تولید آنتی‌سرم از شتر ایمن شده با ونوم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس: ارزیابی اثر خنثی‌سازی آن در موش

مهدی بهدانی[۱]
محمد حسینی نژاد چافی[۲]
سیروس زینلی[۱]، مرتضی کریمی پور[۱]
حسین خان‌احمد شهرضا[۳]
پوریا قاسمی[۴و۲]، نادر اسدزاده[۵]
عطیه غمناک[۲]، کامران پوشنگ باقری[۲]
حامد اهری[۶]، دلاور شهباززاده[۲*]

۱- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه پزشکی مولکولی، ۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، ۳- بخش ب ث ژ، واحد تولیدی، تحقیقاتی

انستیتو پاستور ایران

۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ۵- گروه اصلاح نژاد، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
۶- بهداشت مواد غذایی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
تهران، ایران

*نویسنده مسئول: تهران، میدان پاستور، خیابان ۱۲ فروردین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱ تلفن: ۶۶۴۸۰۷۸۰
email: shahbazzadeh@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۵/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: عقرب‌گزیدگی به‌عنوان یکی از مشکلات در سیستم بهداشت عمومی برخی از کشورهای دنیا از جمله ایران مطرح می‌باشد. در ایران سالیانه حدود ۳۰ هزار نفر گزیده می‌شوند که ۱۲٪ موارد گزش‌ها و ۹۵٪ موارد مرگ و میر مربوط به عقرب همیسکورپیوس لپتوروس می‌باشد. با توجه به این‌که سرم‌تراپی تنها راه درمان بیماران عقرب‌زده می‌باشد و این سرم‌ها از اسب تهیه می‌شود لذا ایجاد عوارض بیماری سرم در برخی از بیماران اتفاق می‌افتد. لذا در این مطالعه به‌بررسی قابلیت آنتی‌سرم شتری در خنثی‌سازی سم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در مدل موشی می‌پردازیم. ***روش بررسی:*** در این پژوهش به‌جای اسب از شتر که قرابت نزدیک‌تری با انسان دارد برای تهیه آنتی‌سرم ضد عقرب استفاده شد. برای این منظور دو نفر شتر با ونوم با سم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس ایمن شدند و در تست الایزا ایمن شدن شترها به اثبات رسید. سرم شترهای ایمن شده و نیز آنتی‌سرم حاصل از رسوب آمونیوم سولفات اشباع (SAS) از نظر خنثی‌سازی سم در بدن موش ارزیابی شد. ***یافته‌ها:*** سرم تهیه شده در حجم ۲۰۰ میکرولیتر و آنتی‌سرم حاصل از SAS در حجم ۴۰۰ میکرولیتر قادر است یک LD۱۰۰ از ونوم را خنثی نموده و از تلف شدن موش‌ها جلوگیری نماید. ***نتیجه‌گیری:*** آنتی‌سرم شتری که بر علیه سم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس به‌دست آمد، در مدل حیوانی قادر به خنثی‌سازی سم بوده و از مرگ موش‌هایی که با سم تلقیح شده بودند جلوگیری می‌نماید. با توجه به مزیت‌هایی که سرم شتر نسبت به سرم اسب دارد این آنتی‌سرم می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌سرم با منشاء اسب باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌سرم، شتر، ونوم عقرب، همیسکورپیوس لپتوروس.

مقدمه

عقرب‌گزیدگی (Scorpion envenomation) به‌عنوان یکی‌از مشکلات در سیستم بهداشت عمومی بسیاری از کشورهای دنیا مطرح است. بر اساس برآوردها حدود ۱/۲ میلیارد نفر در دنیا در مناطقی زندگی می‌کنند که احتمال عقرب‌گزیدگی وجود دارد، و سالیانه ۱/۲ میلیون نفر مورد گزش عقرب قرار می‌گیرند که حدود ۰/۲۷ درصد مرگ‌و میر را به‌همراه دارد.[۱] در ایران عقرب‌گزیدگی در ۱۱ استان کشور وجود دارد اما بیشترین درصد عقرب‌گزیدگی مربوط‌به استان خوزستان می‌باشد. سالیانه‌حدود ۳۰ هزار نفر در ایران گزیده می‌شوند که ۲۵ هزار مورد آن مربوط به استان خوزستان است. در میان ۲۵ گونه عقرب شناخته شده در ایران، شش گونه آن به لحاظ بهداشتی حائز اهمیت هستند: *Hemiscorpius lepturus*، *Mesobuthus eupeus*، *Odonthobuthus doriae*، *Buthotus (Hottentotta) saulcyi*، *Androctonus crassicauda* و *Buthotus (Hottentotta) schach* به عنوان شایع‌ترین عوامل عقرب‌گزیدگی در ایران مطرح می‌باشند. در میان این شش گونه، عقرب زرد خوزستان با نام علمی همیسکورپیوس لپتوروس *(Hemiscorpius lepturus)* یکی‌از شایع‌ترین و خطرناک‌ترین عقرب–های موجود در ایران می‌باشد.[۲] این عقرب ۱۲٪ گزش‌ها را تشکیل داده و ۹۵٪ موارد مرگ و میر را سبب می‌شود.[۳] همیسکورپیوس لپتوروس دارای سم سیتوتوکسیک بسیار قوی می‌باشد که منجر به ایجاد زخم‌های پوستی و التهاب بسیار شدید در ناحیه گزش می‌شود. همچنین عوارض شدیدی مانند همولیز و نیز مشکلات مفصلی نیز در گزیده‌شدگان مشاهده شده است، که همگی سبب شده‌اند تا این عقرب به‌عنوان یکی‌از

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-13]

عقرب‌های‌کشنده ایران مطرح باشد.[۴] سرم‌تراپی تنها راه درمان بیماران عقرب زده می‌باشد. در این روش بخش $F(ab')_2$ آنتی‌بادی پلی کلونال که از یک حیوان ایمن شده تهیه شده است به بیمار تلقیح می‌گردد. در ایران موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی این آنتی‌بادی‌ها را از اسب‌های ایمن شده تهیه می‌کند و در اختیار سیستم بهداشتی کشور قرار می‌دهد. با وجود آن که تهیه آنتی‌سرم عقرب از اسب که با انسان قرابت ژنتیکی زیادی ندارد، روش کلاسیک می‌باشد ولی در دهه‌های اخیر محققین به‌دنبال تولید آنتی‌سرم جایگزینی هستند که شوک ناشی از تزریق آنتی‌سرم در انسان را از بین ببرند. در چند ساله اخیر شتر به‌دلیل دارا بودن بعضی ویژگی‌های منحصر به‌فرد برای تولید آنتی‌سرم‌ها مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهش‌های گروه مویلدرمانس و همکاران نشان داده شد که آنتی‌بادی‌های شتر قرابت بسیار نزدیک‌تری با انسان دارند و در نتیجه احتمال واکنش‌های ایمنولوژیک ناشی از عوارض تزریق سرم حیوان به انسان را به‌شدت می‌توان کاهش داد.[۵-۸] هدف از این پژوهش بررسی ایمن‌سازی شتر با سم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس و به‌دست آوردن آنتی‌سرم با منشأ شتری می‌باشد. همچنین کارآیی و توانایی این آنتی‌سرم در خنثی‌سازی سم در مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات بنیادی کاربردی است که در سال ۸۹-۱۳۸۸ در مراکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران و تحقیقات علوم دامی کشور انجام شده است.

۱- تهیه ونوم: ونوم به‌کار رفته در این پژوهش از عقرب زرد خوزستان به‌دست آمده است که به‌روش الکتروشوک و مطابق پروتکل‌های سازمان بهداشت جهانی تهیه گردد.[۹] ونوم به‌صورت لیوفلیزه در آمده و جهت استفاده در آب مقطر حل شد. برای حذف موکوس و مواد اضافه موجود در ونوم، محلول توسط دستگاه هموژنایزر مخلوط گردید و سپس با دور بالا سانتریفوژ گردید. محلول شفاف بالایی که حاوی ونوم خالص است به لوله دیگر انتقال یافت و پس از اندازه‌گیری مقدار پروتیین با روش برادفورد مورد استفاده قرار گرفت. ۲- ایمن‌سازی شترها: در این پژوهش از دو شتر جوان و نر یک ساله استفاده شد. این شترها از نوع یک کوهانه و با نام علمی Camillus dromedaricus از روستای سفید کوه قم خریداری شد و تحت شرایط مناسب در مرکز تحقیقات علوم دامی کشور در کرج نگهداری شدند.

برای ایمن‌سازی شترها از زهر عقرب به‌همراه ادجوانت فروند استفاده شد. در تلقیح اول، زهر به‌همراه ادجوانت کامل فروند (Sigma-Aldrich) و در تلقیح‌های بعدی از ادجوانت ناقص فروند (Sigma-Aldrich) استفاده شد. مقادیر افزایش یابنده‌ای از ونوم به‌ترتیب ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰، ۲۴۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در طی شش مرتبه با فواصل زمانی ۱۴ روزه تلقیح گردید. تزریق‌ها به‌صورت زیر پوستی در ناحیه کشاله ران و گردن شترها در مناطقی که غدد لنفاوی فراوانی وجود دارند انجام شد. پس از پایان ایمن‌سازی از هر شتر حدود یک لیتر خون تهیه گردید و سرم از سایر اجزای خون جدا گردید و در فریزر ^{o}C ۷۰- نگهداری شد.

۳- بررسی ایمن شدن با تست الایزا: برای بررسی روند ایمن شدن در هر بار پیش از تلقیح آنتی‌ژن، از ورید وداج گردنی شترها خون‌گیری شد. در تست الایزا ونوم عقرب به‌میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ته پلیت الایزا قرار گرفت و توسط BSA عمل بلاکینگ انجام شد. پس از آماده‌سازی پلیت‌های الایزا سرم شترها در رقت‌های ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰ با PBS آماده شده و به هر چاهک ۱۰۰µlit اضافه گردید. پس از طی مدت زمان انکوباسیون یک ساعته و سه بار شستشو، به هر چاهک ۱۰۰µlit از Rabbit Anti-Camel با رقت ۱/۱۶۰۰۰ اضافه شد (این رقت در آزمایشگاه بهینه گردید، که اطلاعات آن نشان داده نشده است) و به‌مدت یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. چاهک‌ها سه مرتبه شستشو شده و به هر کدام ۱۰۰µlit (Sigma-Aldrich) Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate با رقت ۱/۵۰۰۰ اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت انکوبه شد. پس از سه بار شستشو و اضافه کردن ۱۰۰µlit سوبسترا (Sigma- TMB Aldrich) و متوقف کردن واکنش توسط اسید سولفوریک یک نرمال میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰nm قرائت شد.

۴- جداسازی آنتی‌بادی‌های شتر با روش آمونیوم سولفات اشباع شده (SAS): برای جداسازی آنتی‌بادی‌ها مطابق پروتکل استاندارد از آمونیوم سولفات اشباع شده استفاده شد.[۱۰] برای این منظور از رقت ۴۵٪ SAS با سرم در طی دو مرحله استفاده شد و برای الوشن نهایی از PBS استفاده شد. برای حذف آمونیوم سولفات، الوشن نهایی دیالیز گردید. برای آن‌که امکان مقایسه بین میزان کارآیی سرم و آنتی‌بادی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-13]

استخراج شده با روش SAS وجود داشته باشد، حجم الوشن نهایی مطابق با حجم سرم اولیه استفاده شده تعیین گردید.

۵- به‌دست آوردن مقدار LD۱۰۰ در موش‌های Balb/c: برای به‌دست آوردن غلظتی از زهر که در ۱۰۰ درصد موارد منجر به مرگ موش‌ها می‌گردد، ابتدا غلظت‌های افزایش یابنده‌ای از ونوم به‌ترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم به‌صورت داخل صفاقی به هر موش تلقیح گردید. پایین‌ترین غلظتی که منجر به تلف شدن موش شد، در یک جمعیت پنج‌تایی از موش‌های Balb/c تکرار گردید و چنانچه مرگ در هر پنج موش اتفاق افتاده آن غلظت به‌عنوان پایین‌ترین غلظت از ونوم که منجر به مرگ صد در صد موش‌ها می‌گردد یا LD۱۰۰ انتخاب گردید.

۶- به‌دست آوردن حداقل مقدار سرم برای خنثی‌سازی ونوم: برای بررسی قدرت خنثی‌سازی ونوم توسط آنتی‌سرم تهیه شده در شتر، مقادیر مشخصی از سرم و نیز آنتی‌سرم حاصل از SAS به یک LD۱۰۰ از ونوم اضافه شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ ^{o}C قرار گرفت. پس از این مدت مخلوط ونوم و آنتی‌سرم به‌صورت داخل صفاقی به پنج موش تلقیح گردید و تا یک هفته از نظر علایم و مرگ و میر بررسی شدند. در این تست حداقل میزان آنتی‌سرم لازم برای خنثی نمودن ونوم که مانع از تلف شدن موش باشد، مد نظر بود.

۷- به‌دست آوردن حداکثر زمان فاصله بین تلقیح سم و تزریق آنتی‌سرم: برای این منظور به موش‌ها یک LD۱۰۰ از ونوم تلقیح گردید و پس از زمان‌های ۰/۵، یک، دو و چهار ساعت از سرم شتر و نیز آنتی‌سرم حاصل از SAS به‌صورت داخل صفاقی تلقیح شد. موش‌ها از نظر علایم و مرگ تا یک هفته مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

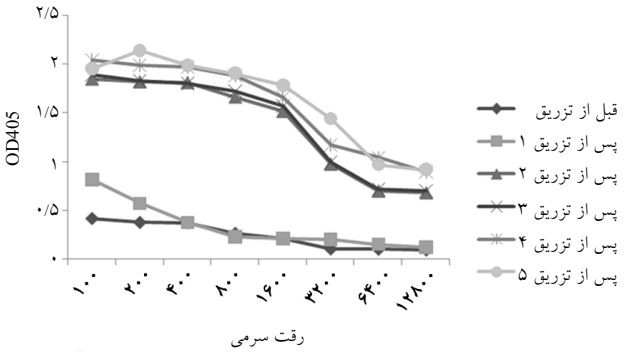
۱- بررسی روند ایمن‌سازی شترها: پیش از هر بار تلقیح ونوم عقرب از ورید وداج گردنی شترها خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جدا گردیده و سرم‌ها تا زمان انجام تست الایزا در فریزر ۷۰- ^{o}C نگهداری شدند. پس از آخرین تلقیح، سرم‌ها از فریزر خارج شده و بر روی آن‌ها تست الایزا انجام گرفت. روند پاسخ شترها نسبت به ونوم افزایشی بوده و به‌خوبی با آنتی‌ژن ایمن شده‌اند (نمودار ۱). در روند ایمن‌سازی میزان پاسخ پس از تلقیح دوم رو به افزایش گذاشته است و با تکرار تزریقات تفاوت چندانی ایجاد نشده است.

۲- جداسازی آنتی‌بادی‌ها با روش سولفات آمونیوم اشباع (SAS): در این روش می‌توان آنتی‌بادی‌ها را از سایر اجزای سرم جدا کرد. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است باند آلبومین تا حدود زیادی حذف گردیده است و غلظت آنتی‌بادی‌ها افزایش یافته است.

۳- تست‌های خنثی‌سازی سم در موش: در این آزمایش ابتدا حداقل غلظت سم که باعث کشته‌شدن ۱۰۰٪ موش‌ها (LD۱۰۰) می‌شود به دست آمد. در روش تلقیح داخل صفاقی مقدار LD۱۰۰ برابر ۲۰۰µg ونوم در موش Balb/c ۲۰ گرمی به‌دست آمد. در این غلظت هر پنج موش تلقیح شده پیش از ۴۸ ساعت با بروز علایم گوارشی (اسهال) و عصبی (لرزش) مردند. در سایر گروه‌ها که غلظت کمتری از سم را دریافت کردند برخی از موش‌ها تلف شدند و برخی زنده ماندند.

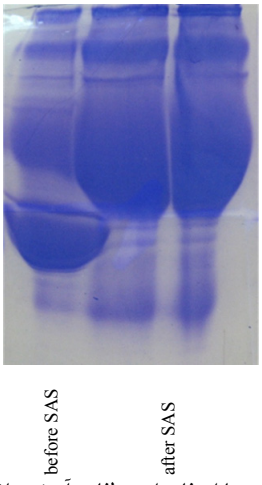
برای بررسی کارآیی آنتی‌سرم شتری تهیه شده در خنثی‌سازی ونوم عقرب غلظت یک LD۱۰۰ از ونوم همراه مقادیر مختلفی از سرم شتر و نیز آنتی‌بادی‌های تخلیص شده با روش SAS با هم مخلوط شده و پس از انکوباسیون نیم ساعته در ۳۷ ^{o}C به‌صورت داخل صفاقی به موش‌ها تلقیح گردید. مهمترین نتیجه‌ای که از این تست به‌دست آمد کارایی آنتی‌سرم تهیه شده از شتر در خنثی‌سازی ونوم عقرب بود، به‌طوری‌که در جدول ۱ مشخص است مقادیر بالاتر از ۲۰۰ و ۳۵۰ میکرولیتر به‌ترتیب از سرم شتر و آنتی‌بادی‌های تخلیص شده پس از SAS قادرند از مرگ هر پنج موش جلوگیری نمایند.

طولانی‌ترین زمانی که پس از تلقیح ونوم به موش‌ها می‌توان با تزریق آنتی‌سرم از مرگ موش‌ها جلوگیری نمود حدود دو ساعت است. در این مورد فاصله بین تلقیح ونوم و آنتی توکسین بسیار مهم است، به‌طوری که با افزایش مقدار آنتی‌سرم تفاوتی در نتایج ایجاد نمی‌شود.



نمودار-۱: روند افزایشی پاسخ ایمنی با تزریق زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در سرم خون شتر در تست الایزا

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-13]



شکل-۱: ترسیب سرم شتر با استفاده از سولفات آمونیوم اشباع (SAS)

جدول-۱: خنثی‌سازی ونوم عقرب همیسکورپیوس با آنتی‌سرم از شتر ایمن‌یافته

		تعداد موش تلف‌شده بعد از ۴۸ ساعت	تعداد موش زنده بعد از ۴۸ ساعت
حجم سرم شتر	۵۰	۵	۰
(میکرولیتر)	۱۰۰	۵	۰
	۱۵۰	۲	۳
	۲۰۰	۰	۵
حجم آنتی‌سرم	۲۰۰	۵	۰
پس از SAS	۲۵۰	۴	۱
(میکرولیتر)	۳۵۰	۱	۴
	۴۰۰	۰	۵

بحث

عقرب‌گزیدگی به‌عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در اغلب کشورهای در حال توسعه دنیا می‌باشد.[۱] در ایران نیز برخی از استان‌های کشور با این مشکل مواجه بوده و سالیانه حدود ۳۰ هزار نفر توسط عقرب گزیده می‌شوند.[۲و۳] استفاده از آنتی‌سرم‌های تهیه شده در حیوانات تنها درمان قطعی این بیماری تاکنون بوده است. در ایران آنتی‌سرم ضد عقرب از اسب تهیه گردیده و به‌صورت روتین در بیماران عقرب زده مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به این‌که اغلب افرادی که توسط عقرب گزیده می‌شوند در نواحی روستایی زندگی می‌کنند و امکان گزش مجدد توسط عقرب وجود دارد، به این جهت ممکن است یک فرد بیش از یک‌بار از آنتی‌سرم‌های اسبی استفاده نماید. در این مورد امکان ایجاد شوک آنافیلاکتیک افزایش می‌یابد که بعضاً سبب مرگ بیمار می‌گردد.[۱۱] لذا لزوم به‌کارگیری آنتی‌سرم‌های به‌دست آمده از حیواناتی که از نظر ژنتیکی دارای قرابت نزدیک‌تری با انسان باشند توجیه پیدا می‌کند. شتر یکی از حیواناتی است که از لحاظ ایمنوگلوبولین‌ها شباهت زیادی با انسان دارد و ایجاد واکنش‌های ایمنولوژیک مربوط به بیماری سرم کمتر محتمل است.[۱۲] ما در این پژوهش برای اولین‌بار از آنتی‌سرم ضد عقرب همیسکورپیوس لپتوروس با منشأ شتری استفاده نمودیم و نشان دادیم که این آنتی‌سرم قادر است زهر مهلک این عقرب را خنثی نماید. در این پژوهش نشان داده شد که شتر نیز همانند اسب توسط سم عقرب ایمن می‌شود و قادر است تیترهای بالایی از آنتی‌سرم را ایجاد نماید. در پژوهش مشابهی که برای ایمن‌سازی شتر توسط سم *Androctonus australis* hector انجام شد نتایج مشابهی به‌دست آمد.[۸] در تست‌های In vivo که به‌منظور بررسی کارآیی آنتی‌سرم شتری در خنثی نمودن سم انجام شد نشان داده شد که حجم مشخصی از سرم قادر است از تلف شدن موش‌هایی که با غلظت یک LD۱۰۰ از ونوم تلقیح شده بودند جلوگیری نماید. همچنین با روش آمونیوم سولفات اشباع (SAS) که یک روش متداول در جداسازی آنتی‌بادی‌ها می‌باشد، و به‌عنوان یکی از روش‌های مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی برای جداسازی آنتی‌بادی‌ها برای مصارف درمانی می‌باشد، آنتی‌بادی‌های مورد نظر جدا شدند و در آزمایش خنثی‌سازی از تلف شدن موش‌ها جلوگیری نمود. همان‌طور که در بخش نتایج اشاره شد میزان آنتی‌سرم پس از SAS برای خنثی‌سازی مقدار برابری از سم تقریباً دو برابر حجم مورد نیاز از سرم شتر می‌باشد، که علت آن می‌تواند مربوط به از دست رفتن بخشی از آنتی‌بادی‌ها در پروسه تخلیص باشد. در آزمایش دیگری که به‌منظور به‌دست آوردن حداکثر فاصله زمانی بین تلقیح سم و تلقیح آنتی‌سرم انجام گردید نشان داده شد که حداکثر فاصله زمانی بین تلقیح سم و آنتی‌سرم در موش‌ها دو ساعت می‌باشد و چنانچه پس از این مدت آنتی‌سرم به آن‌ها تلقیح گردد فاقد اثر بوده و منجر به تلف شدن موش‌ها می‌شود. تنها گزارشی که در ارتباط با استفاده از آنتی‌سرم شتری بر علیه سم عقرب وجود دارد توسط محققین تونسی انجام شده است و موفق به ایمن‌سازی شتر با سم عقرب *Androctonus australis* hector شده‌اند. نتایج این پژوهش نیز بیانگر خنثی نمودن موفق آنتی‌سرم شتری و جلوگیری از تلف شدن موش‌هایی بود که با سم عقرب تلقیح شده

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-13]

بودند.[۸] همچنین در گزارشی کاربرد آنتی‌سرم شتری در خنثی نمودن سم مار افعی مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج نشان داد این آنتی‌سرم قادر است از هموراژی ایجاد شده توسط سم مار در مدل موشی جلوگیری نماید.[۱۳] نتایج تحقیق ما نشان داد که آنتی‌سرم شتری که بر علیه سم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس به‌دست آمد، در مدل حیوانی قادر به خنثی‌سازی سم بوده و از مرگ موش‌هایی که با سم تلقیح شده بودند جلوگیری می‌نماید، و به‌نظر می‌رسد با توجه به مزیت‌هایی که سرم شتر نسبت به سرم اسب دارد می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌سرم‌های اسبی باشد. در ادامه این پژوهش جداسازی آنتی‌بادی‌های تک‌زنجیره‌ای شتری و بررسی قابلیت آن‌ها در خنثی‌سازی سم و نیز تهیه آنتی‌بادی منوکلونال بر علیه اجزای سم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس مد نظر می‌باشد.

References

1. Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop* 2008;107(2):71-9.
2. Shahbazzadeh D, Amirkhani A, Djadid ND, Bigdeli S, Akbari A, Ahari H, et al. Epidemiological and clinical survey of scorpionism in Khuzestan province, Iran (2003). *Toxicon* 2009;53(4):454-9.
3. Pipelzadeh MH, Dezfulian AR, Jalali MT, Mansouri AK. In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from Hemiscorpious lepturus scorpion. *Toxicon* 2006;48(1):93-103
4. Radmanesh M. Cutaneous manifestations of the Hemiscorpius lepturus sting: a clinical study. *Int J Dermatol* 1998;37(7):500-7.
5. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128(1-3):178-83.
6. Harmsen MM, Van Solt CB, Fijten HP, Van Setten MC. Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* 2005;23(41):4926-34.
7. Harmsen MM, van Solt CB, Fijten HP, van Keulen L, Rosalia RA, Weerdmeester K et al. Passive immunization of guinea pigs with llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease. *Vet Microbiol* 2007;120(3-4):193-206.
8. Meddeb-Mouelhi F, Bouhaouala-Zahar B, Benlasfar Z, Hammadi M, Mejri T, Moslah M, et al. Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing Androctonus australis hector scorpion toxins. *Toxicon* 2003;42(7):785-91.
9. World Health Organization. Proposed WHO guidlines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. 2008 Oct 13-17. Available from: URL:http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/index.html
10. Grodzki AC, Berenstein E. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol Biol* 2010;588:15-26.
11. Jackson R. Serum sickness. *J Cutan Med Surg* 2000;4(4):223-5.
12. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* 2001;74(4):277-302.
13. Harrison RA, Hasson SS, Harmsen M, Laing GD, Conrath K, Theakston RD. Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. *Toxicon* 2006;47(3):364-8.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-13]

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 5, Aug 2010: 268-273

Antiserum production in immunized camel by the venom of *Hemiscorpius lepturus* scorpion: evaluation of neutralizing test in vivo

Mahdi Behdani PhD.[1]
Mohammad Hosseininejad chafi BSc.[2]
Sirous Zeinali PhD.[1]
Morteza Karimipour MD, PhD.[1]
Hossein Khanahmad Shahreza MD., PhD.[3]
Pooria Ghasemi D.V.M.[2,4]
Nader Asadzadeh MSc.[5]
Atieh Ghamnak MSc.[2]
Kamran Pooshang Bagheri PhD.[2]
Hamed Ahari D.V.M.[6]
Delavar Shahbazzadeh D.V.M., PhD.[2*]

1- Biotechnology Research Center, Group of Molecular Medicine
2- Biotechnology Research Center, Medical Biotechnology Research Center
3- Department of BCG, Research-Production Branch

Pasteur Institute of Iran

4- Shahrekord Branch of Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
5- Department of Breeding, Animal Sciences Research Institute of Iran
6- Food Hygiene, Science and Research Branch of Islamic Azad University

Tehran, Iran

* Corresponding author: Pastur St., Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Tel: +98-21-66480780
email: shahbazzadeh@pasteur.ac.ir

Received: July 04, 2010 Accepted: July 26, 2010

Abstract

Background: Scorpion envenomation is considered as one of the Public Health problems in some countries in the world including Iran. Annually, approximately 30,000 scorpion stings happen in Iran from which 12% belongs to *Hemiscorpius lepturus* (special small closely spaced, bead-shaped jointed tail, similar in the shape to a cows tail, and is locally called ''gaodim'' (Gao, cow; dim, tail)) with 95% mortality. The main treatment is antiserum therapy which is produced in horse and is the only way to neutralize the venom. Due to the anaphylactic shock of the horse antiserum in some of the stung patients other source of antiserum is recommended. In this study the ability of produced camel antiserum in neutralizing the scorpion venom of *Hemiscorpius lepturus* was performed in Balb/c model.

Methods: Camel is an animal model that genetically is compatible with human genome utilized in this research to produce antiserum against scorpion venom. Two camels were used for immunization with the venom of *Hemiscorpius lepturus*. ELISA method was used to confirm the immunity. Antiserum was produced and used for neutralizing test. The precipitated antiserum with saturated ammonium sulfate (SAS) was also used to perform the neutralizing test in mice.

Results: The results indicated that the amount of 200 µl of antiserum and 400 µl of SAS antiserum were able to neutralize the amount of 1 LD100 of the venom and the survived the mice from death.

Conclusion: The result indicated that camel antiserum against scorpion venom is capable to neutralize the crude venom in mice model. Due to the safety of camel serum in human, it is suggested that the produced antiserum in camel can be substitute with the traditional horse antiserum in scorpion stung patients.

Keywords: Antiserum, camel, scorpion venom, *Hemiscorpius lepturus*.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-13]