پروتکل نمونه گیری از افراد مواجهه یافته با عوامل شیمیایی و آنالیز نمونه ها

دانشگاه علوم پزشکی بقیة الله (عج)

قطب درمانی، آموزشی و پژوهشی آسیب های شیمیایی

پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت ها

مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی

گرد آوری

دکتر حسین خوش سفر

دکتر حسن باقری

مقدمه

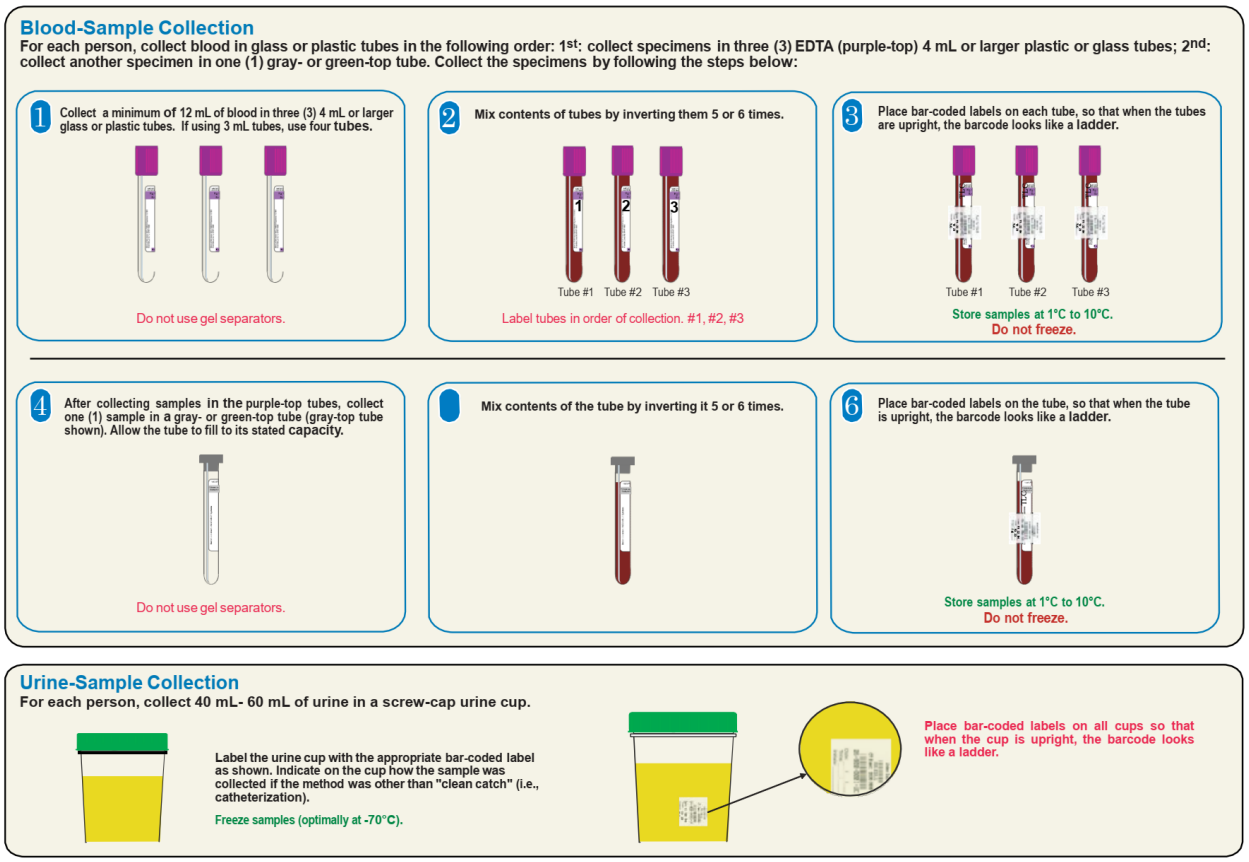
یک رویکرد جامع در قبال واکنش دولتها به یک تروریسم شیمیایی، شامل داشتن برنامه نه تنها برای مراحل مدیریت بحران و پیامدهای حادثه، بلکه جهت شفاف سازی تمام ابعاد رویداد است. این امر، ممکن است شامل ضرورت تعیین قطعی استفاده از عوامل شیمیایی، ارائه شواهد برای تأیید سایر تجزیه و تحلیل ها یا ارائه اثبات پزشکی قانونی مورد نیاز برای حمایت از تعقیب کیفری باشد. جمع آوری و آنالیز نمونه های زیست پزشکی شامل خون، ادرار یا سایر بافت های انسان یا حیوانات مبتلا، یکی از ابزارهای ارائه چنین اطلاعاتی است. اگرچه قابلیتهای فعلی مانند دفع تیودی گلیکول ادرار یا فعالیت کولین استراز پلاسما را می توان انجام داد، اما نیاز به روش های بسیار حساس تر و ویژه ای وجود دارد که بر محدودیتهای این روشها غلبه کند. استفاده از نمونه های زیست پزشکی، یک منبع اطلاعاتی منحصر به فرد و مکمل را در چنین تحقیقاتی فراهم می کند، به ویژه هنگامی که منابع اطلاعاتی دیگر (آنالیز نمونه های زیست محیطی) بی نتیجه هستند.

جمع آوری نمونه

آنالیز موفق نمونه های زیست پزشکی وابسته به نمونه گیری مناسب می باشد. انتظار می رود بهترین پاسخ از نمونه های حاصل شود که در کوتاهترین فاصله زمانی از آلوده شدن و از بیمارانی که بیشترین تماس را داشته اند، گرفته شده است.

بیشتر تحقیقات با استفاده از خون یا ادرار به عنوان نوع نمونه انجام شده است. اگرچه می توان از بافت های دیگر استفاده کرد، اما از خون و ادرار بیشتر استفاده می شود و به راحتی قابل دریافت از انسان و حیوان می باشد و تحقیقات معتبر فراوانی بر اساس آنها انجام شده است. آنالیز خون و ادرار مکمل یکدیگر هستند و دارای ویژگی های مختلفی هستند که ممکن است با سناریوها یا آزمایشگاه های مختلف سازگارتر باشند. به طور کلی، آنالیز ادرار روش ساده تری را ارائه می دهد، هزینه کمتری دارد و برای تشخیص در زمان‌های اولیه بعد از تماس با آلودگی، مناسب است. آنالیز خون که به عنوان مثال بر ترکیبات اضافی پروتئین متمرکز است، حساس تر بوده و در مورد نمونه هایی که مدت زمان بیشتری پس از حادثه گرفته شده است، نتیجه می دهد. در شکل زیر پروتکل نمونه برداری از افراد مشکوک آورده شده است.

پروتکل نمونه برداری



آنالیز نمونه های زیست پزشکی در مقایسه با آنالیز نمونه های زیست محیطی

الزامات کلی برای آنالیز نمونه های زیست پزشکی از بسیاری جهات شبیه به آنالیز نمونه های زیست محیطی است. فرایندها باید کاملاً مشخص، مقرون به صرفه و دارای اعتبار کافی باشند. نتایج بدست آمده باید دقیق باشد و بتواند با شفافیت تفسیر شوند. آزمایشگاه هایی که آزمایش ها را انجام می دهند باید روش های تضمین کیفیت / کنترل کیفیت را به خوبی مستند داشته باشند و فرایندهای منظمی را برای حفظ اعتبار کار خود انجام دهند. همه این عوامل در براورده شدن هدف اصلی که همانا به دست اوردن شواهدی مبنی بر وجود عوامل شیمیایی در نمونه هاست، تاثیر گذار هستند.

در مقایسه با رویکردهای فعلی OPCW برای آنالیز نمونه های زیست محیطی، آزمایشگا ههای مورد نیاز برای آنالیز نمونه های زیست پزشکی باید فراتر از آزمایشگاههای روتین باشد. روش های اعتباربخشی سختگیرانه تر خواهد بود و روش های مورد استفاده باید متمرکز بر نتایج با کیفیت بالا و کمترین حد تشخیص باشند.

خلاصه ای از نکات کلیدی در مورد "نمونه برداری و آنالیز نمونه های زیست پزشکی جهت تشخیص عوامل شیمیایی" در جداول زیر آورده شده است.

عوامل اعصاب

Sample type	Key biomarkers	Recommended analytical methods	Standards	Advantages	Disadvantages
Blood	Cholineste rase activity			Rapid, available in the field	Does not identify the OP; False positive results; Only relatively high levels of activity depression are detectable
Blood	Fluoride reactivation method Phosphorylated BuChE (+other proteins)	GC-MS GC-HR-MS With large volume injection;	Phosphonofluoridates i.s.: deuterated OP or plasma exposed to deuterated OP	Easily accessible internal standards and reference compounds; LOD ۱۰ pg/ml (۰,۰۵-۰,۱٪ BuChE inhibition)	Not applicable to all OP's
Blood	Analysis of phosphorrylated peptides: Phosphylated BuChE	LC-MS MS (after enzymatic digestion of modified cholinesterase.	Phosphylated nonapeptides; i.s. plasma exposed to CD۳-OP	Covers all OP's LOD: ۱-۵٪ BuChE inhibition	Expensive instrumentation and reference compounds
Urine /serum	Hydrolysis products: Alkyl methylphos pho-nic acids (does not include Tabun)	GC-MS MS LC-MS MS	(derivatized) alkyl methylphos phonic acids; i.s.: CD۳ analogues	High levels shortly after exposure. Easily accessible internal standards and reference compounds; LOD ۰,۲ – ۱ ng/ml	Relatively short window of detection

سولفورموستارد

Sample type	Key biomarkers	Recommended analytical methods	Standards	Advantages	Disadvantages
Urine	TDG TDGO β-lyase metabolites	GC-MS-MS LC-MS-MS	TDG TDGO β-lyase metabolites	Relatively easy synthesis of Analytical standards LOD:١ – ٠,١ng.ml	Short window for detection (max. ٢ wks) TDG and TDGO present in unexposed persons.
Blood	Protein adducts: N-terminal valine on Hb histidine residues on Hb. Cysteine residue on albumin Asp. Acid/gluta mic acid residues on blood proteins and keratin	Chemical or enzymatic digestion, followed by: GC-MS or GC-MS-MS LC-tandem MS LC-tandem MS GC-MS	PFP thiohydantoin of valine adduct i.s.: d٨-sulfur mustard-globin His-adducts I.s.: d٨-sulfur mustard globin Cys*-Pro-Phe i.s.: d٨-sulfur mustard plasma Thiodiglycol (derivatized); i.s.: d٨-thiodiglycol	Longer windowfor detection. Can be run on a benchtop GC MS LOD: ١٠٠ nM human blood, in vitro His adduct also present in proteins of other tissues Easy work-up of sample LOD: ١ nM human blood, in vitro Easy work-up of sample LOD: ٢٥nM	More demanding analytical methods. Laborious Laborious Alkylated tripeptide required as analytical standard
Urine **Blood**	DNA adducts: Alkylation of Deoxyguanosine (N٧) Alkylation of deoxyguano sine (N٧)	LC-MS-MS for N٧-HETE guanine ELISA assay for N٧-HET guanosine-٥'-phosphate	N٧-HETE guanine + d٨ derivative as i.s. Sulphur Mustard exposed DNA	Macromolecule present in all bodily tissues. Low cost LOD ٥٠ nM human blood in vitro	Shorter window for detection than protein adducts Monoclonal antibody required. Less specific than MS-based methods

لویسیت

Sample type	Key biomarkers	Recommended analytical methods	Standards	Advantages	Disadvantages
Urine	CVAA	Solid phase microextraction headspace sampling, followed by GC/MS with EI ionisation	Deuterated CVAA Phenylarsine oxide	LOD: ٥٠٠ ppt	Short window for detection. Lack of validation in human samples.
Blood	CVAA (globin bound and free)	GC-MS	As above	LOD: ١nM	As above

فسژن

Sample type	Key biomarkers	Recommended analytical methods	Standards	Advantages	Disadvantages
Blood	Protein adduct: Albumin peptide	LC-MS-MS	Whole blood treated with known phosgene concentrations	Specific and Sensitive LOD: ١uM	Standards not easily available

سیانید

Sample type	Key biomarkers	Recommended analytical methods	Standards	Advantages	Disadvantages
Blood	Protein adduct: Albumin peptide	LC-MS-MS	Whole blood treated with known phosgene concentrations	Specific and sensitive LOD: ١uM	Standards not easily available

BZ

Sample type	Key biomarkers	Recommended analytical methods	Standards	Advantages	Disadvantages
Urine	BZ, BA Q	LC-MS-MS	BZ, BA, Q	Rapid and sensitive LOD: ١ppb	Standards expensive and not easily obtainable

روش های متداول آنالیز

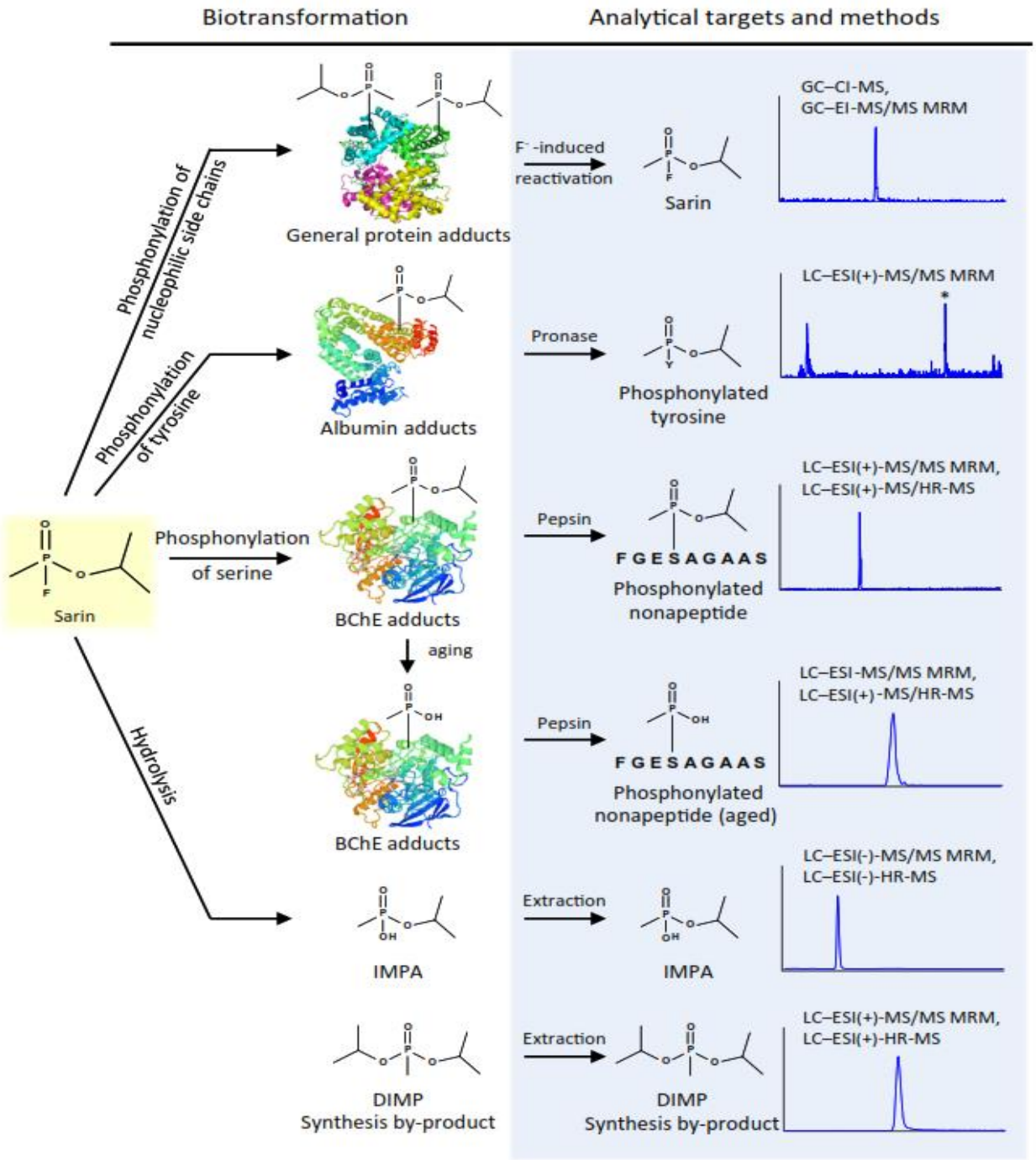
اغلب روش‌های کمی و کیفی که برای شناسایی عوامل اعصاب، تاول‌زا و تهوع‌آور، استفاده می‌شوند روش‌های آنالیزی GC، LC و CE می‌باشند.

کروماتوگرافی گازی یکی از پرکاربردترین روش‌های کروماتوگرافی برای ترکیبات فرار در سراسر جهان است که این امر به‌خاطر حساسیت بالا، گزینش‌پذیری و سهولت استفاده از آن می‌باشد. کروماتوگرافی گازی دوبعدی (GC-GC) برای نمونه‌های بسیار پیچیده محیطی استفاده می شود. این روش امکان جداسازی با قدرت تفکیک بالاتر را برای عوامل اعصاب از سایر گونه‌های مزاحم به‌وجود می‌آورد. همچنینامروزه دستگاه GC-MS برای شناسایی عوامل اعصاب بسیار رایج می‌باشد. دستگاه GC-MS با منبع یونیزاسیون بمباران الکترونی (EI) گونه‌ها و در نتیجه با شکست گسترده‌ی پیوندها، اطلاعات ساختاری مفیدی را به‌دست می‌دهد. GC-MS با استفاده از یونیزاسیون شیمیایی (Cl)، که یک روش نرم‌تر نسبت به روش بمباران الکترونی است، تعداد شکست‌های مولکولی را کاهش داده و اطلاعاتی راجع به جرم مولکولی به‌دست می‌دهد، در نتیجه به شناسایی بسیار حساس‌تر آنالیت‌های مورد نظر کمک می‌کند. مطالعات متعددی با به‌کارگیری روش‌های El و Cl ترکیب شده با GC-MS برای شناسایی عوامل اعصاب و محصولات ناشی از تجزیه آن‌ها انجام شده است. اکثر این آشکارسازها به‌طور ویژه برای نمونه‌های زیست‌محیطی طراحی شده‌اند. برای افزایش حساسیت و کاهش حد اندازه‌گیری، GC متصل شده به طیف‌سنجی جرمی‌جرمی (MS/MS) در مطالعات متعددی در آنالیز عوامل اعصاب مورد بررسی قرار گرفته است و MS به‌طور گسترده در تشخیص و آنالیز کمی عوامل اعصاب و محصولات ناشی از تجزیه آن‌ها استفاده می‌شود.

LC-MS یک روش مفید جایگزین برای GC-MS در بررسی محیط‌های آبی می‌باشد. عوامل اعصاب در ماتریس‌های زیست محیطی دچار هیدرولیز می‌شوند که شناسایی محصولات ناشی از تجزیه آن‌ها به اندازه شناسایی خود این عوامل حائز اهمیت است زیرا محصولات ناشی از تجزیه می‌توانند خطرناک‌تر از خود عوامل اعصاب CWA باشند. LC-MS علاوه بر شناسایی عوامل اعصاب اولیه موجود در ماتریس نمونه‌های محیطی، قادر به شناسایی محصولات غیرفرار حاصل از هیدرولیز این عوامل در یک آنالیز، بدون نیاز به آماده‌سازی نمونه و مرحله مشتق‌سازی در GC می‌باشد.

به عنوان یک نمونه، در ادامه به مشتقاتی که ممکن است در اثر واکنش های مختلف سارین ایجاد شود پرداخته شده است. پایداری محدود و واکنش پذیری بالای سارین مانع تشخیص سم سالم در داخل بدن می شود، بنابراین نیاز به جستجوی مشتقات پایدارتر و با دوام بیشتر است که از تبدیل‌های بیولوژیکی حاصل می شود. تبدیل های بیولوژیکی سارین در وهله اول شامل هیدرولیز به اسید ایزووپروپیل متیل فسفونیک است. سایر مسیرهای تبدیل به گونه های دیگر شامل اتصال به استیل کولین استراز، بوتیریل کولین استراز، آلبومین و سایر پروتئین های کمتر متداول می باشد که باعث ایجاد مشتقات مختلف می شود. مسیرهای مختلف در شکل نشان داده شده است.

تشکیل ترکیبات جدید براساس یک جایگزینی هسته دوستی اتفاق می افتد به طوری که گروهای ترک شونده عوامل اعصاب (فلورید) با گروه های هسته دوست شاخه جانبی آمینواسید (گروهای هیدروکسیل در استیل کولین استراز، بوتیریل کولین استراز و یا تیروزین در آلبومین) جایگزین می شود. ترکیبات حاصل از اتصال پروتیئن ها در مقایسه با ترکیبات حاصل از هیدرولیز، نیمه عمر بیشتری دارند (۲۱ روز برای آلبومین و حدود ۱۲ روز برای بوتیریل کولین استراز). این طول عمر طولانی امکان تشخیص موفقیت آمیز ترکیب سم، حتی اگر نمونه برداری چند روز پس از قرار گرفتن در معرض این عامل صورت گرفته باشد را فراهم می کند. بنابراین، این نشانگرهای زیستی بسیار ارزشمند و خاص هستند که برای آنالیزهای بعد از آلودگی ضروری هستند. توجه به این نکته ضروری است که ساختار گروه خارج شونده سم (F^- در سارین) قابل تشخیص نیست و به این معنی است که این نشانگرها تمایزی بین سارین، کلروسارین یا ارتوایزوپروپیل vx ندارند. در حالی که ترکیبات حاصل از هیدرولیز و همچنین مشتقات پروتئینی به عتوان نشانگرهای اختصاصی برای مسمومیت سارین پذیرفته شده اند.


Biotransformation
Analytical targets and methods
Phosphonylation of nucleophilic side chains
Phosphonylation of tyrosine
Phosphonylation of serine
Hydrolysis
Sarin
General protein adducts
Albumin adducts
BChE adducts
aging
BChE adducts
IMPA
DIMP
Synthesis by-product
F⁻-induced reactivation
Sarin
GC–CI-MS,
GC–EI-MS/MS MRM
Pronase
Phosphonylated tyrosine
LC–ESI(+)-MS/MS MRM
Pepsin
FGESAGAAS
Phosphonylated nonapeptide
LC–ESI(+)-MS/MS MRM,
LC–ESI(+)-MS/HR-MS
Pepsin
FGESAGAAS
Phosphonylated nonapeptide (aged)
LC–ESI-MS/MS MRM,
LC–ESI(+)-MS/HR-MS
Extraction
IMPA
LC–ESI(-)-MS/MS MRM,
LC–ESI(-)-HR-MS
Extraction
DIMP
Synthesis by-product
LC–ESI(+)-MS/MS MRM,
LC–ESI(+)-HR-MS

در ادامه تعدادی از روش های کارآمد که به صورت معمول برای تشخیص عوامل و یا مشتقات آنها مورد استفاده قرار می گیرد آورده شده است. روش های مذکور عموما برای نمونه های زیست پزشکی استفاده می شود و نوع نمونه های بکار رفته ذکر شده است.

Type of CWA	Type of metabolite	Sample preparation/ analytical technique	Sample/ matrix
sarin	O-isopropyl methylphosphonic acid (IMPA)	۱) LC–ESI(-)-MS/MS MRM ۲) LC–ESI(-)-HR-MS liquid chromatography (LC), electrospray ionization in negative mode (ESI-), mass Spectrometry (MS), multiple reaction monitoring (MRM), high-resolution mass spectrometry (HR-MS)	Blood, Hair, tissues from brain, breast fat, bronchus, eye, heart, kidney, liver, lung, muscle and skin
	fluoride-induced reactivation of protein-bound sarin	۱) GC–EI-MS/MS MRM ۲) GC–CI-MS Gas chromatography (GC), electron ionization(EI), chemical ionization (CI)	Blood, Hair, tissues from brain, breast fat, bronchus, eye, heart, kidney, liver, lung, muscle and skin
	analysis of human butyrylcholinesterase (hBChE) adducts	۱) LC–ESI(+)-MS/MS MRM ۲) LC–ESI(+)-MS/HR-MS	Blood

	analysis of tyrosine adducts	Micro LC–ESI(+)-MS/MS MRM	Blood
	Analysis of diisopropylmethylphosponate (DIMP)	١) LC–ESI(+)-MS/MS MRM ٢) LC–ESI(+)-HR-MS	Blood, hair, tissues.
Tabun	Isomer	GC–PCI-MS GC–MS assay with positive chemical ionization with ammonia	Heparinized swine whole blood
Tabun, sarin, VX	Fluoridate-induced regenerated nerve agent	GC×GC-TOF MS	Human plasma
Sarin, soman, RVX, VX	Ethyl methylphosphonic acid, isopropyl methylphosphonic acid, pinacolyl ethylphosphonic Acid, Isobutyl ethylphosphonic acid,	LC–MS-MS	Human urine
VX	Ethyl methylphosphonofluoridate	GC-MS-MS	blood
Organophosphate	dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), diethyl thiophosphate (DETP), diethyl dithiophosphate (DEDTP)	GC–MS	Human Hair

	methylphosphonic acid (MeP) adducts to human human utyrylcholinesterase (BChE)	UHPLC-MS/MS	blood
	nerve agent metabolites	LC–MS	Plasma and urine
	organophosphorus nerve agent adducts to human butyrylcholinesterase (BChE)	data-dependent, high-resolution tandem mass spectrometry (ddHRMS/MS)	serum
Sulfur mustard	١,١'sulfonylbis[٢methylthioe thane]	HPLC-MS/MS	human urine
	Adducts to human serum albumin	iquid chromatography–electrospray ionization high resolution tandem-mass spectrometry (LC–ESI HR MS/MS)	Human plasma
	β-lyase metabolites	LC-ESI-MS/MS	Human urine
	١,١'-sulfonylbis[٢S-(N-acetylcysteinyl)ethane]	LC-ESI-MS/MS	plasma and urine

Method and technique	Symbol	Principle	Multielement analysis	Applications	Other observations
Optical methods and techniques Atomic Absorption spectrometry	AAS	Absorption of radiant energy produced by a special radiation source (lamp), by atoms in electronic ground state	single-element technique multielement analysis (٢–٦ elements)	Widely used method, standard one	Most valuable technique for environmental heavy metals analysis
Inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry	ICP-AES	Measures the optical emission from excited atoms to determine analyte concentration	Simultaneous multielement analysis	Widely used method for Environmental trace analysis	
Inductively coupled plasma – mass spectrometry	ICP-MS	Argon plasma is used as ion source mass analysis is the method used for separating ions based on their mass-to charge ratio (m/z)	Simultaneous multielement analysis	Widely used also used for Isotope determination	Interferences arise when a species has the same nominal m/z as the analyte of interest
X-ray fluorescence	XRF	Uses X-rays as primary excitation source, usually provided by X-ray tubes, or radioisotopes, which cause elements in the sample to emit secondary X-rays of a characteristic λ	Simultaneous determination of most elements with the exception of those with atomic number below ٨	Less suitable for analysis of minor and Nondestructive analysis trace elements	Non-destructive analysis
Neutron activation analysis	NAA	Based on conversion of stable nuclei of atoms into radioactive ones and subsequent measurement of characteristic nuclear radiation emitted by the radioactive nuclei	Simultaneous multielement analysis	Most elements can be Determined with some Limitations such as for Pb	Highly sensitive procedure
Atomic fluorescence spectrometry Molecular Absorption spectrometry	AFS	Measures the light that is reemitted	single-element technique	Mercury, arsenic, and Selenium Speciation analysis	Complementary technique to AAS requires prior

(colorimetry)		after absorption Relationship between molecular absorption of UVVIS radiation by a solution and the concentration of the coloured species in solution			separation of the element to be determined
Electrochemical methods		Controlled variable: voltage or current polarography potentiometry voltammetry, anodic stripping voltammetry (ASV)	Consecutive analysis of distinct metal ions is possible	Speciation analysis for transition metals and metalloids	ASV advantage: select between different oxidation states of the same metal
Biochemical methods Immunochemical methods		Relies on an antibody that is developed to have a high degree of sensitivity to the target compound	Single element technique	Applicable to any pollutant for which a Suitable antibody can be generated	Highly selective and sensitive

جمع بندی

با توجه به مطالبی که در بالا ارائه شد به منظور تشخیص و اندازه گیری عوامل مختلف در نمونه های زیست پزشکی، تکنیک ها و تجهیزات متنوعی استفاده می شود که هر روش دارای جزئیات مختص به خود می باشد. در نتیجه به منظور تهیه دستورالعمل برای آنالیز این نوع نمونه ها، در وهله اول نیاز هست که نوع تجهیزات و دستگا ههای مورد استفاده مشخص شوند و سپس دستورالعلمل های مورد نیاز تدوین شود.