



Pobieranie i identyfikacja próbek biologicznych z wykorzystaniem stosowanych w wojsku urządzeń do wykrywania on-site skażeń biologicznych

MONIKA KULIGOWSKA, SŁAWOMIR NEFFE

Wojskowa Akademia Techniczna, Wydział Nowych Technologii i Chemii, Instytut Chemii,
Zakład Radiometrii i Monitoringu Skażeń, ul. gen. S. Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa,
monika.kuligowska@wat.edu.pl

Streszczenie. Ze względu na wciąż aktualne zagrożenia biologiczne związane z działalnością ugrupowań terrorystycznych, sytuacjami kryzysowymi w wielu rejonach świata, a także cyklicznie pojawiającymi się epidemiami, szybka i wiarygodna detekcja skażeń biologicznych jest niezbędnym elementem zapewnienia szeroko rozumianego bezpieczeństwa ludności. W pracy poruszono kwestie procedur pobierania i weryfikacji próbek. Skupiono się na technikach przygotowania próbek do analizy, a także wyszczególniono metody analityczne służące do identyfikacji czynników biologicznych. Dodatkowo omówiono technologie on-site zaimplementowane w wojskowych przyrządach do detekcji skażeń biologicznych. Praca umożliwia czytelnikowi zapoznanie się z nowoczesnymi technikami detekcji czynników pochodzenia biologicznego i ich identyfikacji, co stanowi niezbędną wiedzę przy wyborze odpowiedniego sprzętu w zależności od przeznaczenia pododdziału rozpoznania skażeń i postawionego zadania. Wiedza z zakresu pobierania i przygotowania próbek do analizy przyczyni się do zwiększenia umiejętności zespołów pobierania próbek w zakresie takich działań oraz do osiągnięcia wiarygodnych wyników przez zastosowanie odpowiednich procedur i wyeliminowanie możliwości utraty analitu czy nieumyślnego skażenia próbki. Pozwoli to również na zwiększenie bezpieczeństwa na każdym etapie pracy z próbkami biologicznymi. Wszystkie te działania mogą przyczynić się do globalnego zwiększenia bezpieczeństwa ludności.

Słowa kluczowe: nauki chemiczne, broń biologiczna, bioterroryzm, CBRN, PCR, UV-LIF

DOI: 10.5604/01.3001.0016.0545

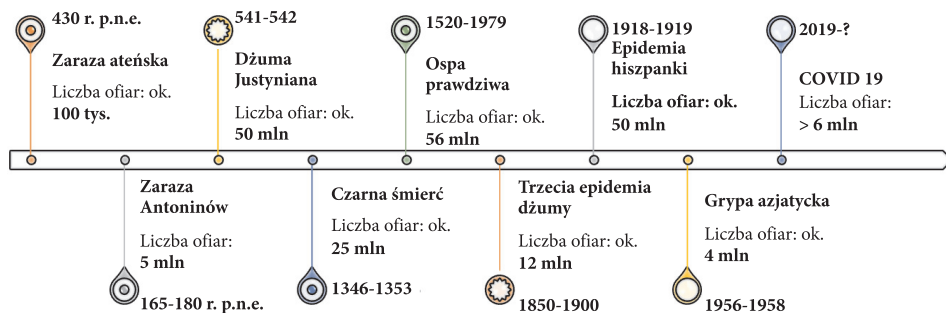
Wykaz stosowanych akronimów

ACPLA	— <i>Agent Containing Particle per Liter of Air</i>	— Stężenie cząstek na litr powietrza
ADP	— <i>Adenosine 5'-diphosphate</i>	— Adenozyno-5'-difosforan
ATP	— <i>Adenosine 5'-triphosphate</i>	— Adenozyno-5'-trifosforan; główny nośnik energii w komórkach
BWC	— <i>Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction, Biological Weapons Convention</i>	— Konwencja o zakazie prowadzenia badań, produkcji i gromadzenia zapasów broni bakteriologicznej (biologicznej) i toksycznej oraz o ich zniszczeniu, Konwencja o Zakazie Broni Biologicznej
CBRN	— <i>Chemical, Biological, Radiological, Nuclear</i>	— Broń masowego rażenia – chemiczna, biologiczna, radiologiczna, jądrowa
CF	— <i>Complement Fixation</i>	— Wiązanie dopełniacza
CLISA	— <i>Chemiluminescence Immunosorbent Assay</i>	— Immunosorpcyjny test chemiluminescencyjny
CWA (BST)	— <i>Chemical Warfare Agents</i>	— Bojowe środki trujące
ELFA	— <i>Enzyme-linked Fluorescent Assay</i>	— Enzymatyczny test fluorescencyjny
ELISA	— <i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>	— Test immunoenzymatyczny
ESI	— <i>Electrospray Ionization</i>	— Jonizacja przez elektrorozpylanie
HAI	— <i>Haemagglutination and Haemagglutination Inhibition</i>	— Hemaglutynacja i hamowanie (inhibicja) hemaglutynacji
HPLC	— <i>High Performance Liquid Chromatography</i>	— Wysokosprawna chromatografia cieczowa
IAHA	— <i>Immune Adherence Haemagglutination Assay</i>	— Test hemaglutynacji przylegania immunologicznego
IF	— <i>Immunofluorescence</i>	— Immunofluorescencja
KIA	— <i>Kligler's iron agar reaction</i>	— Reakcja agaru żelazowego Kliglera
LAPS	— <i>Light Addressable Potentiometric Sensor</i>	— Czujnik potencjometryczny adresowalny światłem
LCD	— <i>Liquid-Crystal Display</i>	— Wyświetlacz ciekłokrystaliczny
LIF	— <i>Laser Induced Fluorescence</i>	— Fluorescencja wzbudzana promieniowaniem laserowym
MIF	— <i>Microimmunofluorescence tests</i>	— Testy mikroimmunofluorescencyjne
MS	— <i>Mass Spectrometry</i>	— Spektrometria mas

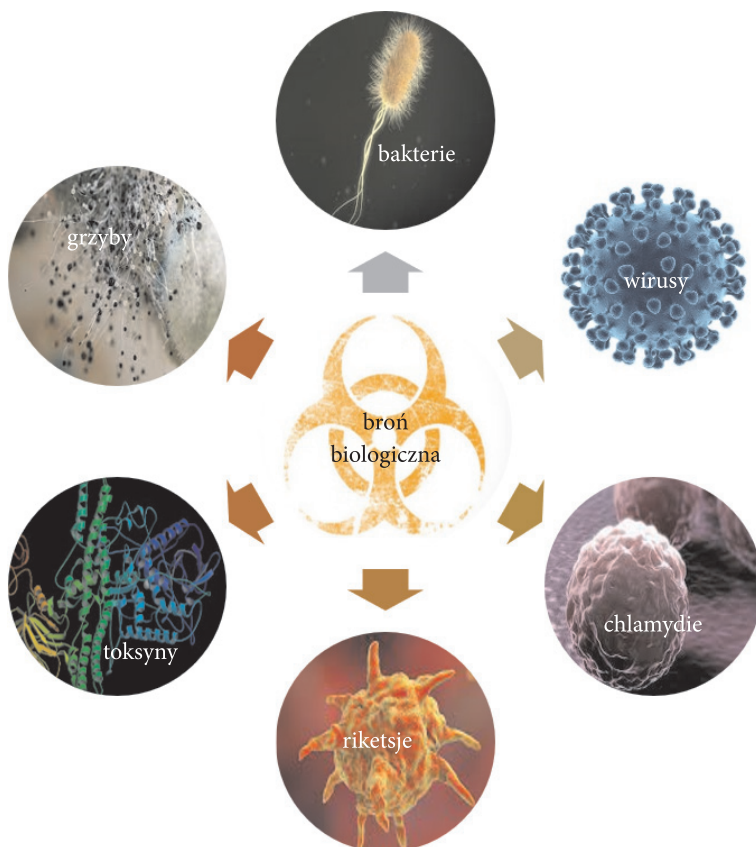
PCR	— <i>Polymerase Chain Reaction</i>	— Łańcuchowa reakcja polimerazy
ppl	— <i>parts per liter</i>	— Części na litr
ppb	— <i>parts per billion</i>	— Części na miliard
RAAD	— <i>Rapid Agent Aerosol Detector</i>	— Szybki detektor środków w aerozolu
RBIA	— <i>Real Time Bio specific Interaction Analysis</i>	— Analiza interakcji biospecyficznych w czasie rzeczywistym
RDTs	— <i>Rapid Diagnostic Tests</i>	— Szybkie testy diagnostyczne
RIA	— <i>Radioimmunoassay</i>	— Test radioimmunologiczny
RPLA	— <i>Reverse-passive Latex Agglutination</i>	— Odwrócona pasywna aglutynacja lateksu
rt-PCR	— <i>real-time Polymerase Chain Reaction</i>	— Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym
RT-PCR	— <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>	— Łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkryptazą
SIBCRA	— <i>Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents</i>	— Pobieranie próbek i identyfikacja środków biologicznych, chemicznych i radiologicznych
TSIA	— <i>Triple Sugar Iron Agar Reaction</i>	— Reakcja potrójnego agaru z żelazem cukrowym
TSP	— <i>Toxic Industrial Chemicals</i>	— Toksyczne środki przemysłowe
UV	— <i>Ultraviolet</i>	— Nadfiolet

1. Wprowadzenie

Zagrożenia biologiczne pojawiały się od wieków. Przykładowe epidemie wraz z latami ich występowania oraz szacunkowymi liczbami ofiar śmiertelnych przedstawiono na rysunku 1. Na podstawie danych historycznych można wnioskować, że epidemie pochłaniające tysiące, a nawet miliony ofiar będą pojawiać się również w przyszłości. Niezwykle istotnym elementem, który może ograniczyć zachorowalność, a przez to także liczbę przypadków śmiertelnych ludzi, jest wczesne i precyzyjne wykrywanie zagrożeń biologicznych, jak również przemyślane procedury przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się skażenia i odpowiednie zabezpieczenie logistyczne przez państwa i organizacje międzynarodowe. Wykrywanie naturalnie pojawiających się zakażeń pozwala również na wykrycie skażeń celowych, będących efektem uwolnienia broni biologicznej. Czynniki biologiczne tego rodzaju broni przedstawiono schematycznie na rysunku 2. Wraz ze środkami ich przenoszenia stanowią one wyjątkowo niebezpieczny komponent broni masowego rażenia.



Rys. 1. Oś czasu przedstawiająca największe epidemie pojawiające się na świecie wraz z przybliżonymi liczbami zgonów, które spowodowały. Źródło: opracowanie własne na podstawie [1, 2].

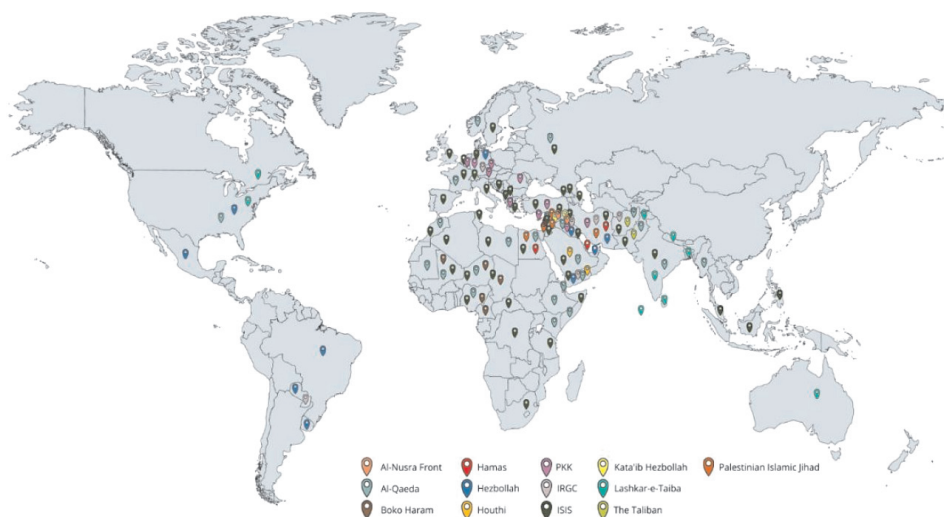


Rys. 2. Komponenty broni biologicznej. Opracowanie własne. Źródła zdjęć: www.istockphoto.com; <https://www.poradnikzdrowie.pl>; <https://pl.wikipedia.org>; <http://geografia.sp130.edu.pl> [dostęp: 14.06.2022]

Ze względu na swoje właściwości broń biologiczna jest stosunkowo prosta w produkcji, skuteczna, łatwa do ukrycia i niewidoczna w trakcie ataku, tania i wciąż trudna do wykrycia. Problemy z detekcją nie wynikają jednak z powodu nieefektywnych czy niedostępnych technologii, ale bagatelizowania problemu przez znaczną część państw świata, czego konsekwencją jest niedostateczne zabezpieczenie instytucji rządowych i jednostek wojskowych w odpowiedni sprzęt do detekcji skażeń biologicznych. Ta sytuacja sprzyja rozwojowi bioterroryzmu, który określa się jako bezprawne użycie czynników biologicznych wobec ludzi i zwierząt, co ma na celu zakłócenie stabilności społecznej i politycznej danego państwa, wywołanie paniki i wymuszenie określonego działania [3, 4]. Broń biologiczna była stosowana od wieków. Jedną z najbardziej znanych instytucji, w której prowadzono prace nad bronią tego rodzaju, była japońska Jednostka 731 działająca w Pingfang w Mandżurii. Szacuje się, że w latach 1932-1936 przeprowadziła tysiące badań z użyciem m.in. pałeczek dżumy (*Yersinia pestis*) i tyfusu plamistego (*Typhus exanthematicus*), przecinkowców cholery (*Vibrio cholerae*) i laseczek wąglika (*Bacillus anthracis*), doprowadzając do śmierci nawet 20 000 osób [5]. W miarę rozwoju wiedzy w tym zakresie i sposobów izolacji patogenów broń biologiczna stała się rzadziej wykorzystywana niż np. broń chemiczna [6, 7, 8]. Jedną z przyczyn mógł być strach przed zakażeniem sił własnych zgodnie z powiedzeniem „(...) jeżeli wypuścisz tego tygrysa, powróci on i ciebie też pożre” [4], a także świadomość, że nie można przewidzieć skali rozprzestrzenienia się zakażeń. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że poglądy i idee niektórych ugrupowań są tak skrajne, że ich przedstawiciele mogą nie zważać na te obawy i użyć wszelkich środków, aby zrealizować swoje cele. Obecnie na świecie działa kilkanaście ugrupowań terrorystycznych, wśród których wyróżnić można: ISIS, Al-Kaidę, Boko Haram, Huti czy Hezbollah. Rejony ich działań ilustruje rysunek 3 [9]. Wymienione organizacje, pomimo tego, że skumulowane są przede wszystkim na Bliskim Wschodzie oraz w Afryce Północnej, dysponują możliwościami przeprowadzenia potencjalnego ataku w każdym zakątku świata. Należy pamiętać, że celem ataków terrorystycznych prawie zawsze jest zastraszenie i próby podporządkowania sobie danej społeczności. Strach przed zachorowalnością, jak i skutki chorób mogą być najsilniejszym czynnikiem wpływającym na osiągnięcie tych celów.

10 kwietnia 1972 roku podpisano Konwencję o zakazie broni biologicznej (ang. *Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction, Biological Weapons Convention, BWC*) [10]. Traktat zakazywał sygnatariuszom prowadzenia prac nad rozwojem komponentów broni biologicznej oraz jej produkcji, przechowywania, przekazywania i nabywania. Zobowiązuje również państwa-strony do całkowitego zniszczenia posiadanych zapasów broni biologicznej. Konwencja została podpisana przez 184 państwa (czerwiec 2022) [11]. Wiadomo jednak, że na całym

świecie wciąż trwają prace nad szczepionkami, lekami i innymi farmaceutykami, co oczywiście jest niezbędne ludzkości i ma pozytywny wydźwięk, jednak może stanowić pretekst do pracy nad bronią biologiczną przez radykalne ugrupowania niepaństwowe czy niektóre państwa [12-15].

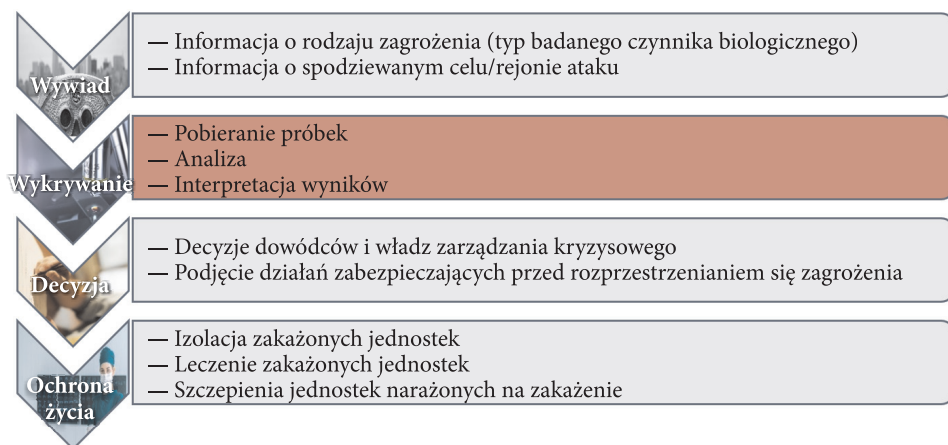


Rys. 3. Umiejscowienie wybranych organizacji terrorystycznych. Źródło: [9]

2. Ogólne procedury działania dotyczące wystąpienia zagrożenia biologicznego

Systemy obronne państw są przygotowane na odparcie różnych rodzajów ataków bądź zapobieżenie im, jednak ochrona przed bronią biologiczną wciąż pozostaje najsłabszym ogniwem w systemie rozpoznania skażeń i zagrożeń. Jest to spowodowane m.in. faktem, że jak dotąd jedyną skuteczną ochroną przed czynnikami biologicznymi są szczepionki. W większości przypadków działają one na pojedyncze patogeny, rzadko na grupy substancji zakaźnych. Nie jest wykonalne zaszczepienie wszystkich ludzi przed wszystkimi możliwymi czynnikami biologicznymi, zwłaszcza że dodatkowo mogą one ulegać różnego rodzaju mutacjom. W celu skutecznej ochrony ludności niezbędne są zatem jak najszybsze sposoby identyfikacji patogenów oraz trafna charakterystyka środka biologicznego. Po rozpoznaniu rodzaju zakażenia i ocenie możliwych etiologii zachorowań możliwe jest określenie źródła skażenia i ocena przyczyn wystąpienia zdarzenia. Dużą rolę odgrywa sprawnie działający wywiad, pozwalający na przewidzenie wystąpienia

zagrożenia oraz oszacowanie typu użytego środka. Kolejnym krokiem jest leczenie zakażonych. Niezbędna do tego celu jest wiedza na temat możliwych przypadków chorób, odpowiednie przygotowanie personelu medycznego do masowych przyjęć zakażonych oraz rozwiązania logistyczne w tym zakresie. Należy mieć na względzie, że wirulencja oraz szybkość rozprzestrzeniania się danych drobnoustrojów może się znacząco różnić. Na przykład czynnik chorobotwórczy — wąglik — powoduje miejscowe uszkodzenie poprzez kontakt ludzi z chorym bydłem i powoduje niską śmiertelność. Jednak sztuczne rozprzestrzenienie go w postaci aerozolu i wchłonięcie przez drogi oddechowe skutkuje niemal stuprocentową śmiertelnością [4]. Czynności umożliwiające ochronę ludności przed działaniem broni biologicznej przedstawia schematycznie rysunek 4.

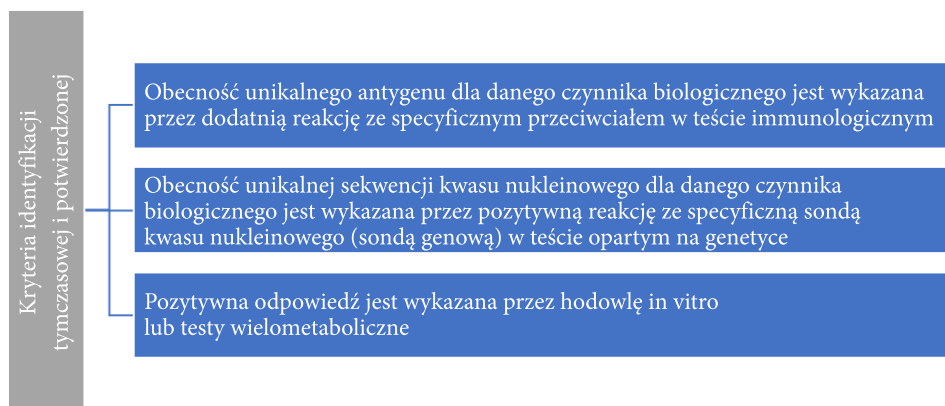


Rys. 4. Działania podejmowane w celu zapewnienia bezpieczeństwa biologicznego oraz postępowanie w przypadku zaistnienia zagrożenia biologicznego. Opracowanie własne

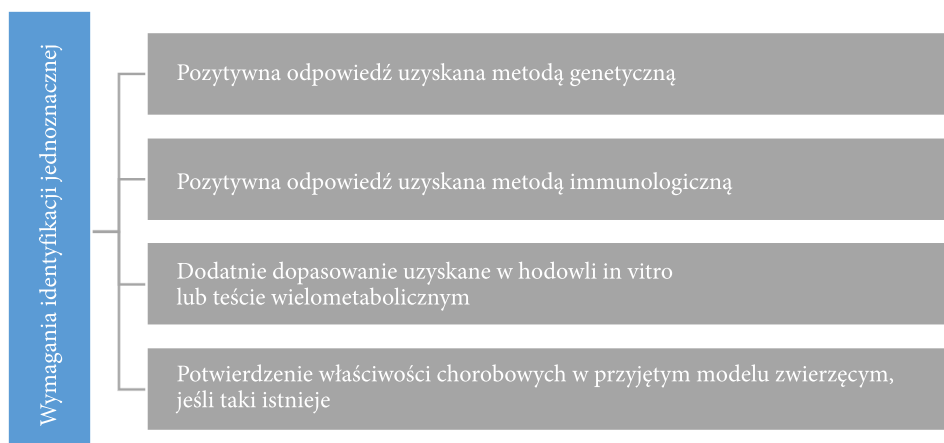
3. Procedury postępowania z próbkami mogącymi stanowić zagrożenie biologiczne

Jedne z najważniejszych elementów umożliwiających dalsze działania związane z bezpieczeństwem ludności to prawidłowe wykrycie i wiarygodna analiza zagrożenia. Pierwszą składową procesy weryfikacji próbek jest identyfikacja czynnika biologicznego. Dokonuje się jej na podstawie trzech kryteriów zamieszczonych na rysunku 5. Obecność jednego z nich pozwala na identyfikację wstępną (tymczasową). Identyfikację czynnika biologicznego potwierdza się, gdy zostaną spełnione dowolne dwa z trzech kryteriów, a tymczasowa identyfikacja jest możliwa w obecności autentycznych wzorców odniesienia (próbki kontrolne pozytywne i negatywne)

w identycznych warunkach doświadczalnych. Jednoznaczna identyfikacja czynnika biologicznego zapewnia najwyższy poziom pewności, co jest niezbędne do kształtowania stanowisk strategicznych i politycznych. Potwierdzona identyfikacja staje się jednoznaczna, jeśli wszystkie omawiane kryteria okażą się prawdziwe dla danego czynnika biologicznego w obecności autentycznych wzorców odniesienia (próbki kontrolne pozytywne i negatywne) w identycznych warunkach doświadczalnych, co przedstawiono na rysunku 6. Należy pamiętać, że aby wywołać chorobę u żywego żywiciela, dany patogen musi mieć czynnik aktywny biologicznie i być zdolny do replikacji. Dopóki nie zostanie uzyskana pozytywna identyfikacja w hodowli, teście wielometabolicznym czy na modelu zwierzęcym, nie jest możliwe określenie, czy czynnik biologiczny jest aktywny metabolicznie. Do czasu ustalenia aktywności metabolicznej istnieje możliwość, że badany incydent był mistyfikacją, w której do wywołania terroru użyto nieszkodliwego, zabitego preparatu bojowego środka biologicznego. O takiej możliwości należy pamiętać przy ocenie postępowania z osobami narażonymi oraz o potencjalnych kryminalnych, strategicznych i politycznych konsekwencjach wyników identyfikacji. Świadczy to o tym, jak ważne są: właściwe pobranie, transport i przechowywanie próbki przed analizą, tak aby każdy czynnik broni biologicznej obecny w próbce pozostał żywotny. Warto pamiętać, że wyszczególnione na schematach (rysunki 5-6) kryteria będą miały zastosowanie do wszystkich klasycznych drobnoustrojów z wyjątkiem jednoznacznej identyfikacji: a) czynników biologicznych, dla których nie ma odpowiednich metod hodowli, np. wirusowe zapalenie wątroby typu B, które rozwija się tylko u ludzi, b) czynników biologicznych, które zostały genetycznie zmanipulowane w celu zmiany ich cech, oraz c) nowatorskich środków, takich jak organizmy mikrokapsułkowane, priony czy zakaźny kwas nukleinowy [16].

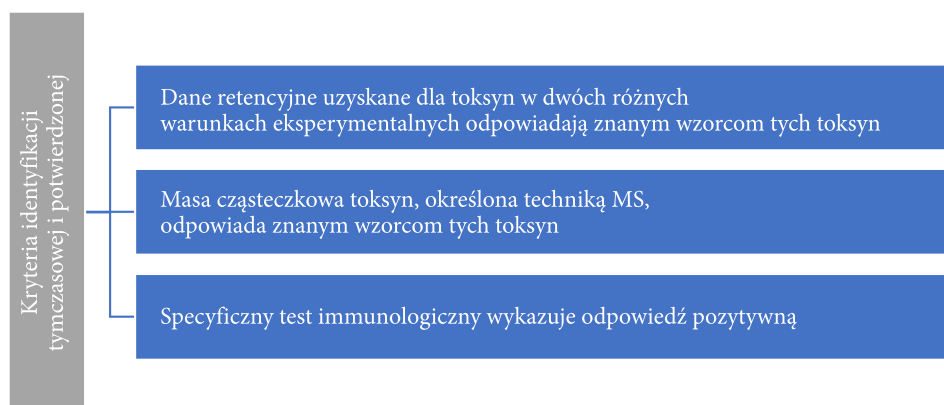


Rys. 5. Kryteria identyfikacji wstępnej (jedno z trzech kryteriów) i potwierdzonej (dwa z trzech kryteriów) środków aktywnych biologicznie. Opracowanie własne na podstawie [16]

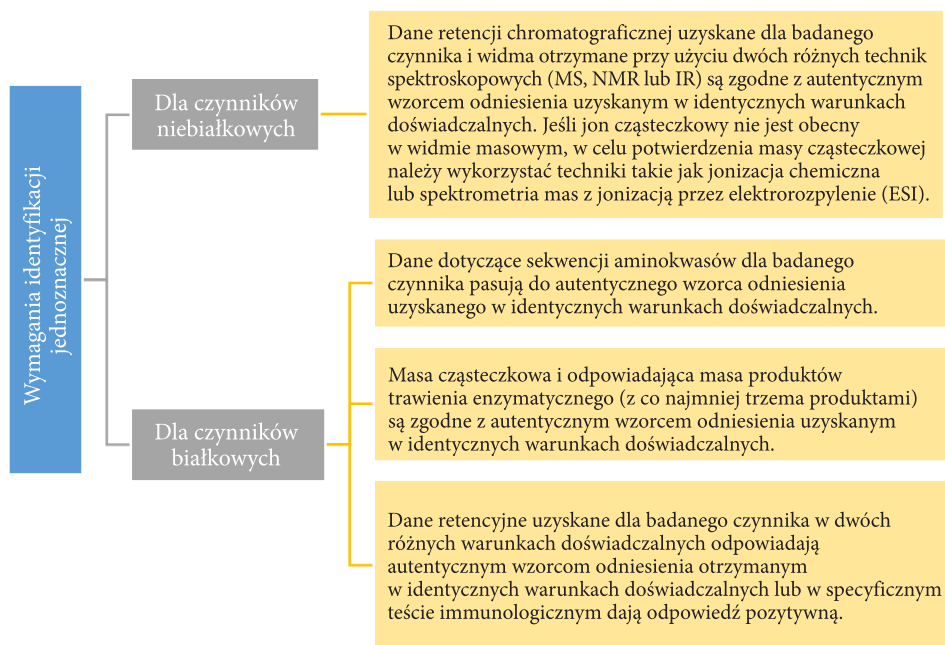


Rys. 6. Kryteria identyfikacji jednoznacznej środków aktywnych biologicznie. Opracowanie własne na podstawie [16]

Nieco inne kryteria dotyczą toksyn (ang. *mid-spectrum agents*). Taką substancję można uznać za wstępnie zidentyfikowaną, gdy spełnione jest jedno z kryteriów podanych na rysunku 7. Identyfikację toksyn potwierdza się, gdy spełnione są dowolne dwa z trzech kryteriów identyfikacji tymczasowej lub w przypadku toksyn białkowych, gdy masa cząsteczkowa i odpowiadająca jej masa produktów trawienia enzymatycznego (z co najmniej trzema produktami) odpowiadają znanym wzorcom tego czynnika. Identyfikacja toksyn jest jednoznaczna, gdy spełnione są warunki znajdujące się na rysunku 8.



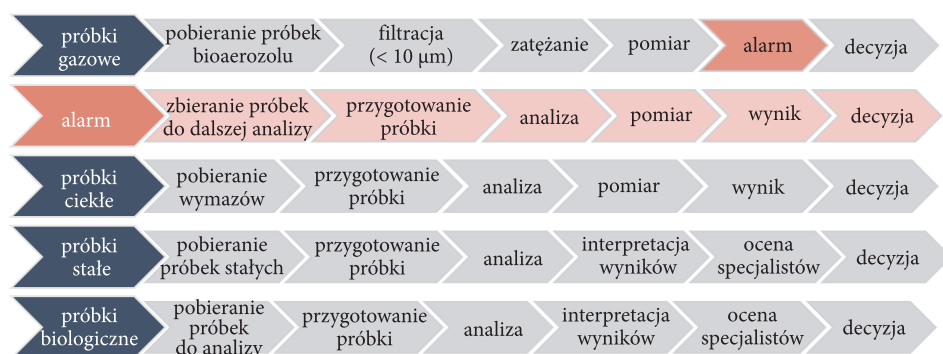
Rys. 7. Kryteria identyfikacji wstępnej (jedno z trzech kryteriów) i potwierdzonej (dwa z trzech kryteriów) środków nieaktywnych biologicznie (toksyn). Opracowanie własne na podstawie [16]



Rys. 8. Kryteria identyfikacji jednoznacznej toksyn. Opracowanie własne na podstawie [16]

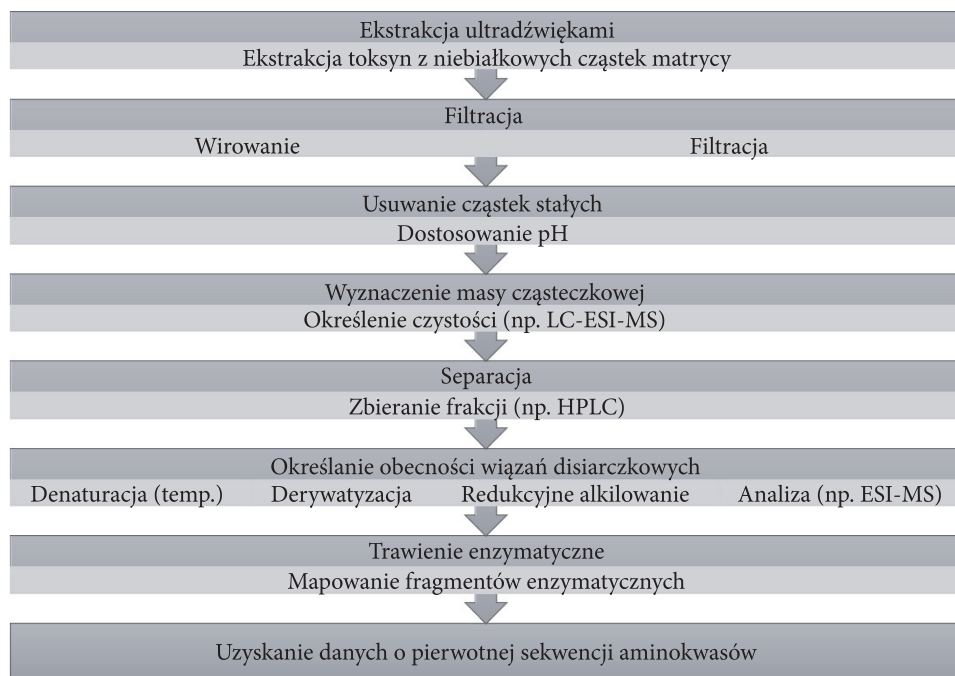
Pobieranie próbek biologicznych przebiega odmiennie w zależności od warunków i dostępnego wyposażenia. Na szczególną uwagę zasługuje pobieranie próbek za pomocą urządzeń i zestawów znajdujących się na wyposażeniu wojska, które pozwalają na pobranie próbek w szczególnie trudnych warunkach terenowych. W zależności od rodzaju próbki można wyróżnić kilka sposobów obchodzenia się z nią, tak aby szybko otrzymać odpowiedź zwrotną o faktycznym wystąpieniu zdarzenia oraz rodzaju wykrytego patogenu. Schematycznie ilustruje to rysunek 9. W zależności od potrzeb można wykorzystać różne urządzenia pozwalające na wykrycie i identyfikację czynnika biologicznego. Urządzenia te różnią się sposobem dostarczenia próbki oraz zaimplementowaną technologią pozwalającą na wykrycie i/lub identyfikację zagrożenia. Powietrze może być stale monitorowane na obecność bioaerozolu chorobotwórczego. W większości przypadków wymagana jest przy tym jedynie filtracja powietrza, w celu usunięcia cząstek biologicznych stale obecnych w powietrzu i niestanowiących zagrożenia – np. pyłków roślin czy tkanek zwierzęcych. Filtry przepuszczają zazwyczaj cząstki nie większe niż 10 μm . Sposób odróżnienia cząstek biologicznych od niebiologicznych oraz identyfikacji zagrożenia zależy od zastosowanej technologii. W przypadku ciągłego monitoringu powietrza po wykryciu zagrożenia większość z dostępnych na rynku urządzeń do detekcji skażeń automatycznie uruchamia procedurę pobierania i załadowania próbek do dalszej analizy laboratoryjnej. Dzięki temu możliwe jest potwierdzenie wystąpienia zagrożenia

oraz identyfikacja rodzaju patogenu. Próbkę dostarczane są do laboratorium, gdzie poddawane są odpowiedniej obróbce, np. ekstrakcji i/lub derywatywacji oraz analizie. Uzyskane wyniki interpretują specjaliści, którzy następnie przedstawiają raport i wnioski odpowiednim władzom, odpowiedzialnym za podejmowanie decyzji o dalszych działaniach w celu zapewnienia bezpieczeństwa. Ciecz można pobrać do analizy w postaci próbki o danej objętości lub wymazu. Mogą to być próbki wody czy innych substancji ciekłych, a także ciekłe próbki biologiczne (np. ślina, krew). Analiza wymazów przeważnie opiera się na przeprowadzeniu testu PCR, natomiast analiza próbki ciekłej wymaga zwykle dobrze wyposażonego laboratorium i jest poprzedzona odpowiednim przygotowaniem takiej próbki.



Rys. 9. Schemat postępowania z próbkami w zależności od ich rodzaju. Opracowanie własne

Analiza próbek powietrza oraz biologicznych i niebiologicznych próbek ciekłych i stałych pod kątem obecności patogenów powinna być przeprowadzana w specjalnie do tego przystosowanym laboratorium posiadającym odpowiedni poziom bezpieczeństwa biologicznego (ang. *biosafety level*, BSL). W procesie przygotowania próbek do analizy można wyróżnić pewne stałe czynności. Większość laboratoriów, chcąc przygotować próbki i analizę klasycznych czynników biologicznych, opracowuje znormalizowane schematy postępowania w celu uproszczenia procesu. Przedstawiają one zazwyczaj sposób postępowania z próbkami w celu wydzielenia interesującej(-ych) substancji z matrycy próbki, po którym następuje stopniowa sekwencja analizy otrzymanego preparatu. Odmienny schemat jest stosowany, gdy identyfikacja wstępna lub potwierdzona wskazuje na obecność toksyn. Ogólny schemat postępowania z takimi próbkami prezentuje rysunek 10. Przyjmuje się, że próbka zawierająca toksynę białkową zostanie pobrana jako próbka wodna z próbniaka aerozolu o dużej objętości. Do takiej sytuacji dochodzi najczęściej, kiedy do detekcji skażeń biologicznych wykorzystuje się przyrządy wojskowe umożliwiające monitorowanie powietrza w trybie ciągłym lub służące jedynie do pobierania próbek aerozolu, np. BioCapture z750 firmy Bioflyte.



Rys. 10. Schemat postępowania z próbkami bioaerozoli badanymi na obecność toksyn.
Opracowanie własne na podstawie [16]

Próbki mogą być dostarczone do laboratorium w wielu różnych formach. Na przykład: próbki powietrza zatężone w cieczy lub na filtrach, próbki wody, gleby lub roślinności, waciki z wymazami ze skażonych twardych powierzchni lub próbki biomedyczne pobrane od osób potencjalnie zakażonych. Celem przetwarzania próbek jest odzyskanie czynnika biologicznego będącego przedmiotem zainteresowania z matrycy, w której jest on zawarty, a także eliminacja składników mogących zakłócać dalszą analizę. Procedury przygotowania próbek biologicznych znajdują się na rysunku 11.

Cele przygotowania próbek podejrzanych na obecność toksyn są takie same jak przy innych rodzajach próbek, w tym biologicznych, i opierają się na poprawie czułości (przez usunięcie interferentów i zatężanie próbki) oraz zwiększeniu lotności analitów poprzez derywatyzację oraz usunięcie substancji mogących negatywnie wpłynąć na części aparatury (chromatografów i spektrometrów). Przykładowe etapy techniki przygotowania próbek przedstawiono na rysunku 12.

Podstawowe procedury przygotowania próbek biologicznych
<ul style="list-style-type: none">— Derywatywacja— Homogenizacja— Usunięcie interferentów chemicznych— Usunięcie inhibitorów mikrobiologicznych— Zateżnienie
Zwilżanie
<ul style="list-style-type: none">— Próbka w postaci ciekłej stanowi wymóg dla większości technik analitycznych (zwilżanie za pomocą wody, soli fizjologicznej lub buforów)
Detergenty
<ul style="list-style-type: none">— Uwalnianie niektórych drobnoustrojów od powierzchni matrycy (waty, gleby, liści)— Nie należy stosować w przypadku braku wyraźnego rozróżnienia między skażeniem wirusowym i bakteryjnym (wirusy są bardzo podatne na zniszczenie przez detergenty)
Flotacja
<ul style="list-style-type: none">— Izolacja zarodników z próbki poprzez przerwanie oddziaływań adhezyjnych między zarodnikami a matrycą próbki i unoszenie uwolnionych zarodników na powierzchnię roztworu
Wzmacnianie kultury
<ul style="list-style-type: none">— Wstępna inkubacja próbki w płynnej pożywce do hodowli bakterii w celu amplifikacji ilości obecnych drobnoustrojów, a tym samym zwiększenia czułości dalszych technik wykrywania
Wirowanie
<ul style="list-style-type: none">— Usunięcie zanieczyszczeń lub selektywna izolacja populacji drobnoustrojów
Filtracja
<ul style="list-style-type: none">— Przepuszczenie próbki przez filtry z różnych materiałów, np. stal nierdzewną, octan celulozy, teflon, nylon i difluorek poliwinylidenu
Inokulacja zwierząt laboratoryjnych
<ul style="list-style-type: none">— Może być konieczna, jeśli wymagana jest szybka identyfikacja w celu leczenia narażonych osób wykazujących objawy chorobowe lub w celu rozwiązania napiętych sytuacji politycznych lub wojskowych, bądź gdy nie ma alternatywnej sztucznej pożywki hodowlanej dostępnej dla danego czynnika biologicznego— Inokulacja zwierzęcia może działać zarówno jako etap oczyszczania, jak i amplifikacji— Śmierć zwierzęcia i późniejsza izolacja podejrzanego czynnika biologicznego z tuszy jest dowodem, że czynnik jest nie tylko żywotny, lecz także w pełni zjadliwy

Rys. 11. Przykładowe techniki przygotowania próbek biologicznych. Opracowanie własne na podstawie [16]

Podstawowe procedury przygotowania próbek biologicznych

- Derywatywacja
- Usunięcie interferentów chemicznych
- Zatężanie
- Usunięcie substancji szkodliwych dla aparatury analitycznej
- Pomoc w charakteryzacji strukturalnej peptydów i białek (np. trawienie enzymatyczne)

Usuwanie cząstek stałych

- Usunięcie cząstek stałych z próbki wodnej jest konieczne przed analizą w celu zminimalizowania uszkodzenia oprzyrządowania analitycznego. Można to zrobić przez filtrację lub odwirowanie

Filtracja

- Przepuszczenie próbki przez filtry z różnych materiałów, np. stal nierdzewną, octan celulozy, teflon, nylon i difluorek poliwinylidenu. Niski odzysk peptydów lub białek z powodu adsorpcji na filtrze jest potencjalnym problemem, zwłaszcza w przypadku filtrów ze stali nierdzewnej i octanu celulozy

Ultrafiltracja

- Rozdzielanie cząsteczek w roztworze na selektywnej membranie na podstawie ich efektywnego rozmiaru

Wirowanie

- Separacja lub usunięcie cząstek stałych

Liofilizacja

- Do usuwania wilgoci lub konserwacji biocząsteczek
- Zamrażanie
- Sublimacja
- Odwodnienie

Trawienie

- Proces chemiczny lub enzymatyczny rozerwania wiązań chemicznych między aminokwasami białek, co skutkuje powstaniem wielu mniejszych peptydów. Powstałe fragmenty peptydów o mniejszej masie można scharakteryzować na podstawie masy cząsteczkowej metodą spektrometrii masowej
- Degradacja Edmana

Rys. 12. Przykładowe techniki przygotowania próbek zawierających toksyny.
Opracowanie własne na podstawie [16]

W przeciwieństwie do Konwencji o zakazie broni chemicznej (CWC) w Konwencji o zakazie broni biologicznej (BWC) nie istnieje żaden paragraf określający dokładną listę bojowych środków biologicznych. Niemniej agencja rządu Stanów Zjednoczonych (Centres for Disease Control — CDC) opublikowała listę służącą do nakreślenia obszaru zainteresowań w zakresie SIBCRA (ang. *Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents*). Lista nie jest wyczerpującym wykazem środków, ale służy jako przewodnik i wyróżnia trzy kategorie środków

biologicznych: A, B i C, w malejącej kolejności priorytetów. Kategoria A to czynniki o najwyższym priorytecie, obejmujące organizmy, które stanowią wysokie zagrożenie, ponieważ mogą być łatwo rozprzestrzeniane lub przenoszone z człowieka na człowieka, prowadzą do wysokiej śmiertelności i mogą mieć poważny wpływ na zdrowie. Skutki ich działania mogą wywołać panikę i zakłócenia porządku publicznego oraz wymagać podjęcia działań specjalnych. Kategoria B to środki drugorzędne, które są dość łatwe do rozpowszechnienia, skutkują umiarkowanymi wskaźnikami zachorowalności i niskimi wskaźnikami śmiertelności, a także wymagają szczególnych ulepszeń zdolności diagnostycznych i nadzoru nad chorobami. Kategoria C to pojawiające się patogeny, które mogą być zaprojektowane pod kątem masowego rozpowszechniania. W przyszłości dzięki dostępności, łatwości produkcji i rozpowszechniania mogą wywołać potencjalną wysoką zachorowalność i śmiertelność lub poważnie wpływać na stan zdrowia.

Przykładowe czynniki biologiczne wraz z podziałem na kategorie i z wybranymi wartościami charakterystycznymi przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1

Wybrane parametry podstawowych czynników biologicznych [17-33]

Rodzaj czynnika	Czynnik biologiczny	Choroba	Kat.	Okres wylęgania	Śmiertelność	Materiał do badań	Metoda badań
Bakterie	laseczka wąglika	wąglik płucny (i in.)	A	9 godz. - 14 dni	postać płucna 100%	tkanki zajęte procesem chorobowym, narządy, płyny ustrojowe	testy immunochromatograficzne, SMART, test biochemiczny API 50 CHB
	pałeczka dżumy	dżuma płucna (i in.)	A	2-8 dni	postać płucna 100%	krew, płwocina, aspiraty węzłów chłonnych	PCR, hodowla
	pałeczka tularemii	tularemia (gorączka zajęcza)	A	3-5 dni	umiarkowana	krew, płwocina, surowica, tkanka z węzłów chłonnych	PCR, IF bezpośrednia, elektroforeza, testy immunocytochemiczne
	przecinkowiec cholery	cholera azjatycka	-	2-3 dni	20% dla osób leczonych; 50% dla nieleczonych	kał	mikroskopia świetlna, RDTs
	pałeczki salmonelli	salmonelloza	-	6-48 godz.	~1%	kał	PCR

cd. tab. 1

Wirusy	SARS-CoV	CO-VID-19	-	2-14 dni	~1,29% (stan na 26.06.2022)	aspiraty przeżłcha- wiczne lub z nosogardła, popłuczyny oskrzelikowo- pęcherzyko- we, wymazy z nosogardła	RDTs, PCR
	żółtej febry	żółta febra (żółta gorączka)	-	3-6 dni	50%	krew	PCR, hodow- ła, ELISA
	<i>Togaviridae</i> <i>Alphavirus</i>	zapalenie mózgu	B	5-10 dni	60%	surowica, płyn mózgowo- rdzeniowy	testy serolo- giczne
	gorączki krwotocznej ebola	ebola	A	3-7 dni	50-90%	surowica, krew	IF, ELISA, Western-Blot, testy antyge- nowe
	ospy praw- dziwej	ospa prawdziwa	A	5-7 dni	20-40%	płyn surowiczy z krost	PCR, RDTs
Toksyny	toksyna botulinowa	botulizm	A	2 godz. - 8 dni	100%	surowica, kał, wymiociny, popłuczyny z żołądka lub oskrzeli, materiał z ran	ELISA, CLISA, PCR
	rycyna	obrzęk płuc	B	3-48 godz.	1,9%	krew, suro- wica	PCR
	enterotok- syna gronkowca	liszajec, wstrząs toksyczny	-	30 min - 8 godz.	0,03%	spożyta żyw- ność	PCR, ELISA, ELFA, RPLA
Chlamydia	<i>C. tracho- matis</i>	zapalenie szyjki macicy, zapalenie cewki moczowej	-	1-3 tyg.	brak danych	krew, suro- wica, mocz, wymaz z dróg moczowo- płciowych	MIF, CF, ELISA, testy serologiczne, PCR
	<i>C. pneumo- niae</i>	zapalenie górných i dolnych dróg odde- chowych	-	3-4 tyg.	brak danych	krew, plwociny	rt-PCR, biopsja tkanki płucnej
	<i>C. psittaci</i>	ornitoza	-	5-15 dni	brak danych	krew, tkanki, wydaliny	testy serolo- giczne, PCR

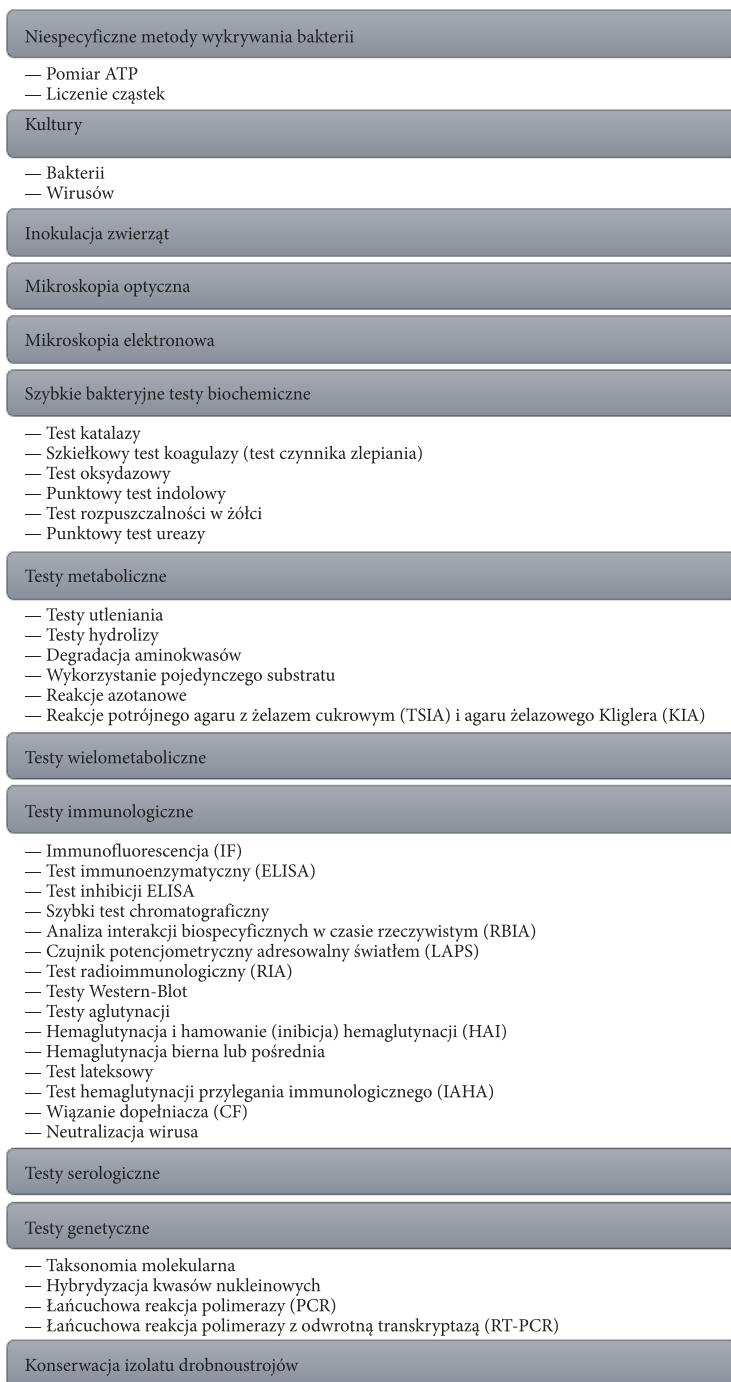
cd. tab. 1

Riketsje	gorączki Q	Gorączka Q	B	14-21 dni	umiarkowana	krew, mocz, wymiociny, nasienie, płyny tkankowe, surowica	testy serologiczne, CF, IF pośrednia, mikroaglutynacja
	duru plamistego	dur plamisty	-	8-15 dni	30%	krew, wycinki skóry	metody mikroskopowe, testy serologiczne
	gorączki plamistej Gór Skalistych	gorączka plamista Gór Skalistych	B	3-10 dni	20%	krew, mocz, płyny tkankowe, wycinki skóry, materiał bioptyczny	ELISA, Western-Blot
Grzyby	Candida	kokcidioidoza	B	7-28 dni	duża przy obniżonej odporności	krew, płwocina, mocz, wymazy z miejsc objętych zakażeniem, wycinki tkanek, popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelkowe, płyn mózgowo-rdzeniowy	mikroskopowe, mikrobiologiczne, serologiczne, genetyczne
	<i>Trichophyton</i>	grzybice skóry, paznokci i włosów	-	-	brak danych		
	<i>Aspergillus</i>	zakażenia narządowe	-	-	brak danych		
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	histoplazmoza	-	-	brak danych		

4. Technologie i sprzęt pozwalające na wykrywanie skażeń biologicznych

W AEP-66 [16] wyróżniono kilkanaście technik analitycznych pozwalających na wykrycie środków czynnych biologicznie. Zostały one ujęte schematycznie odpowiednio na rysunku 13 i 14.

Do najważniejszych technik stosowanych on-site w celu wykrycia zagrożeń biologicznych należą: 1) spektroskopia fluorescencyjna z fluorescencją wzbudzaną laserowo (ang. *Laser Induced Fluorescence*, UV-LIF), 2) spektrofotometria płomieniowa i 3) badanie diagnostyczne łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time Polymerase Chain Reaction*, *rt-PCR*). W niektórych urządzeniach zainstalowane są też dodatkowe elementy wspomagające pobieranie próbek, które mogą być wykorzystywane do późniejszych analiz. Przykładem takich rozwiązań jest suchy filtr DFU, pozwalający na pobieranie i zatężanie próbek aerozolu w taki sposób, aby z łatwością można było przenieść próbkę do innego urządzenia lub systemu umożliwiającego detekcję skażeń.



Rys. 13. Przykładowe techniki wykrywania środków biologicznie czynnych.
Opracowanie własne na podstawie [16, 34]

Testy biologiczne

- Inokulacja zwierząt
- Immunologiczna mikroskopia optyczna
- Testy immunologiczne (ELISA, inhibicji ELISA, szybki test immunologiczny i chromatograficzny, formaty neutralizacji toksyn)
- Testy serologiczne

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

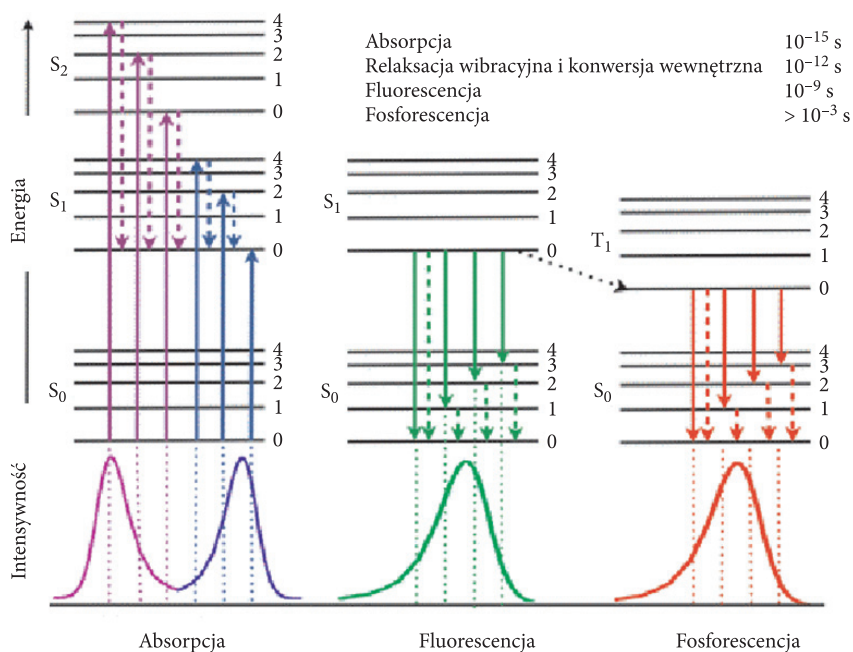
Spektrometria mas (MS)

Rys. 14. Przykładowe techniki wykrywania toksyn. Opracowanie własne na podstawie [16]

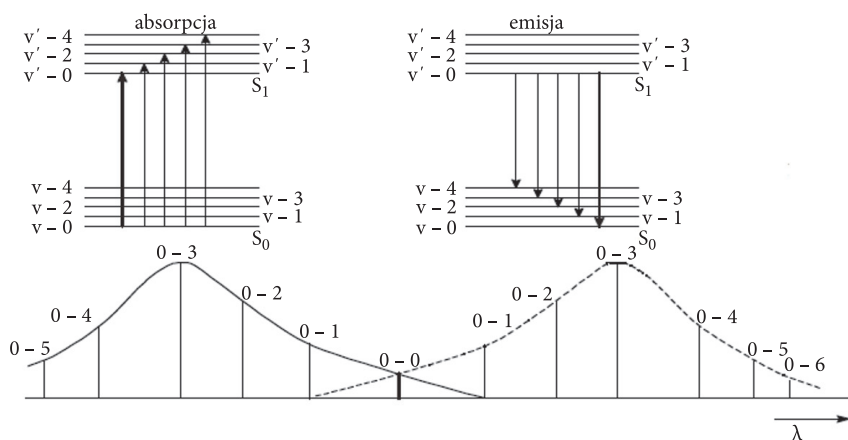
4.1. Spektroskopia fluorescencyjna z fluorescencją wzbudzaną laserowo UV-LIF

Podstawą spektroskopii fluorescencyjnej jest zjawisko fluorescencji, czyli emitowania energii (światła) przez substancję uprzednio wzbudzoną poprzez pochłonięcie promieniowania elektromagnetycznego. Jest to jedno ze zjawisk, obok fosforescencji, składających się na fotoluminescencję. Fotoluminescencja to inaczej zjawisko emisji fotonu będące konsekwencją powrotu elektronu do stanu podstawowego po jego wzbudzeniu na skutek absorpcji światła. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia substancji emitującej w niskim zakresie stężeń. Fluorescencja jest procesem szybkim (10^{-8} s), dlatego obserwuje się ją jedynie z najniższego poziomu oscylacyjnego pierwszego elektronowego stanu wzbudzonego. Nie pociąga ona za sobą zmiany multipletowości. Schematyczne przedstawienie zjawisk dotyczących luminescencji pokazuje diagram Jabłońskiego na rysunku 15.

Energię pierwszego wzbudzonego stanu singletowego można wyznaczyć za pomocą porównania widm absorpcyjnych i fluorescencyjnych danej cząsteczki. Można wtedy zaobserwować przesunięcie na widmie o charakterystyczną wartość długości fali (odpowiadającą danej energii), tak jak pokazano to na rysunku 16.



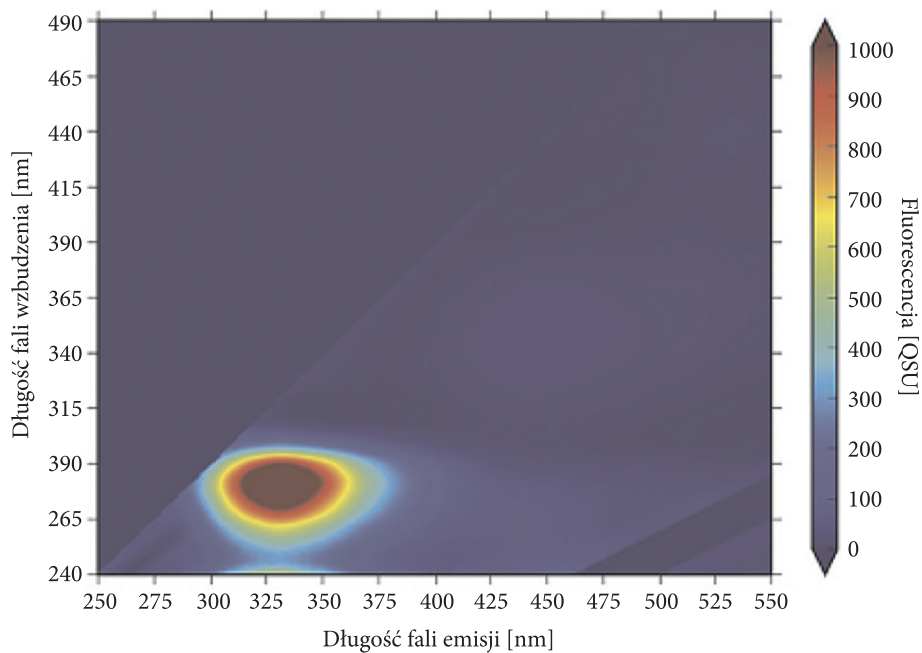
Rys. 15. Diagram Jabłońskiego przedstawiający poziomy i widma energetyczne. Strzałki z liniami ciągłymi wskazują przejścia radiacyjne jako zachodzące w wyniku absorpcji (fioletowy, niebieski) lub emisji (zielony dla fluorescencji, czerwony dla fosforescencji) fotonu. Strzałki z liniami przerywanymi reprezentują przejścia niepromieniste (fioletowy, niebieski, zielony, czerwony). Konwersja wewnętrzna to przejście bezpromieniste, które występuje, gdy stan wibracyjny wyższego stanu elektronowego jest sprzężony ze stanem wibracyjnym niższego stanu elektronowego. Poniżej wykresu przedstawiono szkice widm absorpcji, fluorescencji i fosforescencji. Źródło: [35]



Rys. 16. Schemat elektronowych poziomów energetycznych oraz widm obrazujących przesunięcie maksimum emisji w kierunku fal dłuższych w stosunku do maksimum absorpcji. Źródło: [36]

Pełną charakterystykę widm fluorescencyjnych można uzyskać na podstawie dwóch rodzajów widm: emisyjnego i wzbudzeniowego. Widmo emisyjne to zależność intensywności emisji w funkcji długości fali przy zadanej długości fali wzbudzającej. Z kolei widmo wzbudzenia to zależność intensywności emisji od długości fali przy zadanej długości fali emisji. Jest to zatem widmo wzbudzenia „czystego” związku, co może służyć do weryfikacji czystości próbki, dla której wykonano widmo absorpcyjne [36]. Substancje chemiczne ulegające zjawisku fluorescencji to fluorofory. Fluorofory czynne biologicznie to m.in. barwniki roślinne (chlorofile i karotenoidy), aminokwasy aromatyczne (tryptofan, tyrozyna, fenyloamina) i zasady nukleinowe w DNA i RNA, witaminy i hormony (np. ryboflawina). Cechą wspólną wirusów, bakterii, endospor, grzybów i pyłków jest występowanie w ich strukturze różnego rodzaju białek. Pod wpływem promieniowania UV obecne w białkach fluorofory wykazują charakterystyczne maksima wzbudzenia i emisji. W celach weryfikacji do analizy wybiera się zazwyczaj tryptofan (Trp) o maksimum wzbudzenia około 280 nm i maksimum emisji ok. 330 nm [37] oraz NADH, czyli zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy o wartościach dla maksimum wzbudzenia i emisji odpowiednio ok. 330 i 440 nm [38]. Tryptofan jest wybierany z uwagi na większe natężenie fluorescencji w porównaniu do tyrozyny. Fluorescencja jest wygaszana na skutek wewnątrzcząsteczkowego nakładania się pierścieni aromatycznych. Rzadko obserwowana jest fluorescencja pochodząca od fenyloalaniny. Wspomniane wyżej grupy można odróżnić dzięki subtelnym różnicom na widmach wzbudzenia. Na przykład dla białek maksimum wzbudzenia znajduje się w obszarze ok. 270-280 nm, a dla pyłków 320-360 nm. Dla bakterii obserwowane są zazwyczaj wyższe wartości niż dla pyłków i grzybów. Na rysunku 17 widoczne jest przykładowe widmo emisyjno-wzbudzeniowe bakterii *E. coli* (*Escherichia coli*). Należy jednak mieć na uwadze, że istnieją pyłki mogące stanowić poważne zakłócenie sygnału, z uwagi na podobne właściwości spektralne do bakterii, na przykład pyłek kukurydzy. Warto pamiętać, że widma fluorescencyjne silnie zależą od warunków środowiska (np. pH, temperatura), a do najczęściej występujących interferentów należą, oprócz pyłków, również spaliny silnikowe o lekko kwasowym charakterze, a także kurz czy dym papierosowy. Należy uwzględnić te czynniki, aby nie doprowadzić do błędnej klasyfikacji [39]. Ważne jest, że widma fluorescencyjne pozwalają oszacować, do której grupy należy dany czynnik, co umożliwi uzyskanie odpowiedzi w czasie rzeczywistym. Jest to wystarczające kryterium do detekcji skażeń biologicznych w warunkach polowych.

Dostępny na świecie sprzęt do detekcji skażeń biologicznych oparty na technologii UV-LIF został przedstawiony na rysunkach 18-25. Są to np. produkty firmy FLIR, takie jak IBAC 1 i IBAC 2, czy systemy ATHINA firmy Chemring.



Rys. 17. Widmo emisyjno-wzbudzeniowe *Escherichia coli*. Źródło: [40]



Rys. 18. Natychmiastowy analizator biologiczny i kolektor IBAC 1 firmy FLIR
Źródło: <https://www.gammadata.se/products/cbrne/biological/ibac-1/> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 19. Przenośny system do detekcji zagrożeń biologicznych IBAC 2 firmy FLIR
Źródło: <https://www.gammadata.se/products/cbrne/biological/ibac-2/> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 20. Fluorescencyjny detektor cząstek ATHINA Detector Collector 100 firmy Chemring
Źródło: <https://www.chemring.com/what-we-do/sensors-and-information/chemical-and-biological-detection/biological-detection> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 21. Fluorescencyjny detektor cząstek ATHINA Detector Collector 200 firmy Chemring
Źródło: https://www.chemring.com/~/_/media/Files/C/Chemring-V3/documents/sensors/datasheet-athina-detector-collector-200v1.pdf [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 22. Joint Biological Point Detection System (JBPDS) stworzony we współpracy z firmą Chemring
 Źródło: <https://www.dvidshub.net/image/73500/ohio-national-guard-first-receive-new-biological-detection-system> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 23. Taktyczny detektor aerozoli biologicznych Tac-7, opracowany przez firmę Research International

Źródło: <https://www.pimco.pl/products/tac-7-taktyczny-detektor-bioaerozoli/> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 24. Detektor aerozolu biologicznego TacBio, opracowany przez CCDC CBC (U.S. Combat Capabilities Development Command Chemical Biological Center)

Źródło: <https://www.indesys.in/biologicalDetection.html> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 25. Biologiczny czujnik aerozolu TacBio 2 opracowany przez CCDC CBC
Źródło: https://static.dvidshub.net/media/pubs/pdf_13113.pdf [dostęp: 22.06.2022]

4.2. Spektrofotometria płomieniowa

Spektrofotometria płomieniowa jest wykorzystywana od wielu lat do analizy materii. Detekcja i analiza za pomocą tej techniki opiera się na założeniu, że pierwiastki lub związki chemiczne emitują charakterystyczne widmo energetyczne, gdy zostanie im przekazana energia, która spowoduje ich wzbudzenie. Każdy atom emituje charakterystyczną dla siebie długość fali, co pozwala na dokładną identyfikację wykrytej substancji. Dodatkową korzyścią jest możliwość ilościowej identyfikacji wykrytego związku przez zmierzenie ilości wytworzonej przy tym energii. Kolejną zaletą jest fakt, że w przeciwieństwie do innych technik emisyjna spektrofotometria płomieniowa ma wyjątkowo niski wskaźnik fałszywych wskazań. Technika ta z powodzeniem została wykorzystana do detekcji skażeń chemicznych i biologicznych. Podobnie jak w przypadku detektorów substancji chemicznych powietrze w sposób ciągły jest wciągane do urządzenia, w którym następuje filtracja aerozolu pod kątem separacji cząstek o rozmiarach odpowiadających cząstkom biologicznym stanowiącym największe zagrożenie dla organizmu człowieka. Zamontowany system impaktorowy służy do izolowania cząstek o wielkości najczęściej od 0,5 do 10 μm . Zaciągnięty strumień powietrza jest następnie zatężony i wprowadzany do palnika. Palnik stanowi źródło energii, rozbija cząsteczki na atomy, które ulegają wzbudzeniu. Atomy wracają do stanu podstawowego, emitując charakterystyczne promieniowanie, które jest wychwytywane i analizowane przez system detektorów i analizatorów. Każda cząsteczka w strumieniu powietrza jest indywidualnie analizowana i klasyfikowana przez zaawansowany algorytm przetwarzania sygnału, jako cząsteczka biologiczna lub niebiologiczna ze względu na obecność RNA.

Dzięki takiemu rozwiązaniu można rozróżnić materiały biologiczne i niebiologiczne. Niezwykle ważne jest, że technika ta, w przeciwieństwie np. do spektrometrii mas, może dawać odpowiedź w czasie rzeczywistym, co pozwala na niemal natychmiastową identyfikację kluczowych pierwiastków i związków. Dodatkową zaletą tej technologii jest to, że nie tylko umożliwia identyfikowanie materiałów obecnych w powietrzu, lecz także ilościowe określanie poziomów ich stężeń. Ilość wytworzonej energii jest bezpośrednio skorelowana z ilością substancji lub jej stężeniem w strumieniu powietrza. Technika ta pozwala na wykrywanie stężeń tak niskich jak części na miliard (ppb). Tę technikę wykorzystuje firma Proengin w analizatorach skażeń AP4C. Przykładowe urządzenia do detekcji skażeń biologicznych, w których zaimplementowano technologię opartą na spektrofotometrii płomieniowej, pokazano na rysunkach 26-28.



Rys. 26. System wykrywania skażeń chemicznych i biologicznych 24/7 AP4C-FB firmy Proengin

Źródło: <https://www.wmddetectorselector.army.mil/PDFs/37.pdf> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 27. System wykrywania skażeń chemicznych i biologicznych AP4C-VB firmy Proengin

Źródło: army-technology.com/contractors/nbc/proengin-army/ [dostęp: 22.06.2022]



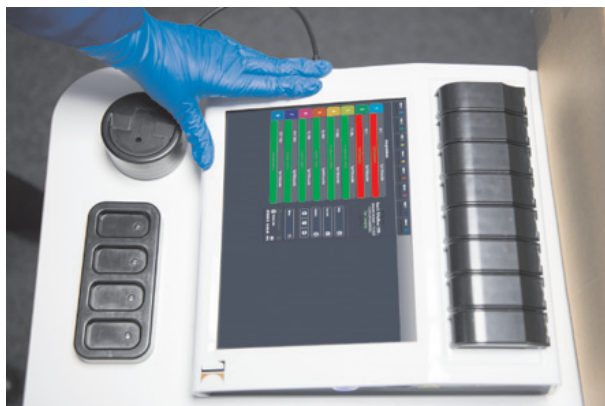
Rys. 28. System wykrywania skażeń biologicznych i nadzoru obszarów krytycznych MAB firmy Proengin Źródło: army-technology.com/contractors/nbc/proengin-army/ [dostęp: 22.06.2022]

4.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (rt-PCR)

Technika ta zrewolucjonizowała wiele dziedzin — od diagnostyki medycznej po kryminalistykę. Dzięki niej możliwa jest nie tylko diagnoza chorób, w tym genetycznych, nowotworowych i infekcyjnych, lecz także ustalenie stopnia pokrewieństwa, ustalanie zgodności tkankowej, co jest niezbędne w przypadku przeszczepów, czy identyfikacja sprawców w kryminalistyce. Pozostaje również najbardziej powszechną techniką wykrywania skażeń biologicznych. Zasada działania techniki PCR polega na wyizolowaniu i oczyszczeniu fragmentu DNA z komórek, a następnie powieleniu tego fragmentu. Odbywa się to poprzez specjalnie zaprojektowane tzw. startery, które są komplementarne do sekwencji otaczającej docelowy fragment. Następnie umieszcza się w termocyklerze zarówno dany fragment DNA (matrycę), jak i startery, a także substraty do syntezy powielanego DNA (trifosforany deoksynukleotydów, dNTP), enzym katalizujący reakcję (termostabilna polimeraza DNA) oraz roztwór buforowy utrzymujący odpowiedni pH. W termocyklatorze najpierw temperatura wzrasta do ok. 90°C, co powoduje rozplecenie (denaturację) nici DNA. Następnie temperatura spada do 40-70°C, co umożliwia przyłączenie się starterów, po czym znów rośnie do 72°C, aby przeprowadzić reakcję polimerazy DNA. Cykl ten jest powtarzany do uzyskania odpowiedniej ilości DNA. Po tym procesie następuje rozdzielenie DNA na żelu agarozowym i sprawdzenie obecności w próbce interesującego fragmentu DNA. Technika PCR ma wiele wariantów. Jedną z jej odmian jest PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real time PCR*, *rt-PCR*). Głównymi zaletami tej techniki są wysoka czułość reakcji oraz możliwość monitoringu ilości produktów po każdym cyklu reakcji.

Wariant ten jest dużo szybszy i umożliwia przeprowadzenie jednoczesnej analizy kilku genów z kilkunastu próbek. W tym przypadku do środowiska reakcji wprowadza się znakowane nukleotydy lub sondy fluorescencyjne zawierające cząsteczkę zdolną do emisji światła o określonej długości fali (fluorofor) łączące się z DNA. Dzięki temu uwidacznia się DNA, a przez zastosowanie barwników fluorescencyjnych można jednocześnie analizować kilka sekwencji DNA w danej próbce [41-44].

Techniki PCR wykorzystywane w detektorach skażeń biologicznych często łączy się z innymi technikami, np. UV-LIF. Przykłady urządzeń wykorzystujących technikę PCR oraz techniki łączone przedstawiono na rysunkach 29-32.



Rys. 29. Mobilny system T-COR 8 real-time PCR firmy Tetracore

Źródło: <https://www.southernscientific.co.uk/products-by-manufacturer/tetracore/t-cor-8> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 30. Zestaw detekcji skażeń biologicznych R.A.P.I.D. firmy BioFire Defense

Źródło: <http://www.kdanalytical.com/instruments/idahotechnology-rapid.aspx> [dostęp 22.06.2022]



Rys. 31. Zestaw detekcji skażeń biologicznych RAZOR™ EX firmy BioFire Defense

Źródło: <https://www.biofiredefense.com/wp-content/uploads/2018/09/RAZR-PRT-4024-RAZOR-EX-Training-Manual.pdf> [dostęp: 22.06.2022]



Rys. 32. System Bezpieczeństwa Biologicznego ATHINA (ABSS) firmy Chemring. Źródło: materiały katalogowe firmy Chemring, <https://www.chemring.com/~media/Files/C/Chemring-V3/documents/sensors/datasheet-jbpdsv1.pdf> [dostęp: 22.06.2022]

5. Analiza porównawcza sprzętu do detekcji skażeń biologicznych

W tabeli 2 zestawiono dane porównawcze omawianego sprzętu i systemów do detekcji skażeń biologicznych.

TABELA 2

Porównanie parametrów wybranych sprzętów do detekcji skażeń biologicznych

Porównywany parametr	Model sprzętu/system					
	Bio-Capture z750	IBAC 1	IBAC 2	T-COR-8	AP4C FB	AP4C VB
Przepływ [dm ³ /min]	200-500	4 (do 100)	4 (do 100)	-	Brak danych	Brak danych
Technologia	Suchy filtr DFU	UV-LIF	UV-LIF	rt-PCR	Spektrofotometria płomieniowa	Spektrofotometria płomieniowa
Czas (próbkiowania)	5, 10, 15, 20, 25, 30 min	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring w czasie rzeczywistym	Zależny od operatora	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring
Rozmiar próbki	5-6 mL	-	-	-	-	-
Czas pomiaru/ analizy	-	1 s	60 s	< 1 h	czas rzeczywisty	czas rzeczywisty
Wykrywane zagrożenie	Zbieranie materiału do analizy	Toksyny, zarodniki, wirusy, bakterie	Bakterie, wirusy, toksyny, spory	Broń biologiczna, choroby weterynaryjne	Wszystkie BST, TSP, nowiczoiki, środki binarne, bakterie, wirusy, zarodniki	Wszystkie BST, TSP, nowiczoiki, środki binarne, bakterie, wirusy, zarodniki
Temp. pracy [°C]	-	-10÷50	-20÷50	Brak danych	-32÷50	-32÷50
Czułość	-	< 100 ppl	100 ACPLA	-	-	-
Selektywność	-	Brak danych	0,7÷10 mikronów	-	2÷10 mikronów	2÷10 mikronów
Dodatkowe odczynniki	Brak	Brak	Brak	21 reagentów	Brak	Brak
Masa [kg]	< 4	2,7	5,5	4,5	18,2	4
Wymiary [cm]	Ręczny, długość ok 50	15,3 × 10,2 × 12,8	24,0 × 16,5 × 29,9	10,4" ekran dotykowy	34,2 × 40 × 60,6	34,3 × 17 × 27,8

Porównywany parametr	Model sprzętu/system					
	Bio-Capture z/750	IBAC 1	IBAC 2	T-COR-8	AP4C FB	AP4C VB
Zasilanie	Baterie	Brak danych/ pokładowe	Baterie/ zasilacz	Baterie	24 VDC	24 VDC
Praca ciągła na baterii [h]	8	Brak danych	14 (4 ład.)	4	Czas pracy wod- ru: nieograniczo- ny (elektroliza)	Czas pracy wod- ru: 24 h (2 cylindry)
Mobilność	Ręczny, mobilny	Bezzałogowe statki powietrzne/ platformy zrobotyzowane	Ręczny, mobilny	Mobilny	Na sprzęcie (np. okręty, platformy, infrastruktura)	Na sprzęcie (po- jazdy rozpozna- nia, czołgi itp.)
Odporność/ klasa obudowy	Brak danych	Aluminium, IP66	IP66	Wzmocniony odpowiednio do warunków tere- nowych	Brak danych	Brak danych
Dodatkowe systemy	Brak	Brak	GPS	Kreator protoko- łów, czytnik ko- dów kreskowych	Dodatkowo (VCM) moduł wizualizacji i sterowania	Dodatkowo (VCM) moduł wizualizacji i sterowania
Dostępność w Polsce [2022]	TAK, RayTech	NIE	TAK, RayTech	TAK, RayTech	NIE	NIE

Porównywany parametr	Model sprzętu/system					R.A.P.I.D.
	MAB	ATHINA 100	ATHINA 200	ATHINA ABSS	JBPDS (BBSU)	
Przepływ [dm ³ /min]	Brak danych	2,4 (do 200)	2 (do 200)	-	-	-
Technologia	Spektrofotometria płomieniowa	UV-LED	UV-LED	UV LED LIF; PCR i testy immunologiczne	LIF lub technologie ortogonalne (RAAD), testy immunologiczne	UV-LIF, PCR
Czas (próbki)	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring	Zależny od operatora
Rozmiar próbki	-	6 ml	6 ml	-	-	-
Czas pomiaru/ analizy	Czas rzeczywisty	Brak danych	Czas ekstrakcji 1 min, czas alarmowania 90 s	Do 32 próbek po 10 testów w 2 h	Brak danych	Do 32 próbek w mniej niż 30 min
Wykrywane zagrożenie	Wirusy, bakterie, spory	Bakterie, wirusy, toksyny, zarodniki	Bakterie, wirusy, toksyny, zarodniki	Skażenia biologiczne	Skażenia biologiczne	Skażenia biologiczne
Temp. pracy [°C]	-10÷50	-10÷50	-10÷50	4÷37	-28÷50	4÷37
Czułość	-	100 ppl	200 ppl	Brak danych	Brak danych	-
Selektywność	2÷10 mikronów	1÷10 mikronów	1÷10 mikronów	Brak danych	Brak danych	-
Dodatkowe odczynniki	Brak	Brak	Brak	Brak danych	Brak danych	Tak
Masa [kg]	14	6,35	20,4	25÷50	28,4	22,7
Wymiary [cm]	16 × 30 × 89,5 (47)	33 × 23 × 18	Brak danych	Podręcznej walizki	76,2 × 91,4 × 50,8	26,6 × 36,3 × 49,2

Porównywany parametr	Model sprzętu/system					
	MAB	ATHINA 100	ATHINA 200	ATHINA ABSS	JBPDS (BBSU)	R.A.P.I.D.
Zasilanie	Pokładowe	Z pojazdu lub infrastruktury	Z pojazdu, infrastruktury lub z baterii	Przewodowe i bezprzewodowe	Pokładowe	Zasilacz
Praca ciągła na baterii [h]	Butle wodoru: 10 dni lub 48 h	-	> 12	4÷8	-	-
Mobilność	Na sprężenie (pojazdy rozpoznania, czolgi itp.)	Na sprężenie, stacjonarnie	Na sprężenie, stacjonarnie	Mobilny	Na pojeździe	Przenośny
Odporność/ klasa obudowy	Brak danych	IP66	Test: upadku MIL-STD-810, odporność na wibracje: MIL-STD-810 M.514.6; IP66	Odporny	Odporność na wibracje: MIL-STD-810E M. 514.4, test upadku: MIL-STD-810, test zakłóceń elektromagnetycznych: MIL-STD-461/462	Włókno węglowe, IP66, test upadku z 1 m i w trakcie pracy urządzeń z 15 cm, norma transport. MIL-STD-810E
Dodatkowe systemy	-	Ethernet	Ethernet, USB	Brak	Pokładowe	Microsoft® Windows® 7 Profesjonal, Intel® Core 2 Duo P8400, dysk 160 GB
Dostępność w Polsce [2022]	TAK	NIE	NIE	NIE	NIE	NIE

cd. tab. 2

Porównywany parametr	Model sprzętu/system				
	RAZOR EX	TAC BIO	TAC BIO 2	TAC 7	BioFlash
Przepływ [dm ³ /min]	-	1,2	1	1,2	480
Technologia	UV-LiE, RT-PCR	Spektroskopia molekularna, rozpraszanie dyfrakcyjne, fluorescencja	UV-LED, półprzewodnikowe źródła światła nadfioletowego (SUVOS)	Spektroskopia molekularna, UV rozpraszanie dyfrakcyjne, fluorescencja	CANARY™
Czas (próbkiowania)	Zależny od operatora	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring	Ciągły monitoring lub 60 cykli zebranych na BioDisc
Rozmiar próbki	0,1	-	-	-	-
Czas pomiaru/analizy	< 30 min	< 1 min	Brak danych	15 ÷ 30 s	3 min
Wykrywane zagrożenie	Zagrożenia biologiczne, wody, środowiska, żywności	Bakterie, wirusy, zarodniki, toksyny, brak inf. o rodzaju skażenia	Bakterie, wirusy, zarodniki, toksyny, brak inf. o rodzaju skażenia	Bakterie, wirusy, zarodniki, toksyny, brak inf. o rodzaju skażenia	Choroby, powszechne czynniki biologicznych, patogeny
Temp. pracy [°C]	0÷40	-20÷50	-15÷45	-40÷50	10÷40
Czułość	100 cfu/mL	100÷300 ACPLA w środowisku naturalnym i 20÷30 ACPLA w war. laboratoryjnych	-	100 ACPLA w środowisku naturalnym i 20÷30 ACPLA w war. laboratoryjnych	50 ACPLA
Selektywność	-	-	< 10 µm	0,5÷15 mikronów	-

Porównywany parametr	Model sprzętu/system				
	RAZOR EX	TAC BIO	TAC BIO 2	TAC 7	BioFlash
Dodatkowe odczynniki	Tak	Brak	Brak	Brak	Tak
Masa [kg]	4,9	4,4	2,3	4,5 (z baterią)	15,9
Wymiary [cm]	25,4 × 11,4 × 19	15,6 × 17,0 × 40	31,8 × 15,2 × 20,3	16 × 18 × 40	30,48 × 40,64 × 31,75
Zasilanie	Akumulator, zasilanie zewnętrzne	Pokładowe	Brak danych	Stacjonarnie lub na baterię, możliwość pracy z małym panelem słonecznym	Stacjonarnie/ pokładowe
Praca ciągła na baterii [h]	8 przebiegów na jedno ładowanie	-	-	> 24 na wymiennym akumulatorze	Brak danych
Mobilność	Przenośny	Pokładowy	Pokładowy	Mobilny/ pokładowy	Stacjonarnie i mobilnie w pojazdach
Odporność/ klasa obudowy	Włókno węglowe, IP66	Aluminiowa, odporna na czynniki przeskadzające i zakłócenia elektromagnetyczne	Odporna na war. atm. i wzmocnienie na zgodnie z rygorystycznymi specyfikacjami wojskowymi	Aluminiowa, odporna na czynniki przeskadzające i zakłócenia elektromagnetyczne	Brak danych
Dodatkowe systemy	Brak danych	Windows, Bluetooth	Brak danych	Bluetooth	16-kanalowy dysk
Dostępność w Polsce [2022]	NIE	TAK, Pimco	NIE	TAK, Pimco	TAK, Pimco

Źródło: [45]

6. Podsumowanie

W pracy opisano zagadnienia związane z problematyką detekcji i identyfikacji próbek, w których podejrzewa się obecność komponentów broni biologicznej. Wskazano, że problem występowania zakażeń biologicznych jest znany od wieków. Jest on związany zarówno z celowym działaniem, jak i naturalnie występującymi pandemiemi. Dodatkowo zwrócono uwagę, że w związku z niestabilną sytuacją na świecie rośnie prawdopodobieństwo użycia broni biologicznej w atakach terrorystycznych. Zagadnienia szeroko poruszane w pracy dotyczą procedur pobierania próbek do analiz biologicznych, technik ich przygotowania oraz metod analitycznych. Przedstawiono również dostępne na świecie urządzenia i zestawy do detekcji i identyfikacji patogenów. Skupiono się na wyjaśnieniu podstaw technologii zaimplementowanych w nowoczesnych detektorach skażeń biologicznych i kolektorach próbek aerozolu, tak aby użytkownikowi łatwiej było zrozumieć zasadę ich działania, a przez to możliwości, jakie stwarza dane urządzenie bądź system. Dzięki takiej wiedzy można również określić ograniczenia, jakie niesie ze sobą dana metoda detekcji, a także jej wiarygodność w zakresie poprawnego wykrycia i identyfikacji szkodliwych substancji biologicznych. Należy mieć na względzie cel i możliwości rozpoznania biologicznego, aby odpowiednio dostosować sprzęt, a co za tym idzie wykorzystaną technologię. Ogromną rolę odgrywają również warunki, w których nastąpi pobieranie próbek i ich analiza. Praca ta może przyczynić się do prostszego i trafniejszego podjęcia decyzji dotyczącej zakupu niezbędnego sprzętu w zależności od przewidzianego zadania. Jak pokazano, dzięki obecnemu rozwojowi technologii możliwa jest weryfikacja danego czynnika biologicznego nawet w warunkach polowych, przy wykorzystaniu urządzeń niewielkich rozmiarów. Miniaturyzacja sprzętu do detekcji i identyfikacji skażeń może w niedługim czasie doprowadzić do rozwinięcia technik umożliwiających wygodną i bezpieczną pracę z wykorzystaniem bezzałogowych statków powietrznych.

7. Wnioski

Pokazano złożoność tematyki zagadnień dotyczących broni biologicznej — od sposobów detekcji, weryfikacji obecności czynnika biologicznego, po podjęcie odpowiednich procedur i działań związanych z zabezpieczeniem ludności. Czynności wykonywane w trakcie pracy nad próbką można przedstawić za pomocą schematu na rysunku 33.



Rys. 33. Schemat postępowania od momentu pobierania próbek do jednoznacznej weryfikacji czynnika biologicznego i opracowania raportu. Opracowanie własne

Rozwój w zakresie sposobów pobierania próbek, technik ich przygotowania i możliwości analitycznych sprawił, że weryfikacja obecności czynnika biologicznego, jak i jego identyfikacja stały się bardziej wiarygodne, łatwiejsze i szybsze do określenia. Stanowi to ogromny krok naprzód w zakresie bezpieczeństwa biologicznego. Ciągły monitoring czystości powietrza pod względem biologicznym, a także sprawna i bezbłędna detekcja mają duże znaczenie w zwiększaniu świadomości sytuacyjnej oraz umożliwianiu odpowiednim władzom podjęcia właściwych decyzji w zakresie reagowania kryzysowego. Realne zagrożenie, jakie stanowi broń biologiczna, obliguje wszystkie państwa do posiadania urządzeń pozwalających na szybkie wykrycie

i identyfikację patogenów. Takie rozwiązanie pozwoliłoby na stworzenie światowego systemu bezpieczeństwa biologicznego. Kompatybilność sprzętu umożliwiłaby wymianę informacji i porównanie wyników analiz, co zapobiegałoby powielaniu wysiłków, zmniejszyłoby koszty prowadzonych badań i ułatwiłoby proces wdrożenia odpowiednich działań. Miałoby to bezpośredni wpływ na bezpieczeństwo żołnierzy i ludności cywilnej.

Artykuł był współfinansowany ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach realizacji projektu UGB 794/WAT/2022.

Artykuł wpłynął do Redakcji 5.07.2022. Zatwierdzono do publikacji 4.08.2022.

Monika Kuligowska <https://orcid.org/0000-0002-5112-3241>

Sławomir Neffe <https://orcid.org/0000-0002-2790-6449>

LITERATURA

- [1] LANDE J., *Największe epidemie w historii świata. Ospa, grypa, dżuma i cholera – największy zabójcy w historii ludzkości*, 20.02.2020, Historia.org, <https://historia.org.pl/2020/02/27/najwiece-epidemie-w-historii-swiate-ospa-grypa-dzuma-i-cholera-najwieksi-zabojcy-w-historii-ludzkości/>, [dostęp: 17.06.2022].
- [2] *Historia pandemii na świecie – koronawirus SARS-CoV-2 na tle innych pandemii*, Medicover.pl, <https://www.medicover.pl/o-zdrowiu/historia-pandemii-na-swiecie-koronawirus-sars-cov-2-na-tle-innych-pandemii,6788,n,168>, [dostęp: 17.06.2022].
- [3] PŁUSA T., JAHNZ-RÓŻYK K., *Broń biologiczna. Zagrożenie i przeciwdziałanie*, Medpress, Warszawa 2002.
- [4] ALEXANDER Y., HOENING M., *Superterroryzm biologiczny, chemiczny i nuklearny*, Bellona, Warszawa 2001.
- [5] JASIŃSKI K., *Kto pierwszy użył broni chemicznej?*, 10.08.2017, Rzeczpospolita, <https://www.rp.pl/historia/art2519661-kt-pierwszy-uzyl-broni-chemicznej>, [dostęp: 17.06.2022].
- [6] KOPEĆ R., *Zastosowanie broni biologicznej w konfliktach zbrojnych i atakach terrorystycznych*, Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis. Studia de Securitate et Educatione Civili IV, Folia 166, 2014, 49-71.
- [7] KONOPSKI L., *Historia broni chemicznej*, Bellona, Warszawa 2009.
- [8] CRODDY E.E., PEREZ-ARMENDARIZ C., HART J., *Broń chemiczna i biologiczna – raport dla obywatela*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2003.
- [9] LIS A., OLECH A.K., *Największe organizacje terrorystyczne na świecie: charakterystyka zagrożenia – modus ponens*, Wiedza Obronna, vol. 273, no. 4, 2020, DOI: <https://doi.org/10.34752/nacb-wd63>, [dostęp: 17.06.2022].
- [10] *Convention on The Prohibition of The Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction*, <https://front.un-arm.org/wp-content/uploads/2020/12/BWC-text-English.pdf>, [dostęp: 17.06.2022].
- [11] *Biological Weapons Convention*, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Biological_Weapons_Convention, [dostęp: 17.06.2022].

- [12] CHOMICZEWSKI K., GALL W., GRZYBOWSKI J.K., *Epidemiologia działań wojennych i katastrof*, wyd. 1, Alpha-Medica Press, Bielsko-Biała 2001.
- [13] CHOMICZEWSKI K., KOCIC J., SZKODA M.T., *Bioterroryzm. Zasady postępowania lekarskiego*, PZWL, Warszawa 2002.
- [14] CHOMICZEWSKI K., *Broń biologiczna jako narzędzie terroryzmu*, Zeszyty Naukowe Akademii Obrony Naukowej, 1(50)A, 2003, 57-64.
- [15] CHOMICZEWSKI K., *Zabezpieczenie Polski przed atakiem bioterrorystycznym*, Przegl. Epidemiol. 57, 2003, 365-366.
- [16] NATO Standard AEP-66 NATO Handbook for Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents (SIBCRA), Edition A, Version 1, Final Draft; North Atlantic Treaty Organization, Allied Engineering Publication Published by the NATO Standardization Agency (NSA).
- [17] ŁOŚ M., *Wykrywanie wirusów*, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Instytut Chemii Fizycznej PAN, Wydział III; <http://www.ifpan.edu.pl/nanobiom/ichf/ML2.pdf>, [dostęp: 17.06.2022].
- [18] GLIŃSKI Z., ŻMUDA A., *Chlamydie i chlamydofile człowieka i zwierząt*, Życie Weterynaryjne, 93, 12, 2018, 842-843, <https://www.vetpol.org.pl/dmdocuments/ZW-12-2018-03.pdf>, [dostęp: 17.06.2022].
- [19] PAWLIKOWSKA M., DEPTUŁA W., *Choroby u ludzi spowodowane chlamydiami i chlamydofilami*, Postępy Hig Med Dosw. (online), 61, 2007, 708-717.
- [20] TOMASIEWICZ K., *Rekomendacje postępowania w riketsjozach*, Przegl. Epidemiol. 69, 2015, 411-414.
- [21] MICHAŁIUK B., *Broń biologiczna, bioterroryzm – nowe oblicze uśpionego zagrożenia. Implikacje w dobie pandemii Covid-19*, Wiedza Obronna, vol. 273, no. 4, 2020, DOI : <https://doi.org/10.34752/zkj8-r612>, [dostęp: 17.06.2022].
- [22] PACZKOWSKA I., WÓJTOWICZ A., MALM A., *Wybrane aspekty farmakoterapii kandydoz*, Terapia i Leki, 66, 8, 2010, <https://www.ptfarm.pl/pub/File/Farmacja%20Polska/2010/08-2010/03%20%20Kandydozy.pdf>, [dostęp: 17.06.2022].
- [23] BILIŃSKI P., SEFERYŃSKA I., WARZOCHA K., *Diagnostyka i leczenie układowych zakażeń grzybiczych w onkohematologii*, Onkol. Prak. Klin., 4, 2008, 15-24.
- [24] KORZENIEWSKI K., *Cholera - choroba szczególnie niebezpieczna w krajach popularnych wśród turystów*, Varia Medica, 4, 1, 2020, 60-64.
- [25] KORZENIEWSKI K., *Wirusowe gorączki krwotoczne*, Forum Medycyny Rodzinnej, 6, 5, 2012, 205-221.
- [26] MAŁAJOWICZ J., KUŚMIEREK S., *Struktura i właściwości biologiczne rycyny – toksycznego białka rącznika pospolitego*, Postępy Biochemii, 65, 2, 2019, https://doi.org/10.18388/pb.2019_249, [dostęp: 26.06.2022].
- [27] RÓŻAŃSKA-GAMBAL B., *Występowanie epidemii ospy prawdziwej na świecie od czasów starożytnych po współczesne*, Medycyna Nowożytna, 15, 1-2, 2008, 31-59, <http://polona.pl/item/45316753>, [dostęp: 26.06.2022].
- [28] BARSKI D., SPODNIIEWSKA A., *Toksykologia weterynaryjna. Wybrane zagadnienia*, Olsztyn 2014.
- [29] ABRAMCZYK K., GAŁĄŻKA A., *Pałeczki Salmonella i Escherichia Coli jako realne zagrożenie zdrowia ludzi oraz jakości gleby*, Studia i Raporty IUNG-PIB, 54, 8, 2017, 73-82, DOI: 10.26114/sir.iung.2017.54.05, [dostęp: 26.06.2022].

- [30] KORPYSA-DZIRBA W., ROLA J.G., OSEK J., *Enterotoksyny gronkowcowe. Część I. Epidemiologia i znaczenie dla zdrowia publicznego*, *Życie Weterynaryjne*, 87, 8, 2012, https://www.vetpol.org.pl/dmdocuments/ZW_2012-08_%2010.pdf, [dostęp: 26.06.2022].
- [31] PODKOWIK M., SCHUBERT J., BANIA J., BYSTRON J., *Enterotoksyny gronkowcowe w żywności – nowe zagrożenia*, *Życie Weterynaryjne*, 90, 5, 2015, <https://vetpol.org.pl/dmdocuments/ZW-05-2015-09.pdf>, [dostęp: 26.06.2022].
- [32] NOWAKOWSKA E., MICHALAK S.S., *COVID-19 – choroba wywołana zakażeniem wirusem SARS-COV-2 globalnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego*, *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology*, 59, 3, 2020, 227-236, DOI: 10.21307/PM-2020.59.3.16, [dostęp: 26.06.2022].
- [33] *COVID-19 Data Repository by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University*, <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19> [Google; Statystyki COVID-19; <https://g.co/kgs/4LF47t>], [dostęp: 26.06.2022].
- [34] PARIDA M.M., DASH KUMAR PABAN, SHUKLA J., *Advance detection technologies for select bioterror agents*, Chapter 5 in: *Handbook on Biological Warfare Preparedness*, Elsevier Inc. 2020, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812026-2.00005-0>, [dostęp: 26.06.2022].
- [35] VISSER A. J.W.G., ROLINSKI O.J., *Basic Photophysics Laboratory of Biochemistry*, Microspectroscopy Centre Wageningen University, The Netherlands, Department of Physics, University of Strathclyde, Scottish Universities Physics Alliance, Photophysics Group, Glasgow, UK; <http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>, [dostęp: 17.06.2022].
- [36] ORZEŁ Ł., DĄBROWSKI J., *Zastosowanie pomiarów fluorescencji w biochemii i chemii bionieorganicznej*, Zespół Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej, Wydział Chemii UJ, <http://www2.chemia.uj.edu.pl/dydaktyka/Fluorescencja%20.pdf>, [dostęp: 17.06.2022].
- [37] ALIMOVA A., KATZ A., SIDDIQUE M., MINKO G., SAVAGE H.E., SHAH M.K., ROSEN R.B., ALFANO R.R., *Native fluorescence changes induced by bactericidal agents*, *IEEE Sens.*, J. 5, 4, 2005, 704-711, DOI: 10.1109/JSEN.2005.845521, [dostęp: 17.06.2022].
- [38] RAMANUJAM N., *Fluorescence Spectroscopy in Vivo*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, 20-56.
- [39] KALISZEWSKI M., WŁODARSKI M., KWAŚNY M., MEYŃCZAK J., KOPCZYŃSKI K., TRAFNY E., SZPAKOWSKA M., MULARCZYK-OLIWA M., BOMBALSKA A., ZAWADZKI Z., MIERCZYK Z., *Badanie i analiza widm fluorescencyjnych do identyfikacji potencjalnych czynników zagrożenia biologicznego*, *Biuletyn WAT*, 59, 2, 2010, 363-374.
- [40] FOX B.G., THORN R.M.S., ANESIO A.M., REYNOLDS D.M., *The in situ bacterial production of fluorescent organic matter; an investigation at a species level*, *Water Research*, 125, 2017, 350-359, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.040>, [dostęp: 17.06.2022].
- [41] HERMANOWICZ W., DOŻAŃSKA W., DOJLIDO J., KOZIOROWSKI B., *Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków*, Arkady, Warszawa, 1976, 27-28.
- [42] ADASZEK Ł., DZIĘGIEL B., MAZUREK Ł., WINIARCZYK S., *Zastosowanie techniki PCR w badaniach bakteriologicznych*, *Życie Weterynaryjne*, 93, 4, 2018, <https://www.vetpol.org.pl/dmdocuments/ZW-04-2018-05.pdf>, [dostęp: 29.01.2022].
- [43] CYNIAK-MAGIERSKA A., BRZEZIAŃSKA E., LEWIŃSKI A., *Łańcuchowa reakcja polimerazy – rodzaje, metodyka i zastosowanie*, *Endokrynol. Pol.*, 51, 2000, 159-167.
- [44] HINDSON C.M., CHEVILLET J.R., BRIGGS H.A., GALLICHOTTE E.N., RUF I.K., HINDSON B.J., VESSELLA R.L., TEWARI M., *Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR*, *Nature Methods*, vol. 10, 2013, 1003-1005.
- [45] KULIGOWSKA M., NEFFE S., *Najnowsze osiągnięcia w zakresie detekcji skażeń biologicznych na potrzeby sił zbrojnych – przegląd*, *Wojskowy Instytut Techniczny Uzbrojenia*, Zielonka, 2022.

M. KULIGOWSKA, S. NEFFE

Collection and Identification of Biological Samples Based on Military On-Site Detection Devices

Summary. Due to still current biological threats related to the activities of terrorist groups, crisis situations in many regions of the world, as well as cyclical epidemics, fast and reliable detection of biological contamination is an essential element of ensuring broadly understood safety of the population. The work deals with the sampling and verification procedures. This paper focuses on sample preparation techniques for analysis and details analytical methods for identifying biological agents. Additionally, on-site technologies implemented in military devices for the detection of biological contamination were discussed. The work enables the reader to get acquainted with modern techniques of detection of factors of biological origin and their identification, which is the knowledge necessary when choosing the appropriate equipment depending on the purpose of the contamination recognition sub-unit and the task at hand. Knowledge of sampling and preparation of samples for analysis will help to increase the skills of the sampling teams and to achieve reliable results by using appropriate procedures and eliminating the possibility of loss of the analyte or inadvertent contamination of the sample. It will also increase safety at every stage of working with biological samples. All these activities can contribute to the global increase in security of the population around the world.

Keywords: chemical sciences, biological weapon, bioterrorism, CBRN, PCR, UV-LIF

DOI: 10.5604/01.3001.0016.0545

