, R. A. Bartholomew, J. S. Arce, C. J. Bruckner-Lea, and H. C. Cardamone, "Biodetection Technologies for First Responders," 2015.
6. Y. Wang, Z. Wang, C. Liu, A.H. Yu, "PCR-based assays for the diagnosis of human Brucellosis, Annuals of Clinical Microbiology & Antomicrobials," 13:31, 2014.
7. D. R. Seiner, H. A. Colburn, C. Baird, R. A. Bartholomew, T. Straub, K. Victry, et al., "Evaluation of the FilmArray(R) system for detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis," Journal of applied microbiology, vol. 114, no. 4, pp. 992-1000, 2013.
8. U. K. Spaulding, C. J. Christensen, R. J. Crisp, M. B. Vaughn, R. C. Trauscht, J. R. Gardner, et al., "RAZOR EX anthrax air detection system," J. AOAC Int., vol. 95, no. 3, pp. 860-91, 2012.
9. T. Hadfield, V. Ryan, U. K. Spaulding, K. M. Clemens, I. M. Ota, and S. L. Brunelle, "RAZOR EX Anthrax Air Detection System for detection of Bacillus anthracis spores from aerosol collection samples: collaborative study," J. AOAC Int., vol. 96, no. 2, pp. 392-398, 2013.
10. Available from: https://biomeme.com/.
11. R. P. Wilkes, P.-YA. Lee, Y.-L. Tsai, C.-F. Tsai, H.-H. Chang, H.-FG. Chang, et al., "An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need, Journal of Virological Methods, vol. 220, pp. 8-35, 2015.
12. Available from: http://www.genereach.com.
13. S. D. Neeraja Venkateswaran, "Evaluation of A Rapid Portable Multiplex Molecular Test for Simultaneous Detection of Botulinum Neurotoxin a (BONT/A) and Botulinum Toxin B (BONT/B)," 2015.
14. Available from: https://www.tetracore.com.
15. R. M. Ozanich, H. A. Colburn, K. D. Victry, R. A. Bartholomew, J. S. Arce, A. Heredia-Langner, et al., "Evaluation of PCR Systems for Field Screening of Bacillus anthracis," Health security, vol. 15, no. 1, pp. 70-80, 2017.
16. Available from: https://www.smithsdetection.com/.

The study of Molecular Detection Systems of PCR-Based Biological Threats with Field Application

R. Bahmani*, M. E. Minaei

Abstract

Accurate and rapid diagnosis of biological threats has an important role in reducing vulnerability, sustaining essential activities, promoting national sustainability and facilitating crisis management in confronting these threats. Biological threats diagnostic systems will be effective in the Passive biological defense. Currently, in the field of rapid and accurate detection of biological agents, various systems have been designed and constructed which are descriptive-analytic and based on the functional characteristics, the most important ones have been introduced. By studying the approach of different countries, molecular diagnostic methods of biological agents due to high accuracy and speed have been considered and focused. The results of this research show that among various diagnostic systems of biological agents, molecular diagnostic methods with field application, with high accuracy and high speed, are prioritizing the development and acquisition of biological threat detection technologies that can play an effective role in the passive defense.

Key Words: *Molecular detection systems, Biological diagnosis, Biological threats, Passive defense*

* Imam Hossein Comprehensive University (mminaii@ihu.ac.ir) - Writer-in-Charge