NAISL
Volume 4, Number 1, 2020
Pages: 19-25
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X
Website: shaajournal.msrt.ir
Article type: Scientific extension
Date Received: 2019/12/4
Acceptance date: 2020/05/11
Online publishing: 2020/05/19

Limitations and outlook antibiotic concentration meassurment in field

Raheleh Majdani[1*], Mahsa Abdoljabbari[2]

Abstract

Increasing prevalence of antibiotic resistance was explained as a threatening factor of human healthcare recently. Continuous exposure of bacteria to sublethal concentrations of antibiotics in natural environments is an important promoter in antibiotic resistance but, the phenomenon of antibiotic pollutants are not tracked systematically in the world. Then international capacity to address antibiotic resistance rising was limited. Therefore, the development of new methods to measure environmental antibiotic concentrations is unavoidable. These methods, must be sensitive to sublethal concentrations of antibiotics and require minimal technical expertise. Furthermore, some important factors such as cost, biosafety, selectivity and the ability to multiplex must be evaluated in the context of field use. In this review current methods in antibiotic detection and their efficiency, adabtability and disadvantages for use on-site were evaluated. The methods were classified into microbiological assays, physical and chemical assays, immunoassays, aptasensors and whole-cell biosensors. Developing a dipstick or microfluidics based techniques with a bacterial promoter-based mechanism and colorimetric output was recommended. This methods would have the advantageous aspects of existing methods and also they could be easy to use and require minimal resources to field investigations.

Key Words:

antibiotic resistance, detection limits, environmental pollutants, on-site monitoring, dipstick sensor

(*) Corrosponding author
1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
E-mail: rahelehmajdani@yahoo.com
Tel: 09144009275
2. BSc student of microbial Biotechnology of University of Maragheh, Maragheh, Iran.
E-mail: mahsaabdoljabbary@yahoo.com
Tel: 09030453708

محدودیت ها و دور نمای روش های اندازه گیری غلظت آنتی بیوتیکی در محیط

راحله مجدانی[1*]، مهسا عبدالجباری[2]

نشریه رویکردهای نوین در آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال چهارم، شماره ۱، ۱۳۹۹
صفحات: ۲۵-۱۹
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸
وب‌سایت: shaajournal.msrt.ir
نوع مقاله: علمی -ترویجی
تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۰۹/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۲
نشر آنلاین: ۱۳۹۹/۰۲/۲۸

چکیده

شیوع فزاینده مقاومت آنتی بیوتیکی تهدیدی جدی برای سلامتی انسان است. قرار گرفتن مداوم باکتری‌ها در معرض غلظت‌های زیر کشنده[1] آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های طبیعی یک محرک مهم در روند مقاومت آنتی بیوتیکی است، اما در حال حاضر پدیده آلاینده‌های آنتی بیوتیکی در سطح جهانی و بطور منظم مورد ردیابی قرار نمی‌گیرد و به همین دلیل ظرفیت بین‌المللی در مورد بررسی افزایش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی محدود گردیده است. لذا تدوین روش‌هایی برای اندازه‌گیری غلظت آنتی بیوتیک در محیط (محل موردنظر جهت بررسی بقایای آنتی بیوتیکی) اجتناب ناپذیر می‌باشد. این روش‌ها باید به غلظت زیرکشنده آنتی بیوتیکی حساس بوده و به مهارت پایینی نیاز داشته باشند. علاوه بر این عوامل مهمی مانند هزینه، انتخابی بودن، امنیت زیستی و توانایی عملکردهای چندگانه باید در زمینه این روش‌ها مدنظر باشد. در این مطالعه یک بررسی کلی از روش‌های فعلی مورد استفاده جهت تشخیص آنتی بیوتیک‌ها ارائه شده و کارایی، امکان سازگاری و معایب آن‌ها جهت استفاده در محیط مورد ارزیابی قرار گرفته است. این روش‌ها به روش‌های میکروبیولوژیکی، سنجش‌های فیزیکی و شیمیایی، آزمون‌های بر پایه ایمنی، آپتاحسگرها و بیوحسگرهای کل سلولی طبقه بندی شده‌اند که شرایط هریک به طور مختصر آمده است. توسعه روش‌های بر پایه میکروفلوئیدها یا Diptick همراه با استفاده از مکانیسم‌های باکتریایی در کنار روش‌های کالری‌متری جهت سنجش پیشنهاد می‌شود که علاوه بر داشتن مزایای روش‌های موجود، از نظر استفاده آسان بوده و نیاز به منابع کمی جهت استفاده در مطالعات محیطی دارند.

راحله مجدانی مهسا عبدالجباری

واژگان کلیدی:

مقاومت آنتی بیوتیکی،
محدودیت‌های تشخیصی،
آلاینده‌های محیطی،
پایش محیطی،
حسگر میکروفلوئید

نویسندگان:
۱. گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.
ایمیل: rahelehmajdani@yahoo.com
تلفن: ۰۹۱۴۴۰۰۹۲۷۵
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.
ایمیل: mahsaabdoljabbary@yahoo.com
تلفن: ۰۹۰۳۰۴۵۳۷۰۸

[1] Sublethal

۱- مقدمه

مقاومت آنتی بیوتیکی به عنوان یک مشکل بین‌المللی تهدیدی مستقیم برای سلامت جهانی، کشاورزی و امنیت زیستی محسوب می‌شود. افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در میکروارگانیسم‌ها، به عنوان یک پدیده پیچیده و چند عاملی می‌باشد. یکی از منابع مهم در کسب مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، قرارگیری در معرض غلظت‌های پایین‌تر از غلظت کشنده آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های طبیعی مانند خاک و آب می‌باشد. وجود آنتی بیوتیک‌ها در غلظت‌هایی در حد نانوگرم بر میلی‌لیتر سبب گسترش مقاومت در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. با توجه به اثرات مضر وجود مقادیر پایین آنتی بیوتیک‌ها در خاک و آب، آنتی بیوتیک‌ها به عنوان یکی از آلاینده‌های مهم زیست محیطی مطرح می‌باشند. با این حال، مطالعه کافی در زمینه اثر آلاینده‌های آنتی بیوتیکی بر میکروارگانیسم‌های محیط زیست صورت نگرفته است و بصورت اختصاصی مدلی جهانی برای ردیابی و پیش بینی نحوه توزیع آلاینده‌های آنتی بیوتیکی و اثرات حاصل از آن‌ها وجود ندارد. در بسیاری از مطالعات مربوط به گسترش حضور آنتی بیوتیک‌ها، به دلیل هزینه‌های بالا و وقت گیر بودن پروسه انجام کار، امکان پایش و پیگیری گسترده سطوح آلودگی آنتی بیوتیکی وجود نداشته است. در حالی که پی بردن به اثرات زیست محیطی آنتی بیوتیک‌ها در سطح وسیع و گسترده می‌تواند در زمینه مبارزه با افزایش میزان مقاومت‌های آنتی بیوتیکی تاثیر بسزایی داشته باشد.

در دسترس بودن تکنیک‌های سریع و آسان، سبب تسهیل اندازه‌گیری میزان مقاومت در محیط می‌باشد، به این معنی که با آنالیز تعداد بیشتری از نمونه‌ها داده‌های بیشتری بدست خواهد آمد و در نتیجه سبب دستیابی به مدل‌های بهتری جهت پیش بینی حضور آلودگی آنتی بیوتیکی خواهد شد. اندازه‌گیری در محیط به محققان این امکان را می‌دهد که بتوانند سطوح آلاینده‌های آنتی بیوتیکی را در مناطق حاشیه‌ای بدون هزینه بیشتر بابت انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ارزیابی کنند. بر اساس نتایج مطالعات صورت گرفته میزان آلودگی‌های آنتی بیوتیکی در این مناطق با میزان گسترش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی مرتبط می‌باشند. تکنیک‌های خط اول برای تشخیص آلودگی‌های آنتی بیوتیکی در محیط مزایا و محدودیت‌هایی دارند که در این بررسی، روش‌های عمده قابل انجام در محیط مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. از جمله روش‌های مربوط، می‌توان به سنجش‌های میکروبیولوژیکی، سنجش‌های فیزیکی و شیمیایی، آزمون‌های ایمنی، آپتاسنسورها و بیوسنسورهای کل سلولی اشاره نمود. با بررسی این موارد پیشنهاداتی در زمینه توسعه یک آزمایش آسان در محیط جهت پایش غلظت‌های آنتی بیوتیکی ارائه شده است.

۲-روش‌ها:

۲-۱- آزمون‌های میکروبیولوژیکی

یک روش کلاسیک برای تشخیص وجود آنتی بیوتیک‌ها، استفاده از روش‌های میکروبیولوژیکی است که از گونه‌های حساس به آنتی بیوتیک باکتری‌ها استفاده می‌شود تا حضور آنتی بیوتیک‌های خاص در یک نمونه مشخص گردد. با توجه به اینکه آزمایشات میکروبیولوژیکی تغییرات بوجود آمده در الگوی رشد مشخص باکتری‌ها توسط آنتی بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند، روش‌های تجاری فعلی برای شناسایی حضور آنتی بیوتیک در یک نمونه به یکی از دو روش زیر استوار است. روش اول انتشار از دیسک نام دارد که در این روش از دیسک‌های آغشته به نمونه مورد نظر در پلیت‌هایی که باکتری‌ها روی آن کشت شده‌اند، استفاده می‌شود. وجود هاله شفاف در اطراف دیسک‌ها بیانگر از بین رفتن باکتری به وسیله این دیسک آنتی بیوتیکی می‌باشد. این آزمایش می‌تواند بسته به نوع باکتری مورد استفاده، آنتی بیوتیک اختصاصی یا گروه‌های آنتی بیوتیکی را شناسایی کند. این آزمایش برای استفاده در نمونه‌های شیر بین ۳۰ تا ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای با حد تشخیص (LOD)[۲] ارزیابی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام بهینه شده است. روش دیگر، استفاده از باکتری اختصاصی دارای حساسیت معین نسبت به آنتی بیوتیک‌ها است که بطور مهندسی شده می‌تواند با روش‌های رنگ سنجی عمل نماید. این واکنش‌های تغییر رنگ بصورت کمی می‌تواند به وسیله اسپکتروفتومتر برای تعیین غلظت آنتی بیوتیک در نمونه مورد آنالیز قرار گیرد و حساسیت آن یک نانوگرم بر میلی لیتر می‌باشد. این روش نیاز به تکنیک‌های استریل و تسهیلات آزمایشگاهی برای انکوباسیون همزمان نمونه و باکتری دارد. به عنوان یک روش استاندارد، آزمایش‌های میکروبیولوژیک بصورت تجاری برای تعیین سطوح فیزیولوژیک آنتی بیوتیک مربوطه برای نمونه‌های غذایی و آشامیدنی‌ها بخصوص شیر و نمونه‌های سرمی در دسترس می‌باشند. بسیاری از آزمایشات میکروبیولوژیکی بطور خاص روی تعیین میزان غلظت خانواده‌های آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام که در دامپزشکی بطور معمول مورد استفاده قرار می گیرند، تمرکز یافته و در خارج از این دسته حساسیت پایینی دارند. در یک مطالعه مشخص گردید که این روش می‌تواند غلظت‌های حدود ٤ نانوگرم بر میلی‌لیتر را در خانواده بتا لاکتام‌ها تشخیص دهد در حالی که در خانواده‌های دیگر آنتی بیوتیکی این میزان تشخیص داده شده به ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر یا بیش‌تر رسید.

[۲] Limit of detection

اندازه‌گیری غلظت آنتی بیوتیک بر شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی تاکید دارند.

به طور خلاصه، سنجش‌های میکروبیولوژیکی به طور معمول نیاز به تجهیزات قابل توجه و امکانات آزمایشگاهی استریل دارند و اغلب برای آنتی بیوتیک‌های خاصی بهینه شده‌اند و برای استفاده در محیط مناسب نیستند اما توسعه روش‌های میکروفلوئیدی و تکنیک‌های مبتنی بر کاغذ امکان استفاده از آن‌ها را در محیط افزایش داده است. ولی باتوجه به اینکه برای استفاده میدانی از روش‌های میکروبی مبتنی بر کاغذ، نیاز به باکتری‌های زنده یا لیوفیلیزه وجود دارد که بتواند بدون آلودگی در محل مجدداً احیا شود و نیز نیاز به قابلیت حمل، انکوباسیون و استریلیزاسیون دارند، آزمون‌های میکروبیولوژیکی در حال حاضر برای سنجش در محیط مناسب نیستند.

۲-۲- آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی

برخلاف آزمون‌های میکروبیولوژیکی که محدود به حساسیت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها هستند آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی خواص اختصاصی این مولکول مانند اندازه، بار، ویژگی‌های اتصال یا خاصیت واکنش دهندگی را برای شناسایی آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های متنوع مورد هدف قرار می‌دهند. خالص‌سازی فیزیکی مستلزم جداسازی آنتی بیوتیک از سایر ناخالصی‌های موجود در نمونه می‌باشد. تجزیه و تحلیل فراکسیون‌های نهایی برای خالص‌سازی آنتی بیوتیک‌ها با استفاده از اسپکتوفتومتری صورت می‌گیرد که LOD تقریبی با ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر دارد. نمونه‌های تهیه شده می تواند تحت آنالیزهای بیشتر با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری پیشرفته که حساسیت آن‌ها در حد ملکول باشد قرار گیرد. همچنین در اسپکتروفتومتری جرمی متوالی، نمونه‌ها برای یافتن ملکول مورد نظر، از جمله آنتی بیوتیک‌ها، با LOD زیر ۰/۱ نانوگرم بر میلی لیتر آنالیز می‌شوند. کروماتوگرافی مایع/ اسپکترومتری جرمی (LC/MS)[۳] جهت تعیین کمیت غلظت‌های آنتی بیوتیک در نمونه‌های سرمی، شیر، گوشت، خاک و آب بکار می‌رود. جهت انجام ۳ تکنیک‌های فیزیکی که با موفقیت در نمونه‌های محیطی بهینه شده است، نیازی به تجهیزات استریل نداشته و این روش‌ها ابزاری عالی برای تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی هستند. با این حال، هر دو روش خالص‌سازی و طیف‌سنجی به درجه قابل توجهی از تخصص کاربر و زیرساخت‌های مرتبط نیاز داشته و شامل فناوری‌های حساسی بوده که امکان انتقال آن‌ها با سهولت به محیط وجود ندارد..

این روش برای بررسی نمونه‌های مورد نظر در آزمایشگاه‌های مجهز، مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دیگری به نام SRES[۴] نیز به عنوان یک روش اسپکتروسکوپی، امکان تجزیه و تحلیل داده‌های طیف‌سنجی بدست آمده را میسر می‌کند. این تکنیک حساسیت بالا و قابلیت تشخیص سریع دارد و می‌تواند به آسانی با کار در محیط سازگاری یابد. SRES برای تعیین غلظت آنتی بیوتیکی در نمونه‌های آبی در زمان کم‌تر از ده دقیقه بکار می‌رود. روش SRES برای غنی‌سازی آنتی بیوتیک‌ها نسبت به سایر آلاینده‌ها یا املاح موجود در نمونه، به خالص‌سازی نمونه نیاز دارد و در نتیجه نیاز به دانش فنی بالا برای آزمایش در محیط را سبب می‌گردد که در این زمینه حذف روند آماده‌سازی نمونه و تجزیه و تحلیل اتوماتیک داده‌های بدست آمده می‌تواند SRES را برای استفاده در محیط مناسب کند.

بر اساس نتایج به دست آمده، آزمایشات شیمیایی مناسب برای کار در محیط، شامل رهیافت‌هایی بر اساس روش‌های کاغذی و میکروفلوئیدهای قابل حمل و نقل می‌باشد. یک سیستم میکروفلوئیدی طراحی شده در یک مطالعه امکان تعامل شیمیایی بین آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید و یون‌های مس با خروجی شیمیولومینسانت قابل اندازه‌گیری را فراهم نمود. این روش روی تراشه قابل حمل انجام شده و دارای LOD زیر ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. در حالی که این ویژگی‌ها برای استفاده در محیط امیدوارکننده هستند این روش به تخصص کاربر نیاز دارد تا بتواند به درستی نمونه را روی تراشه تزریق کند.

محلول‌های شیمیایی مبتنی بر کاغذ که در آن تغییرات شیمیایی سبب ایجاد تغییرات رنگی در پاسخ به حضور آنتی بیوتیک می‌شود نیز برای انجام در محیط مناسب بوده و نیاز به تخصص تکنیکی پایینی دارد. برخی دانشمندان نشان دادند که با افزودن یك لایه آمینی خاص به یک ماده کاغذی، می‌توان اکسی تتراسایکلین‌ها را در آب با LOD حدود ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر تشخیص داد. با این حال روش‌های مبتنی بر کاغذ در حال حاضر می‌توانند تنها تعداد کمی از ترکیب‌های مورد نظر را تشخیص دهند. تحقیقات بیش‌تر باید ظرفیت تکنیک‌های مبتنی بر کاغذ را برای شناسایی طیف گسترده‌تری از ترکیبات در یک آزمایش واحد افزایش دهند.

۲-۳- آزمون‌های بر پایه ایمنی

این آزمون‌ها بر اساس اختصاصیت واکنش‌های بین آنتی بادی‌ها و ملکول مورد نظر، موجب ایجاد یک روش اختصاصی و حساس جهت تشخیص آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های جامد فراوری شده یا مایعات شده‌اند. شاخص تشخیصی

[۳] Liquid Chromatography/Mass-Spectrometry

[۴] Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

در آزمون‌های ایمنی بطور عمده بر اساس رنگ سنجی استوار بوده اما برخی اوقات شاخص‌های فلورسانتی و شیمیولومینسانت بر اساس ملکول مورد نظر استفاده می‌شود. آزمون‌های ایمنی بخصوص ELISA برای تشخیص آنتی بیوتیک در نمونه‌های خاک، مواد غذایی و آب مورد استفاده قرار می‌گیرند. بعلاوه ELISAهای تجاری که برای نمونه‌های غذایی در دسترس می‌باشند، در مطالعات میدانی جهت بررسی فاضلاب رودخانه‌ها و نمونه‌های خاکی گرفته شده از پلات‌های تحت تیمار با کود استفاده شده‌اند. آزمون‌های ایمنی می‌توانند روشی حساس برای سنجش آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های ثانویه مورد استفاده برای تقویت سیگنال‌ها باشند که به طور معمول دارای LOD زیر ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشند. با این وجود، افزودن آنتی بادی‌های ثانویه سبب افزایش هزینه به ازای هر نمونه شده و این عمل می‌تواند به عنوان محدودیتی در ارائه ی الایزا به عنوان یک تکنیک ارزان و قابل انجام در محیط تعریف شود. یکی دیگر از چالش‌های استفاده از روش‌های ایمنی در محیط، متکی بودن این روش‌ها به اسپکتروفتومترها جهت تعیین کمی نتایج آزمون است. بعلاوه این روش‌ها، نیاز به یک سطح متوسط از مهارت تخصصی برای تکمیل روند کار در مورد جمع‌آوری داده‌ها دارند. استفاده از آنتی بادی‌ها بطور معمول سبب محدود شدن آزمون ایمنی به تشخیص یک یا تعداد کمی از آنتی بیوتیک‌ها بسته به آنتی بادی‌های مورد استفاده در آزمایش می‌شود. علاوه بر این واکنش متقابل آنتی بادی‌ها اختصاصیت آزمون را کاهش می‌دهد و نیز نتایج حاصل از واکنش‌های متقاطع در آزمون‌های ایمنی ممکن است سبب افزایش کاذب میزان آنتی بیوتیک ارزیابی شده گردد و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی موجود در یک محیط اکولوژیکی را تحت تاثیر قرار دهد. علیرغم این محدودیت‌ها، پتانسیل‌های خوبی برای توسعه آزمون‌های ایمنی آسان و قابل انجام در محیط در این زمینه وجود دارد که کارایی و توانایی تشخیص به وسیله آنتی بادی‌های مختلف در روی تراشه‌ها یا نوارهای اختصاصی را افزایش می‌دهد. به عنوان مثال در برخی از این روش‌ها امکان تشخیص حداکثر ۱۳ آنتی بیوتیک به طور هم زمان در نمونه‌های شیر فراهم شده و احتمال استفاده کم هزینه‌تر این آزمایشات در محیط در سال‌های آینده وجود دارد. در برخی روش‌های دیگر دو سیستم مختلف سوبسترای آنزیمی برای شناسایی همزمان ۱۳ آنتی بیوتیک فلوروکینولون و ۲۲ آنتی بیوتیک سولفانامیدی میسر شده است. علاوه بر این در برخی روش‌های جدیدتر امکان استفاده چند گانه از آزمون‌های ایمنی با راندمان و اختصاصیت بالا و پتانسیل استفاده مفید از آن‌ها را در خط اول تشخیص در شرایط محیطی نشان داده است.

۲-٤- حسگرهای آپتامری

یک تکنیک جدید برای تشخیص آنتی بیوتیک‌ها، استفاده از حسگرهای آپتامری (آپتاسنسور) می‌باشد. آپتامرها الیگونوکلئوتیدهای یا RNA هستند که می‌توانند با تمایل بالا به اهداف خاص متصل شوند. حسگرهای تولید شده برای تشخیص آنتی بیوتیک‌ها در سه دسته الکتریکی، فلورسانت و کالریمتریک قرار می‌گیرند. در آپتاحسگرهای الکتریکی معمولاً یک آپتامر را روی سطح الکترود یا یک نانوذره تثبیت می‌کنند بطوریکه با عرضه ملکول هدف سبب ایجاد تغییر فضایی در آپتامر می‌شود. این تغییر یک پروب را آزاد می‌کند یا الکترود را در معرض پروب ردوکس قرار می‌دهد. در یک مطالعه، یک آپتاسنسور الکتریکی مبتنی بر الکترود جهت سنجش فلوروکینولون‌ها طراحی گردید که در طی آن یک آپتامر اختصاصی هدف روی یک الکترود طلا تثبیت شد و در غیاب هدف، پروتئین‌های با قابلیت اتصال به تک رشته به آپتامرها متصل شده و دسترسی پروب ردوکس به سطح الکترود را مهار کردند. در حضور هدف، با اتصال اختصاصی آپتامر تمایل اتصال SSBها[5] کاهش یافته و سپس با افزایش دسترسی به پروب ردوکس سبب ایجاد قدرت تشخیصی با حساسیت ۰/۰۱۷۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر شد. حسگرهای الکتریکی دیگر از مواد مختلفی به عنوان الکترود استفاده می‌کنند از جمله آن‌ها می‌توان به DNA تک رشته‌ای برای متوقف کردن پروب ردوکس یا پروب‌های مختلفی مثل یون ها یا کوانتوم دات‌ها اشاره نمود اما کارایی و حساسیت آن‌ها تقریبا مشابه است. سایر آپتاحسگرهای الکتریکی از نانوذرات به عنوان پروب منفرد یا جهت تثبیت آپتامرها استفاده می‌کنند. چن و همکاران آپتاحسگری طراحی کردند که در آن آپتامرهای اختصاصی برای کانامایسین و کلرامفنیکل بر روی دانه‌های مغناطیسی تغییر یافته با گروه آمینی تثبیت شده و کاملاً به یک پروب‌های سیگنال DNA با یک چارچوب آلی فلزی نانو (NMOF)[6] که حامل یک یون اختصاصی بود متصل گردید. زمانی که بخش هدف در معرض قرار می‌گیرد به آپتامر وصل شده و پروب سیگنالی آزاد شده و باعث ایجاد جریان قابل تشخیصی از یون ها در NMOF می‌شود.

آپتاحسگرهای فلورسنت و کالرمتریک از مکانیسم‌های متنوعی استفاده می‌کنند. در معرض قرارگیری هدف باعث ایجاد تغییر فضایی شده که می‌تواند سطح نانو ذرات را در معرض یک ماده تغییر دهنده رنگ قرار دهد. برخی از آپتاحسگرهای فلورسنت و کالریمتریک از ایجاد ساختارهای سنجاق سری استفاده می‌کنند که ساختارهای چهارتایی را در حضور هدف یا یک اگزونوکلئاز تشکیل داده و سبب تقویت یک سیگنال می‌شود. آپتاحسگرها همچنین ممکن است لوپ‌های سنجاق سری را

[5] Single-stranded binding

[6] Nanoscale metal organic framework

تشکیل دهد که با استفاده از qRT-PCR[۷] یا الکتروفورز میکروچیپ قابل تشخیص می‌باشد. در این میان آپتاحسگرهای بر پایه کاغذ به منظور سهولت در حمل و نقل طراحی شدند. از جمله آن‌ها می‌توان به یک دستگاه میکروفیلوئیدی کاغذی مبتنی بر آپتامرهای ssDNA[۸] برای تشخیص آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید، با حساسیت حدود ۳۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اشاره نمود.

آپتاحسگرها بسیار حساس بوده و دارای LOD در محدوده میکروگرم تا نانوگرم بر لیتر هستند. آپتاسنسورهای بسیار حساس، الکتریکی بوده و LOD برابر با ۱/۷۰ تا ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر دارند که برای تشخیص کمی آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط ایده‌آل می‌باشد. بعلاوه سنجش به وسیله آپتاحسگرها پروسه نسبتاً کوتاهی داشته که معمولا از ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت به طول می‌انجامد. آپتاسنسورها قادر به آزمایش غلظت آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های سرمی، شیر و آبی می‌باشند. محدودیت قابل توجه در استفاده از آپتاحسگرها در محیط عدم قدرت شناسایی دسته‌های چندگانه آنتی‌بیوتیک به طور همزمان می‌باشد. در حالی که آپتاحسگرهای چندگانه می‌توانند تشخیص تا دو آنتی بیوتیک را بصورت همزمان انجام دهند. در سال ۲۰۱۶، هائو و همکارانش یک سیستم آپتامر بر اساس cDNA[۹] با بازده شیمیولومینسانت را برای شناسایی همزمان اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین و کانامایسین با حساسیت ۰/۰۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر در نمونه‌های شیر طراحی کردند که این روش دارای حساسیت بالایی بوده اما به دلیل نیاز به وسیله تشخیصی خاص جهت سنجش شیمیولومینسانس حاصل این روش، جهت استفاده در محیط دارای محدودیت‌هایی بود. در حالت کلی، هرچند که استفاده از آپتاحسگرها، یک روش تشخیص بسیار حساس، نسبتاً سریع و قوی می‌باشد، محدودیت‌های قابل توجهی در توانایی برای آزمون طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها بصورت همزمان دارند. در نتیجه آپتاحسگرها می‌توانند به عنوان یک روش تشخیص ثانویه مناسب برای تأیید نتایج بدست آمده با استفاده از روش‌های دیگر مطرح باشند. به هر حال توسعه آپتاحسگرهای بدون نیاز به نشانگرهای خاص و کاهش میزان مهارت مورد نیاز جهت استفاده از آن‌ها در محیط اهمیت بالایی دارد.

۲-۵- حسگرهای زیستی کل سلولی

در یک روش دیگر جهت تشخیص آنتی بیوتیک‌ها از یک رهیافت بیولوژی سنتزی برای مهار سیستم درونی سلول‌های باکتریایی جهت جهت تعیین غلظت‌های منطقه‌ای آنتی بیوتیک‌ها استفاده شده است. در این روش سلول‌های باکتریایی می‌توانند از نظر ژنتیکی جهت ایجاد پاسخ مشخص به غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک‌ها مهندسی شوند. این عمل با وارد کردن سازه‌های پلاسمید مهندسی شده حاوی توالی AND حساس به آنتی بیوتیک‌ها در ارگانیسم‌های باکتریایی میزبان انجام می‌شود. این محصول به عنوان یک بیوحسگر کل سلولی شناخته شده است. ساخت بیوحسگرهای باکتریایی کل سلولی برای تشخیص آنتی بیوتیک‌ها مفهوم جدیدی نیست. در سال ۱۹۹۸، کورپلا[۱۰] و همکارانش با استفاده از یک سویه تغییر یافته ژنتیکی باکتری اشرشیا کلی[۱۱] یک بیوحسگر طراحی کردند که به تتراسایکلین از طریق روند بیولومینسانس پاسخ داد. از آن زمان، ده‌ها تکرار از طرح‌های مشابه آزمایش شده و معرفی شده‌اند. انتخاب پروموتر شاید حیاتی‌ترین جنبه طراحی بیوحسگر باشد زیرا این انتخاب ویژگی و همچنین حساسیت حسگر را تعیین می‌کند. بسیاری از این پروموترها در مجموعه‌ای از گونه‌های باکتریایی به خوبی شناخته شده‌اند که سبب ایجاد اهدف با پتانسیل بالا برای بیوحسگرها و میزبان‌های باکتریایی آن‌ها می‌باشند. حسگرهای باکتریایی کل سلولی چندین مزیت نسبت به سایر تکنیک‌های تشخیصی دارند. باکتری‌ها به منابع کم‌تر و با قیمت پایین‌تر جهت زنده ماندن نیاز داشته و همانندسازی سریع آن‌ها سبب دسترسی آسان به آزمون‌های با راندمان بالا می‌شود. علاوه بر این، حسگرهای باکتریایی اطلاعاتی را در مورد ارزش زیستی سوبستراهای مربوط به پایش مقاومت باکتریایی ارائه می‌دهند که یک روش سنجش مناسب‌تر نسبت به سنجش مستقیم غلظت‌های مواد مختلف در نمونه‌های آبی و خاکی محسوب می‌گردد.

۲-۶- خصوصیات و قابلیت انواع حسگرهای زیستی:

حسگرهای زیستی در نمونه‌های سرمی، آب، شیر و گوشت و همچنین در مطالعات میدانی برای تشخیص آنتی بیوتیک‌ها به کار گرفته شده است. هرچند اکثر تکنیک‌های بیوحسگری سنتی برای تشخیص آنتی بیوتیک‌ها متکی به استفاده از فلورسنت و یا بیولومینسانس به عنوان یک شاخص برای تعیین غلظت آنتی بیوتیکی در محیط هستند، با این حال، آستانه تشخیص فلورسنت در بیوحسگرها به عنوان یک چالش همچنان باقی مانده است. از طرفی به دلیل سختی سنجش فلورسانس و بیولومینسانس در محیط، بیوحسگرها با روش‌های کالریمتریک همراه شده که نتایج حاصل می‌توانند بصورت کیفی با چشم غیر مسلح یا بصورت کمی با یک دوربین دیجیتالی و با نرم‌افزارهای آنلاین تصویری مورد ارزیابی قرار گیرند. با وجود موارد فوق، هنوز محدودیت‌های خاصی در موارد سنجش کمی وجود دارد که جهت استفاده کاربردی در محیط نیاز به در

[۷] Quantitative Reverse Transcription PCR
[۸] Single strand DNA
[۹] Complementary DNA
[۱۰] Korpela
[۱۱] Escherichia coli

خارج از آزمایشگاه است. از آن‌جا که این حسگرهای زیستی متکی به باکتری‌های سالم هستند لذا عملکرد بسیاری از حسگرهای موجود در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بهینه بوده و بنابراین نیاز به دستگاه انکوباتور دارد. در این میان تحولات اخیر در تثبیت سلولی و تولید ابزار مینیاتوری، چشم‌اندازهای لازم برای ذخیره سلول‌های زنده را بهبود بخشیده است. لیوفیلیزاسیون (فریزدرایینگ) تأثیر ناچیزی در عملکرد بیوحسگرهای باکتریایی داشته و این روش با موفقیت در یک محیط غیر آزمایشگاهی برای تشخیص تتراسایکلین‌ها آزمایش شده است. یکی دیگر از این روش‌ها طراحی یک «اسپوحسگر» با استفاده آسان می‌باشد که شامل استفاده از اسپورهای باکتریایی تثبیت شده حاصل از باسیلوس سوبتلیس مهندسی شده ژنتیکی می‌باشد که به عنوان بیوحسگر کل سلولی عمل می‌کند. روش اخیر در مورد باسیتراسین با LOD در حدود ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آزمایش شده است ولی امکان تغییر طراحی آن جهت استفاده آسان‌تر نیز وجود دارد بتواند به عنوان یک مدل عملی جهت کارهای آینده ارائه گردد.

حساسیت حسگرهای زیستی کل سلولی به دلیل محدودیت در حساسیت تشخیص خروجی بیوحسگر مانع چالش برانگیزی است. در این میان حسگرهای کالریمتریک به عنوان وسیله قابل قبول برای رهیافت‌های کیفی مطرح می‌باشند اما استفاده از آن‌ها برای تجزیه و تحلیل‌های کمی با جزئیات بیشتر مناسب نیست.

زمینه مهندسی زیستی، جایگزین قدرتمندی را ارائه می‌دهد که شامل طراحی بیوچیپ‌ها یا «آزمایش بر روی یک تراشه» می‌باشد که بیولومینسانت حاصل از بیوحسگرهای کل سلولی را با فتومالتیپلرهای مینیاتوری و دکتورهای همراه با بار الکتریکی در جهت تقویت و تغییر سیگنال حاصل ادغام کرده و با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین تجزیه و تحلیل می‌کند. موفقیت‌های بدست آمده پیشنهاد می‌کند که این روش می‌تواند برای تشخیص آنتی بیوتیک‌ها با استفاده از سویه‌های باکتریایی مهندسی شده مورد استفاده قرار گیرد.

در حالی که تراشه‌های زیستی در حال بهبود سریع در اندازه و قابلیت استفاده هستند، مقرون به صرفه‌ترین روش برای کار در محیط روش‌های مبتنی بر کاغذ است. رنگ‌سنجی بیوسنسورهای مبتنی بر کاغذ کل سلولی از جمله «اسپووحسگر»ها، طراحی خلاقانه و کارایی و قابلیت استفاده نوید بخشی را نشان داده‌اند اما از آن‌جا که از سلول‌های زنده باکتری استفاده می‌کنند، بهینه عملکرد شان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است. در این مورد به عنوان یک گزینه جایگزین، سیستم‌های عاری از سلول می‌تواند مورد استفاده قرار گیرند که در واقع همان ماشین‌های سلولی را به عنوان یک بیوحسگر تیپیک قرار گرفته روی زمینه کاغذی، مورد استفاده قرار می‌دهند. با اصلاح حساسیت این روش که امروزه در رنج ۵۰۰-۶۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر است، این سیستم مبتنی بر کاغذ پتانسیل خوبی را برای استفاده در محیط خواهد داشت.

۳- نتیجه‌گیری

تمام تکنیک‌های شرح داده شده روش‌های قابل قبول و حساسی جهت انجام در محل‌های مورد نظر بودند. این بررسی با هدف تمرکز روی شناسایی مزایا و معایب هر روش برای استفاده با راندمان بالا برای نمونه‌های مورد استفاده در محیط صورت گرفت. برای اینکه تکنیک تشخیص غلظت‌های آنتی بیوتیک برای استفاده در محیط عملی باشد باید حساس بوده و نیازمند حداقل آموزش یا تجهیزات بوده و ضمن امکان استفاده آسان قابلیت تشخیص چندین نوع آنتی بیوتیک را در نمونه‌های مختلف داشته باشد. علاوه بر این باید مقرون به صرفه، نسبتاً سریع و قابل انجام در شرایط متنوع محیطی باشد. یک بیوحسگر براساس مکانیسم پروموتور باکتریایی مهندسی شده Diptick در یک شکل میکروفلوئیدی، بسیاری از این مشکلات را رفع نموده و مدل مطلوبی را برای توسعه آینده تکنیک‌های قابل انجام در محیط ارائه می‌دهد. با این حال، قبل از اجرای این تکنیک در محیط، انجام آزمایشات بیشتر ضروری است.

٤- مراجع

[[1]. Parthasarathy, R., Monette, C. E., Bracero, S. & Saha, M. S. (2018). Methods for field measurement of antibiotic concentrations: limitations and outlook, FEMS Microbiology Ecology, 94, 1-10.