

طراحی یک روش الایزای غیرمستقیم جهت غربالگری اسب‌ها بر اساس توانمندی تولید آنتی ونوم اختصاصی علیه کفچه مار ایرانی

• صدیقه خامه‌چیان (نویسنده مسئول)

بخش تحقیق و تولید سرم‌های درمانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۹-۰۳-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: ۰۸-۰۶-۱۴۰۰
Email: sedighehkhamehchian@yahoo.com



چکیده

در این مطالعه یک روش الایزای غیرمستقیم طراحی گردید تا تیتراژ آنتی‌بادی تولید شده در برابر سم مار کبری پس از هر مرحله تزریق اسب مورد سنجش قرار گیرد. به منظور ایمن‌سازی اسب‌ها از فراکسیون‌های سمی زهر مار ناجا ناجا اکسیانا به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. این روش امکان آن را فراهم می‌کند که بتوان افزایش مقدار آنتی‌بادی در پاسخ به تزریق سم را مورد بررسی قرار داد و از این طریق کارایی فرآیند ایمن‌سازی را ارزیابی کرد. به منظور طراحی الایزای غیرمستقیم، رقت‌های ۱/۵۰، ۱/۵۰۰ و ۱/۱۰۰۰ از سرم کنترل مثبت و سرم کنترل منفی بر علیه غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۲ $\mu\text{g}/\text{well}$ از سم استفاده شد. غلظت ۲ $\mu\text{g}/\text{well}$ از سم و رقت ۱:۱۰۰۰ از سرم برای ارزیابی آنتی ونوم انتخاب گردید. پس از راه‌اندازی سیستم الایزای، سرم‌های حاصل از خونگیری اسب‌ها مرحله به مرحله پس از تزریق سم مورد آزمایش قرار گرفت تا روند افزایش تیتراژ آنتی ونوم مورد ارزیابی قرار گیرد. میانگین جذب نوری سرم‌ها پس از تزریق سوم ۱/۲۱۳ بود؛ این مقدار ۵/۸ برابر میانگین جذب نوری نمونه‌ها پس از مرحله اول ایمن‌سازی است. تمامی اسب‌ها پس از تزریق پنجم به تیتراژ مناسبی از آنتی ونوم رسیدند. نتایج بدست آمده نشان داد که الایزای طراحی شده می‌تواند برای سنجش مقدار آنتی ونوم سرمی اسب‌ها به ویژه در ابتدای ایمن‌سازی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سم مار کبری، آنتی ونوم، الایزای.

• Veterinary Researches & Biological Products No 135 pp: 22-34

Development of an indirect ELISA for screening horses based on the potency of antivenom produced against Iranian Cobra snake

By: Khamehchian, S., (Corresponding Author) Department of Venomous Animals and Antivenom, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2021-06-09 Accepted: 2021-08-30

Email: sedighehkhamehchian@yahoo.com

In this study, an indirect ELISA test was developed for the determination of the level of antibodies against Cobra venom in equine sera after each injection step. Toxic fractions of *Naja naja oxiana* snake venom was used as antigen. The test allowed to reveal an increase of antibodies in response to the venom injection and it can be applied to the evaluation of the efficacy of immunization. To the development of the indirect ELISA, dilutions of 1/50, 1/500, and 1/1000 of positive and negative control sera against concentrations of 0.5, 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{well}$ of the venom were used. From this 2 $\mu\text{g}/\text{well}$ of venom and 1:1000 serum dilution was found to be sufficient enough for the estimate of antisnake antibodies. After ELISA development, serums obtained from blood samples of horses immunized with venom were tested to evaluate the trend of increase in antivenom titer at each stage of venom injection. The average optical density of samples after the third injection was 1.213; this is 5.8 times that of the horse samples behind the first step of immunization. All horses had an adequate antivenom titer after the fifth injection. The results suggest that ELISA can be used to determination of antivenom titer in horse sera especially during the initial stages of immunization.

Key words: Cobra snake venom, antivenom, ELISA.

تمام دنیا پذیرفته شده است (۱۸، ۱۹)، اما به دلیل محدودیت‌هایی نظیر هزینه بالا و استفاده از حیوان، استفاده از روش‌های برون تن (in vitro) قابل اطمینان همواره مورد توجه بوده است. بعلاوه روش استفاده از حیوان، بسیار پرزحمت، گران، و زمان بر می‌باشد (۲۰). بنابراین با توجه به جنبه‌های اقتصادی و اخلاقی این موضوع، لازم است از گزینه‌های جایگزین برون تن استفاده شود تا از یک طرف در مصرف هزینه و زمان صرفه‌جویی کرد و از طرف دیگر استفاده از حیوانات آزمایشگاهی را به حداقل تعداد ممکن کاهش داد (۸، ۹).

امروزه آزمایش‌های برون تن جهت غربال‌گری آنتی‌ونوم‌ها، در سراسر دنیا در حال اجرا می‌باشد (۵، ۱۷). انجام تست‌های برون تن آسان بوده و نتایج حاصل از آن نامتناقض و تکرارپذیر می‌باشد، درحالی‌که حصول این نتایج با استفاده از آزمایش‌های درون تن (in vivo) بسیار سخت می‌باشد (۱۰). تست برون تن همچنین می‌تواند برای برآورد فعالیت بیولوژیکی ونوم و آنتی‌ونوم نیز مورد استفاده قرار بگیرد (۱۳). از جمله تست‌های برون تنی که تاکنون گزارش شده، می‌توان به آزمون الایزا، سنجش رده سلولی (۱۰، ۱۱)، هم‌آگلوتیناسیون، سنجش‌های آنزیمی (پروتئیناز، فسفولیپاز A2)، سنجش میزان سمیت عصبی در محیط برون تن، و آنتی‌ونومیکس (۴) اشاره کرد که طبق اطلاعات موجود تاکنون هیچ‌یک از این روش‌ها به شکل متداول مورد استفاده قرار نکرده‌اند. با در نظر گرفتن این موضوع، روش الایزای جدیدی جهت برآورد توانمندی

مقدمه

مارگزیدگی یکی از مسائل بسیار مهم در بحث سلامت انسانی است که بویژه در کشورهای گرمسیری فقیرنشین مورد غفلت واقع شده است (۲، ۸). تعداد افرادی که در سراسر دنیا با این مسئله روبرو می‌شوند ۱/۸ میلیون نفر برآورد شده که از این تعداد سالیانه حدود ۹۴۰۰ نفر از بین می‌روند (۱۱). استفاده از آنتی‌ونوم تنها راه موثر در درمان مارگزیدگی است. تولید آنتی‌ونوم‌ها معمولاً در حیواناتی نظیر گوسفند و اسب صورت می‌گیرد. به این منظور حیوان مورد نظر با دوزهای غیرکشنده یک یا چند سم مختلف ایمن شده و در فواصل مشخص از آن خونگیری می‌شود. سپس آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده آن تخلیص شده و آنتی‌ونوم تولید می‌گردد. در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در زمینه افزایش توانمندی و دستیابی به آنتی‌ونوم‌ها صورت گرفته است (۶، ۷، ۲۱). یکی از مراحل مهم برای تولید آنتی‌ونوم پرتوان، انجام ایمن‌سازی موثر و صحیح می‌باشد.

اساس درمان با آنتی‌ونوم، خنثی‌سازی سم مار با سرم آنتی‌ونوم اختصاصی است. در حال حاضر کارایی آنتی‌ونوم‌ها از طریق برآورد میزان خنثی‌سازی اثر کشندگی سم در مدل‌های حیوانی به ویژه موش مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. اساس روش خنثی‌سازی، انکوباسیون مقدار مشخصی از سم با رقت‌های مختلف آنتی‌ونوم پیش از تزریق به حیوان است. اگرچه روش خنثی‌سازی سم به عنوان یک روش استاندارد در

بررسی پروتئین‌های موجود در سم مار کبری

جهت تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های سمی موجود در سم مار کبری، الکتروفورز (SDS-PAGE) (۱۵) آن پس از تعیین غلظت پروتئینی سم، تحت شرایط غیر احیایی و بر روی ژل ۲۰٪ پلی آکریل آمید انجام گردید.

طراحی الیزا

به منظور طراحی الیزا از یک آنتی ونوم اسبی که بر علیه سم مار کبری تهیه شده و توانمندی آن در تست درون تن خنثی‌سازی در بخش جانوران سمی موسسه رازی تأیید شده بود به عنوان نمونه مثبت و از سرم نرمال اسب به عنوان نمونه منفی استفاده گردید. سپس جهت تعیین غلظت و رقت بهینه‌ی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی، از آزمون صفحه متقاطع (چکربورد) استفاده شد. به همین منظور غلظت‌های مختلف سم (۱، ۰/۵) و $\mu\text{g}/\text{well}$ (۲) در مقابل رقت‌های مختلف آنتی‌بادی (۱/۵۰، ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰) از سرم منفی و مثبت) تیتر گردید.

ارزیابی میزان پاسخ‌های ایمنی با استفاده از الیزای غیرمستقیم

جهت جداسازی اسب‌هایی با پاسخ ایمنی ضعیف (نسبت به تزریق سم مار کبری) از اسب‌هایی با تیتر آنتی ونوم بالا از روش الیزای غیرمستقیم استفاده گردید.

روش انجام آزمون الیزا برای بهینه‌سازی رقت آنتی‌بادی و غلظت آنتی‌ژن و نیز آزمایش سرم‌های حاصل از خون‌گیری ۱۹ اسب یکسان می‌باشد.

تولید آنتی ونوم توسط اسب‌ها بعد از تزریق سم مار کبری (کفچه مار ایرانی) و خونگیری از آن‌ها، راه‌اندازی گردید تا بتوان به عنوان یک تست غربالگری اولیه از آن استفاده کرد و از تزریق نابجای اسب‌های کم توان یا ناتوان در تولید آنتی ونوم جلوگیری بعمل آورد.

مواد و روش‌ها

تهیه سم و نمونه‌های سرمی

سم مارکبری (*Naja naja oxiana*) به شکل محلول آماده که مخلوطی از فراکسیون‌های سمی F3 و F4 می‌باشد (۱) از بخش جانوران سمی موسسه سرم‌سازی رازی دریافت شد. همچنین سرم ۱۹ اسب (۱۰-۵ سال) در مراحل قبل از تزریق، پس از ۸ مرحله تزریق با سم مار و نیز یک مرحله استراحت به شکل آماده از بخش ایمن‌سازی و تهیه پلاسمای موسسه مذکور تهیه گردید. ایمن‌سازی اسب‌ها بر علیه سم مار کبری مطابق جدول ۱ صورت گرفته است و پس از انجام خونگیری از اسب‌ها در مراحل مختلف (قبل و بعد از تزریق سم مار کبری) سرم آن‌ها جدا گردیده و تا مرحله استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده است.

پروتئین‌سنجی به روش لوری (Lowry)

روش لوری یکی از متداول‌ترین روش‌های رنگ‌سنجی در تعیین میزان کلی پروتئین با حساسیت $1000-10 \mu\text{g}/\text{ml}$ می‌باشد (۱۶). غلظت پروتئینی فراکسیون‌های سمی زهر مار ناجا ناجا اکسیانا بر اساس این روش و با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد، اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- زمان بندی تزریق اسب‌ها بر علیه فراکسیون‌های سمی زهر مار کبری و خونگیری آن‌ها.

زمان بندی تزریق و خونگیری	تزریق	خونگیری
	-	سرم نرمال (خونگیری اولیه)
هفته اول	مرحله اول	-
هفته دوم	مرحله دوم	مرحله دوم
هفته سوم	مرحله سوم	مرحله سوم
هفته چهارم	مرحله استراحت	مرحله چهارم
هفته پنجم	مرحله چهارم	مرحله پنجم (خونگیری مرحله استراحت)
هفته ششم	مرحله پنجم	مرحله ششم
هفته هفتم	مرحله ششم	مرحله هفتم
هفته هشتم	مرحله هفتم	مرحله هشتم
هفته نهم	مرحله هشتم	مرحله نهم
هفته دهم	-	مرحله دهم

تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های سمی موجود در سم مار کبری

سم مار کبری از دو فراکسیون سمی (F3 و F4) تشکیل شده است که از مخلوط این دو فراکسیون به عنوان آنتی‌ژن در کف چاهک‌های پلیت الایزا استفاده شد. وزن مولکولی مخلوط این دو فراکسیون براساس الکتروفورز انجام شده، در محدوده ۲۰-۱۰ کیلودالتون قرار گرفت (شکل ۱). مطالعات انجام شده بروی فراکسیون‌های جداگانه F3 و F4 نشان داده است که این دو فراکسیون در بخشی از باندهای پروتئینی خود با یکدیگر تداخل دارند (۱) و این موضوع در الکتروفورز مخلوط فراکسیون‌های F3 و F4 در شکل ۱ کاملاً مشهود می‌باشد.

تعیین غلظت و رقت بهینه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در آزمون الایزا

با استفاده از غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن در برابر رقت‌های مختلف آنتی‌بادی در آزمون الایزا مشخص گردید که غلظت $2 \mu\text{g}/\text{well}$ از سم مار کبری و رقت $1/1000$ از سرم، مناسب‌ترین غلظت آنتی‌ژن و رقت آنتی‌بادی محسوب می‌شوند که در این نقاط بیشترین تفاوت جذب نوری بین سرم کنترل مثبت و منفی وجود دارد و می‌توان از آن‌ها برای تست سرم‌های خون‌گیری شده از ۱۹ اسب در آزمایش‌های بعدی الایزا استفاده کرد (شکل ۲).

تعیین تیتراژ آنتی و نوم سرم‌های خونگیری شده از اسب‌ها در مراحل**مختلف تزریق، در سیستم الایزا**

جهت تعیین تیتراژ آنتی و نوم سرم‌های حاصل از خونگیری اسب‌ها پس از مراحل مختلف تزریق، ابتدا سرم حاصل از خونگیری اولیه در سیستم الایزای طراحی شده مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص گردید که تیتراژ آنتی و نوم سرمی همه اسب‌ها کمتر از $0/1$ جذب نوری می‌باشد (شکل ۳-الف). تیتراژ آنتی و نوم سرم حاصل از تزریق اول (خونگیری مرحله دوم) در محدوده $0/3-0/14$ جذب نوری قرار گرفت (شکل ۳-ب)، در حالی‌که این مقدار برای سرم اسب‌ها پس از تزریق دوم به صورت قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۳-ج)؛ بالاترین جذب نوری ($0/93$) مربوط به اسب شماره ۱۳ و کمترین آن مربوط به اسب‌های شماره ۳ ($0/29$)، ۱۰ ($0/13$) و ۱۶ ($0/23$) بود. در چهارمین مرحله از خونگیری تیتراژ آنتی و نوم سرمی اسب‌ها روند افزایشی نشان داد بطوری‌که بالاترین جذب نوری معادل $1/44$ (مربوط به اسب شماره ۱۹) بود. تیتراژ سرم اسب شماره ۳ نیز به شدت افزایش یافت و به مقدار $1/22$ جذب نوری رسید؛ در حالی‌که این افزایش در اسب شماره ۱۶ کمتر بوده ($0/87$) و اسب شماره ۱۰ تقریباً بدون تغییر ($0/38$) باقی ماند (شکل ۳-د). در مرحله استراحت تیتراژ آنتی و نوم سرمی بعضی از اسب‌ها نسبت به مرحله قبل افزایش و بعضی کاهش نشان داد، اما میزان این افزایش و کاهش بسیار ناچیز بود بطوری‌که بیشترین افزایش جذب نوری ($0/33$) مربوط به اسب شماره ۱۰ و کمترین تغییر مربوط به اسب شماره ۹ بود که جذب نوری تغییری نکرده بود. در این مرحله تیتراژ آنتی و نوم سرمی اسب شماره ۱۶ با کمی کاهش (جذب نوری $0/75$) تقریباً معادل جذب نوری اسب شماره ۱۰ ($0/72$) قرار گرفت؛ با این وجود اسب شماره ۱۰ و ۱۶ در این مرحله نیز کمترین جذب نوری را نشان دادند (شکل ۳-ه). آزمایش سرم‌های حاصل از اولین تزریق بعد از استراحت (خونگیری مرحله ششم) نشان داد که

نشاندن آنتی‌ژن در کف پلیت (Antigen coating)

۱۰۰ میکرولیتر از غلظت بهینه سم مار کبری (مخلوط فراکسیون‌های سمی F3 و F4) تهیه شده در بافر کربنات 50 mM ($\text{pH}: 9/6$) به هر چاهک از میکروپلیت الایزا اضافه شد و به مدت یک شب در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس چاهک‌ها، ۴ مرتبه با بافر فسفات حاوی $0/05\%$ توئین ۲۰ (PBST) شستشو شدند. در زمان بهینه‌سازی غلظت آنتی‌ژن، از غلظت‌های مختلف سم مار استفاده گردید.

مسدودسازی (Blocking)

۳۰۰ میکرولیتر از بافر مسدودسازی (PBST) حاوی 5% شیر خشک بدون چربی یا Skim milk) در هر یک از چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد در انکوباتور انکوبه گردید. سپس چاهک‌ها ۴ مرتبه با بافر PBST شسته شدند.

رقیق‌سازی آنتی‌بادی (Antibody dilution)

۱۰۰ میکرولیتر از رقت بهینه آنتی‌سرم‌های تهیه شده در بافر رقت‌سازی (PBS) حاوی 2% Skim milk) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و پس از ۸۰ دقیقه انکوباسیون در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد، ۴ مرتبه با بافر PBST شستشو شدند. در مرحله بهینه‌سازی رقت آنتی‌بادی، از رقت‌های مختلف آنتی‌بادی در برابر غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن استفاده گردید.

افزودن کنژوگه و سوبسترا

۱۰۰ میکرولیتر از رقت $1/10000$ آنتی‌بادی ثانویه ضد ایمونوگلوبولین اسبی متصل به HRP (Sigma chemicals, USA) تهیه شده در بافر PBS به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. سپس میکروپلیت الایزا به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه و به دنبال آن ۵ بار شستشو شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط قرار گرفت. قبل از قرائت پلیت، 50 میکرولیتر از محلول متوقف کننده ($1\text{M}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$) به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و خوانش آن‌ها در طول موج 450 نانومتر صورت گرفت.

آنالیز آماری

گراف‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 ترسیم گردید. آزمایش‌ها حداقل دو بار تکرار شد و داده‌ها به صورت $\text{Mean}\pm\text{SD}$ بیان گردید. تمام آنالیزها با استفاده از GraphPad Prism (GraphPad Software, version 8.0) انجام شد. تفاوت معنی‌داری آماری (شاخص P -value) میانگین سطوح آنتی‌بادی در الایزا از طریق آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) محاسبه گردید.

نتایج**تعیین غلظت پروتئین سم مار کبری**

غلظت پروتئینی فراکسیون‌های سمی زهر مار کبری با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده براساس غلظت آلبومین سرم گاو، $4/26 \text{ mg/ml}$ تعیین گردید.

جذب نوری تمامی سرم‌ها بیش از ۱ بوده و بیشترین جذب نوری مربوط به اسب شماره ۱۳ (۱/۵۲) می‌باشد؛ با این وجود سرم اسب شماره ۱۰ و ۱۶ نسبت به سایر اسب‌ها از کمترین مقدار جذب برخوردار بودند (شکل ۳- و). تیتراژ آنتی‌ونوم سرمی اسب‌ها در دومین خونگیری پس از مرحله استراحت (خونگیری مرحله هفتم) در محدوده جذب نوری ۱/۵۸-۱/۲ قرار گرفت و جذب نوری سرم اسب‌های ۱۰ و ۱۶ به ۱/۴ افزایش یافت (شکل ۳- ز). جذب نوری سرم اسب‌ها در خونگیری مرحله هشتم (شکل ۳- ح)، نهم (۳- ط) و دهم (شکل ۳- ی) به ترتیب در محدوده ۱/۴۸-۱/۱۹، ۱/۰۸-۱/۴ و ۱/۰۹-۱/۳۹ قرار گرفت.

بحث

درمان مارگزیدگی با آنتی‌ونوم اختصاصی تنها درمان موثری است که تاکنون شناخته شده است. با این وجود تولید و سنجش کیفی آنتی‌ونوم، فرآیند پیچیده‌ای است که هنوز بطور کامل به نتیجه نرسیده است. هرچند کارهای ارزشمندی در راستای رفع این مشکل به انجام رسیده، اما تا به امروز تعیین اثربخشی آنتی‌ونوم، تنها بر پایه ی تست درون تن خنثی‌سازی استوار بوده است. بنابراین طراحی یک روش جایگزین برای سنجش توانمندی آنتی‌ونوم که بتوان آن را به جای تست سنتی و متداول درون تن بکار برد، بسیار ضروری بنظر می‌رسد. هدف اصلی این کار کاهش آسیب به حیوانات تحت آزمایش و یا اصلاح تست درون تن به گونه‌ای است که بتوان درد و ناراحتی حیوان را کاهش داد و یا بطور کلی از بین برد. بعلاوه تست‌های سنجشی برون تن علاوه بر اینکه اقتصادی هستند، از پیچیدگی و دشواری بسیار کمتر و حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار می‌باشد (۱۴).

تولید آنتی‌ونوم فرآیندی متشکل از چندین مرحله ایمن‌سازی است که طی آن تیتراژ آنتی‌بادی مورد نظر به حد مطلوب خود می‌رسد (۱۴). در هر مرحله از ایمن‌سازی لازم است توانمندی حیوان جهت تولید آنتی‌بادی مورد نظر تعیین شود. در مطالعه‌ی اخیر یک آزمون الیزای طراحی شد که بوسیله‌ی آن بتوان توانمندی تولید آنتی‌ونوم توسط اسب‌ها را در حین ایمن‌سازی با سم مار کبری ارزیابی کرد. به این دلیل ابتدا نمونه‌های سرمی ۱۹ اسب (در محدوده‌ی سنی ۱۰-۵ سال) طی ۸ مرحله تزریق از بخش جانوران سمی موسسه سرم‌سازی رازی دریافت گردید و میزان آنتی‌ونوم تولید شده در هریک از نمونه‌ها در سیستم الیزای طراحی شده سنجش گردید. گزارش‌های متعددی در مورد طراحی الیزای و بدست آوردن نتایج رضایت بخش در مورد آنتی‌بادی‌های سرمی بر علیه سموم مارهای گوناگون وجود دارد؛ اما هیچ‌یک از آن‌ها جزئیات الیزای را با دیدگاهی که بتوان آن را بصورت تستی متداول بکار برد، ارزیابی نکرده‌اند. کومار و همکارانش در سال ۲۰۱۴ یک سیستم الیزای غیرمستقیم را طراحی کردند تا بتوانند به وسیله آن توانمندی آنتی‌سرم پلی‌والان را آزمایش کرده و قابلیت آن را به عنوان یک تست غربالگری اولیه در حین فرآیند تولید آنتی‌ونوم تجاری مورد ارزیابی قرار دهند. این افراد پس از استاندارد و معتبرسازی الیزای، از این سیستم برای ارزیابی توانمندی آنتی‌ونوم تخلیص شده ضد سم مار کبری و آنتی‌ونوم پلی‌والان مار استفاده کردند. آن‌ها متغیرهای مختلفی را جهت تعیین غلظت‌های بهینه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و شرایط نشاندن آنتی‌ژن، مورد آزمایش قرار دادند و طبق توصیه‌های

سازمان بهداشت جهانی این روش را معتبرسازی نمودند. در نهایت حساسیت و ویژگی و تکرارپذیری نتایج حاصل از آن را تأیید کردند. همچنین این افراد نتایج بدست آمده از روش الیزای را با روش درون تن مقایسه کرده و نشان دادند که روش الیزای می‌تواند با دقت بسیار بالایی میزان آنتی‌بادی (علیه سم مار کبری) موجود در سرم را اندازه‌گیری کند و به عنوان یک تست غربالگری اولیه به جای تست درون تن در مراحل ابتدایی تولید آنتی‌ونوم مورد استفاده قرار بگیرد (۱۴). پژوهشگران ایرانی نیز در سال ۲۰۱۶ سیستم الیزای رقابتی را بر علیه سم پلی‌والان مار طراحی کردند تا به این طریق میزان اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و به دنبال آن قابلیت خنثی‌سازی سم توسط آنتی‌ونوم را اندازه‌گیری کنند. آن‌ها در این مطالعه نشان دادند که بین نتایج بدست آمده از سیستم الیزای طراحی شده و نتایج حاصل از تست خنثی‌سازی سم ارتباط معنی‌داری وجود دارد (۳). در سال ۲۰۱۸ نیز کینگ و همکارانش در کشور میانمار یک سیستم الیزای طراحی کردند که از این طریق بتوانند ظرفیت خنثی‌سازی سرم اسبی را بعد از ایمن‌سازی آن با سم مار *Daboia siamensis* ارزیابی کنند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روش الیزای طراحی شده از حساسیت و ویژگی لازم برای جایگزینی تست درون تن خنثی‌سازی سم در طول فرآیند ایمن‌سازی اسب برخوردار است (۱۱). البته آن‌ها به محدودیت‌های روش الیزای جهت جایگزینی تست درون تن نیز اشاره کرده و متذکر شده‌اند که اگر چه همبستگی خوبی بین نتایج الیزای و تست درون تن وجود دارد، اما این‌ها یکسان نیستند. یکی از دلایل موضوع آن است که جایگاه‌های شناسایی آنتی‌ونوم که می‌تواند به فعالیت خنثی‌سازی سم در موش مرتبط باشد، ممکن است در سیستم الیزای به صورت کامل در معرض آنتی‌ژن قرار نگیرند؛ همچنین این امکان وجود دارد که آنتی‌ونوم در سیستم الیزای بتواند جایگاه‌های آنتی‌ژنیکی را بروی سم شناسایی کند که به فعالیت خنثی‌سازی سم توسط آن در بدن موش ارتباطی نداشته باشد (۱۲).

در این مطالعه برای راه‌اندازی الیزای و تعیین غلظت مناسب آنتی‌ژن و رقت بهینه آنتی‌بادی، از رقت‌های مختلف نمونه‌های کنترل مثبت و منفی پلاسما بر علیه غلظت‌های مختلف مخلوط فراکسیون‌های سمی F3 و F4 استفاده شد؛ غلظت ۲ $\mu\text{g}/\text{well}$ از سم به عنوان آنتی‌ژن و رقت ۱/۱۰۰۰ از سرم به عنوان آنتی‌بادی انتخاب گردید. در این نقاط بیشترین تفاوت جذب نوری بین سرم مثبت و منفی مشاهده گردید. سپس سرم ۱۹ اسب خونگیری شده، طی ۱۰ مرحله توسط تست الیزای مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تقریباً تیتراژ آنتی‌ونومی تمامی اسب‌ها به جز دو اسب (اسب شماره‌ی ۱۰ و ۱۶) پس از سومین تزریق به تیتراژی خود بسیار نزدیک می‌باشد. تیتراژ آنتی‌ونوم اسب شماره‌ی ۳ نیز تا دومین تزریق بسیار به تیتراژ آنتی‌ونومی اسب‌های ۱۰ و ۱۶ نزدیک بود، در حالی که پس از تزریق سوم، به یک جهش ۴/۱۸ برابری نسبت به تزریق دوم خود رسید. این در حالیست که اسب شماره‌ی ۳، ۹ ساله و اسب‌های شماره‌ی ۱۰ و ۱۶ به ترتیب ۷ ساله و ۶ ساله بودند و پس از تزریق پنجم به تیتراژی خود رسیدند. به نظر می‌رسد که عامل سن به تنهایی نمی‌تواند در افزایش یا کاهش تیتراژ آنتی‌ونوم تأثیرگذار باشد. میانگین مجموع جذب نوری آنتی‌ونوم ۱۹ اسب پس از تزریق سوم ۱/۲۱۳ بوده که نسبت به میانگین مجموع جذب نوری تزریق اول، ۵/۸

ward the 3Rs Principles. *Frontiers in Immunology* 11: 617429.

5. Gutierrez J.M. G. Rojas and L. Cerdas. 1987. Ability of polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*. A new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon* 25: 713-720.
6. Gutierrez J.M. D. Williams H.W. Fan and D.A. Warrell. 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* 56: 1223-1235.
7. Harrison R.A. D.A. Cook C. Renjifo N.R. Casewell R.B. Currier and S.C. Wagstaff. 2011. Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. *Journal of Proteomics* 74: 1768-1780.
8. Harrison R.A. A. Hargreaves S.C. Wagstaff B. Faragher and D.G. Laloo. 2009. Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3: e569.
9. Hendriksen C.F. 2002. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. *ILAR Journal* 43: S43-S48.
10. Heneine L.D.G. A.D. Carvalho C.F. Barbosa and M.R.A. Dos Santos. 1998. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antithrombotic antivenom. *Toxicon* 36: 1363-1370.
11. Kasturiratne A. A.R. Wickremasinghe N. de Silva N.K. Gunawardena A. Pathmeswaran R. Premaratna L. Savioli, D.G. Laloo and H.J. de Silva. 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine* 5: e218.
12. Khaing E.M. P.R. Hurtado E. Hurtado A. Zaw J. White D.A. Warrell S. Alfred M.A. Mahmood and C.A. Peh. 2018. Development of an ELISA assay to determine neutralising capacity of horse serum following immunisation with *Daboia siamensis* venom in Myanmar. *Toxicon* 151: 163-168.
13. Kumar B.K. S.S. Nanda P. Venkateshwarlu Y.K. Kumar and R.T. Jadhav. 2010. Antisnake venom serum (ASVS). *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 1:76-89.
14. Kumar S. S. Kumar Y. Behl and R.K. Gupta. 2014. Development and standardization of ELISA as pre-screen test for the potency estimation during commercial production of antisnake venom serum (ASVS). *American Journal of Biomedical Sciences* 6: 20-31.
15. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
16. Lowry O.H. N.J. Rosbrough A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

($P < 0/05$) و نسبت به تزریق دوم یک افزایش ۱/۹۵ برابری ($P < 0/05$) نشان داد. در حالی که میانگین جذب نوری پس از سه تزریق اول بعد از دوره استراحت نسبت به آخرین تزریق پیش از مرحله استراحت (تزریق سوم) افزایش بسیار ناچیزی نشان داد و حتی پس از تزریق هفتم و هشتم کاهش یافت؛ بنابراین در مورد اکثر اسبها می‌توان تنها با تزریق سوم به تیتراژ آنتی‌ونوم خوبی برعلیه سم مار کبری دست یافت و به این ترتیب می‌توان هم در مصرف سم صرفه‌جویی کرد و از طرف دیگر تا حد ممکن از ایجاد اثرات جانبی تزریق در اسب، جلوگیری بعمل آورد. نتایج بدست آمده نشان داد که می‌توان روش الیزا را به عنوان یک تست غربالگری برای سنجش توانمندی اسبها در تولید آنتی‌ونوم استفاده کرد. کاربرد روش الیزا بیشتر در مراحل اولیه ایمن‌سازی حائز اهمیت است؛ زیرا تشخیص اسبهایی که به ایمن‌زایی پاسخ نمی‌دهند و یا پاسخ ضعیفی می‌دهند، ضروری است. در روش الیزا می‌توان مقادیر بسیار اندک آنتی‌بادی را نیز تشخیص داد، در حالی که تشخیص آنتی‌بادی در مراحل اولیه ایمن‌سازی با روش سنتی درون تن، سخت می‌باشد. همچنین عدم ایمن‌سازی حیوانی که به تولید آنتی‌ونوم پاسخ نمی‌دهد، از نظر اخلاقی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با در نظر گرفتن این عامل می‌توان به مقدار زیادی در هزینه و زمان صرفه‌جویی کرد (۱۴).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه‌ی اخیر نشان می‌دهد که روش الیزا را می‌توان برای سنجش توانمندی اسبها در تولید آنتی‌ونوم در مراحل اولیه ایمن‌سازی استفاده کرد، در حالی که تست خنثی‌سازی درون تن را می‌توان تنها در مراحل پایانی تولید آنتی‌ونوم استفاده کرد. هرچند مطالعات کنترل شده‌تر، بسیاری از مسائل را روشن‌تر خواهد کرد و مسیر را برای پذیرش این موضوع باز خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

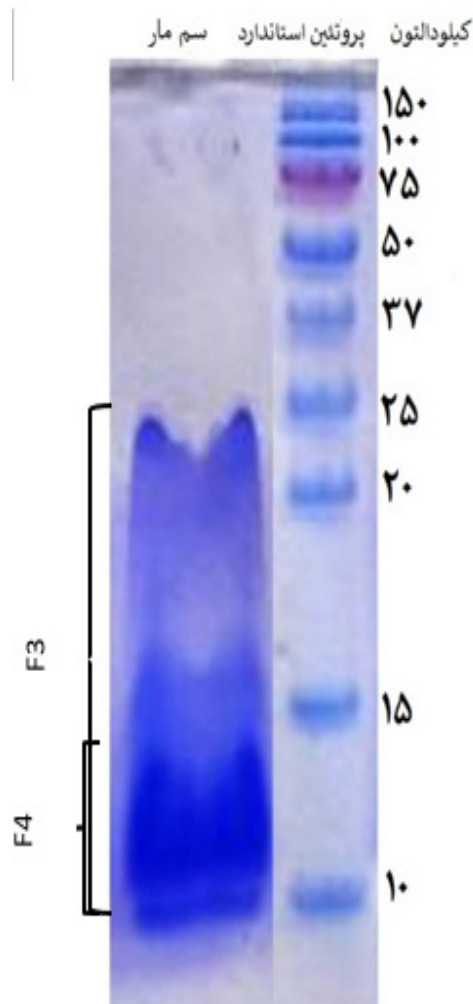
از پرسنل موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به خاطر یاری ایشان در انجام مراحل مختلف این مطالعه سپاسگزارم.

منابع مورد استفاده

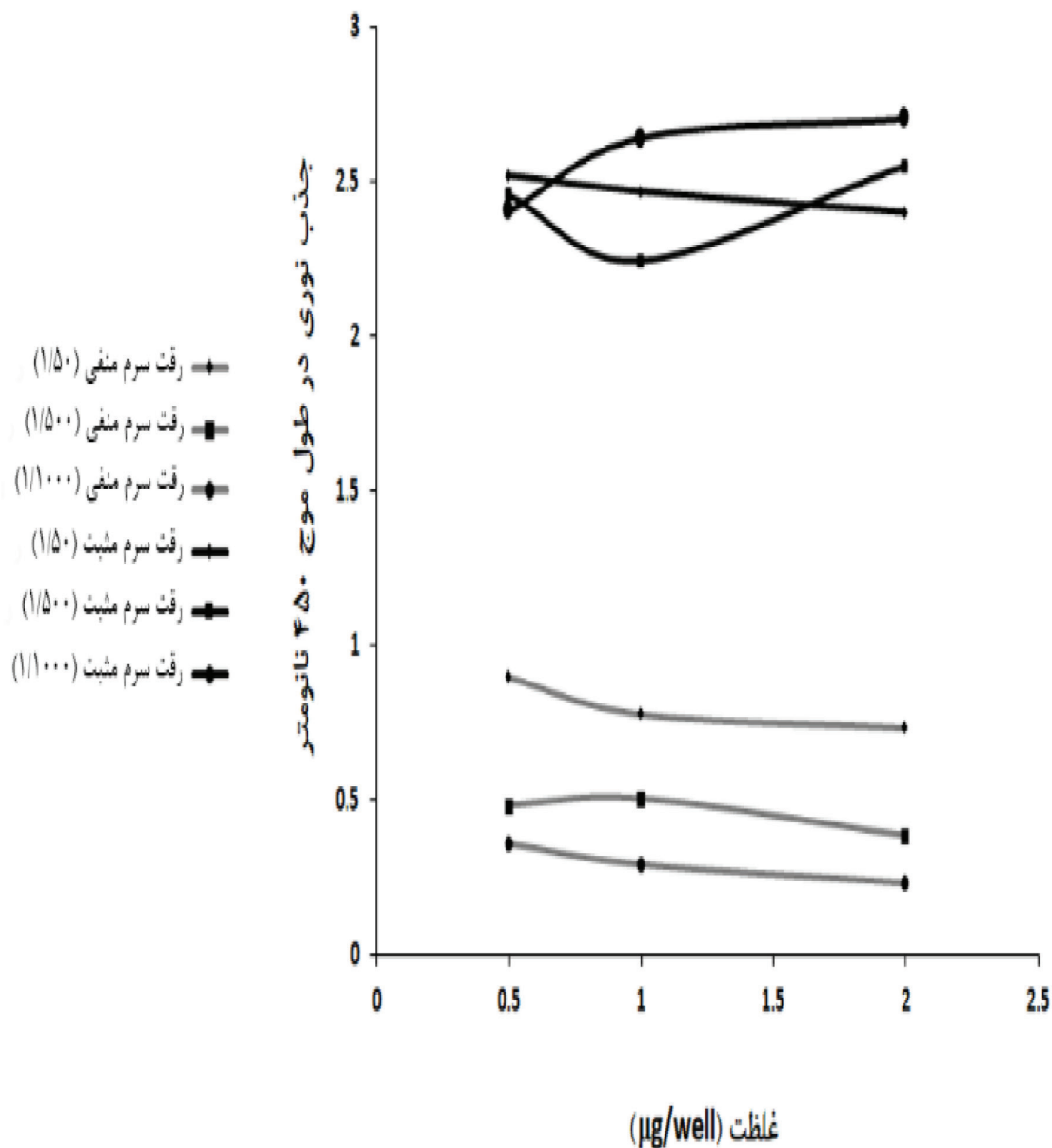
1. Akbari A. H. Rabiei A. Hedayat N. Mohammadpour H. Zolfagharian and S.H. Teymourzadeh. 2010. Production of effective antivenin to treat cobra snake (*Naja naja oxiana*) envenoming. *Archives Razi Institute* 65: 33-37.
2. Chippaux J.P. 2011. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. *Toxicon* 57: 586-599.
3. Golchinfar F. R. Madani T. Emami H. Zoulfagharian A. Zare and N. Mouhammadpour. 2016. Designing a competitive ELISA for evaluation of anti-snake venom serum potency. *Veterinary Researches and Biological Products* 29: 9-16.
4. Gutiérrez J.M. M. Vargas Á. Segura M. Herrera M. Villalta G. Solano A. Sánchez C. Herrera and G. León. 2021. In Vitro Tests for Assessing the Neutralizing Ability of Snake Antivenoms: To-

17. Theakston R.D.G. 1983. The application of immunoassay techniques, including ELISA, to snake venom research. *Toxicon* 21: 341-352.
18. WHO. 2010. Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins.
19. WHO. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms.

20. WHO. 1980. WHO coordination meeting on venoms and antivenoms.
21. Williams D.J. J.M. Gutierrez J.J. Calvete W. Wuster K. Ratanabanangkoon O. Paiva N.I. Brown N.R. Casewell R.A. Harrison P.D. Rowley M. O'Shea S.D. Jensen K.D. Winkel and D.A. Warrell. 2011. Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *Journal of Proteomics* 74: 1735-1767.



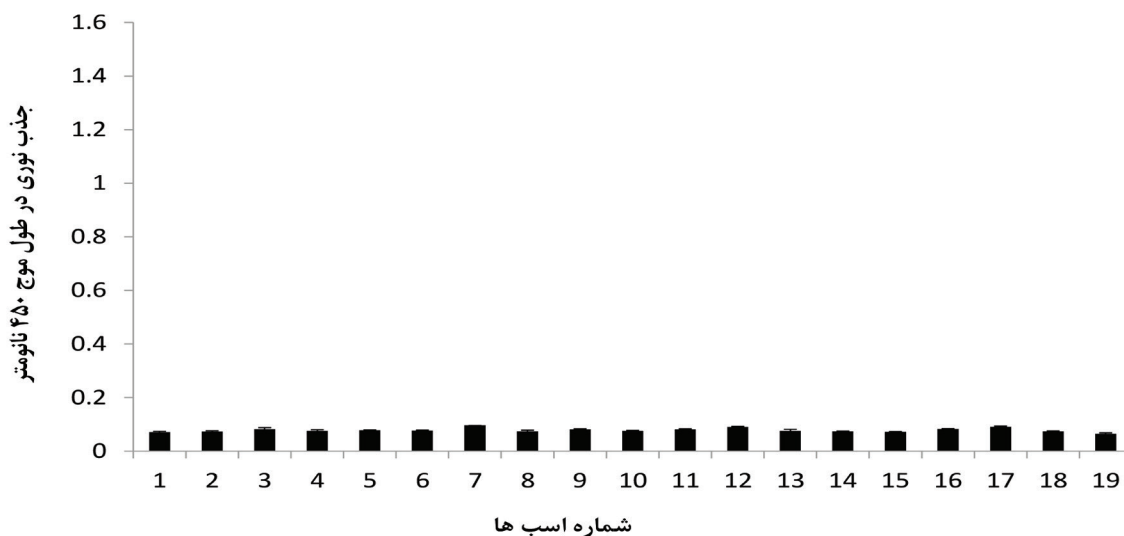
شکل ۱- الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین استاندارد و سم مار کبری بروی ژل آکریل آمید ۲۰٪ در شرایط غیر احیایی. وزن مولکولی فراکسیون های سمی موجود در سم مار کبری (F3 و F4) در محدوده ۲۰-۱۰۰ کیلو دالتون قرار گرفت.



شکل ۲- تعیین غلظت بهینه آنتی ژن (مخلوط فراکسیون های سمی F3 و F4 زهر مار کبری) و رقت مناسب آنتی سرم (سرم کنترل منفی و مثبت). در غلظت ۲ µg/well از آنتی ژن و رقت ۱/۱۰۰۰ از آنتی بادی، بیشترین تفاوت جذب نوری بین سرم کنترل مثبت و منفی وجود داشت.

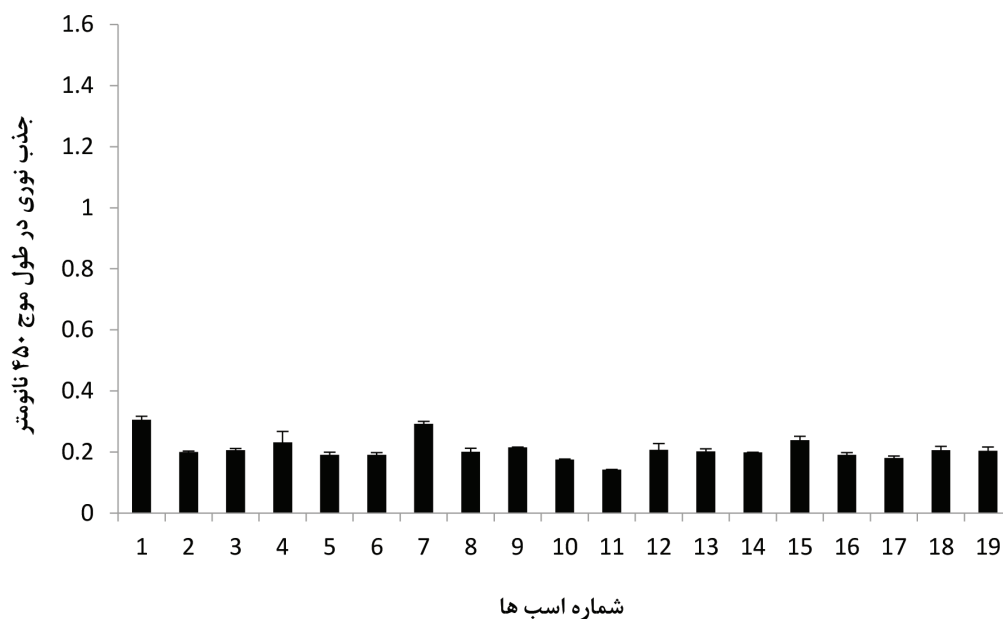
الف

خونگیری قبل از تزریق



ب.

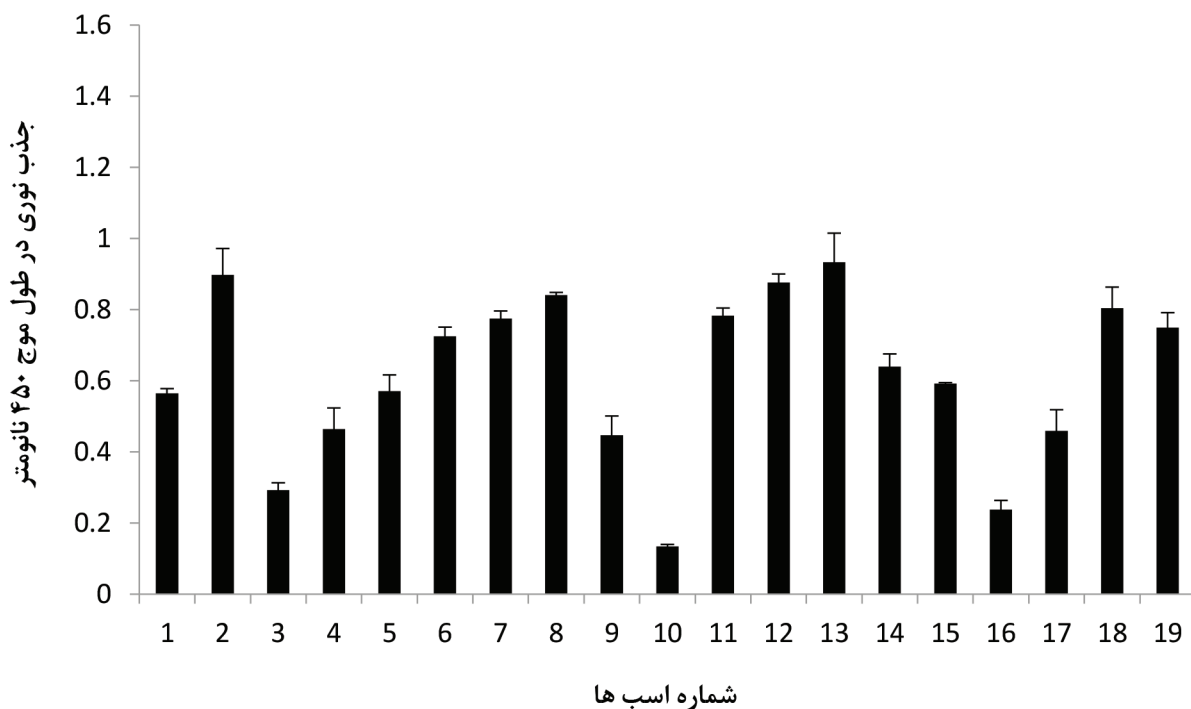
خونگیری بعد از تزریق اول



شکل ۳- نتایج حاصل از واکنش سرم های حاصل از تزریق فراکسیون های سمی (F3 و F4) زهر مار کبری در سیستم الیزای غیرمستقیم برای ارزیابی توانمندی اسب ها در تولید آنتی ونوم طی مراحل مختلف ایمن سازی. نوزده اسب در ۸ مرحله تزریق، فراکسیون های سمی زهر مار کبری را دریافت کردند و سپس طی ۱۰ مرحله، خونگیری از آن ها انجام شد. الف- مرحله خونگیری اولیه (پیش از شروع تزریق)، ب- خونگیری بعد از تزریق اول، ج- خونگیری بعد از تزریق دوم، د- خونگیری بعد از تزریق سوم، ه- خونگیری پس از یک هفته استراحت (بدون تزریق)، و- خونگیری بعد از تزریق چهارم، ز- خونگیری بعد از تزریق پنجم، ح- خونگیری بعد از تزریق ششم ط- خونگیری بعد از تزریق هفتم، ی- خونگیری بعد از تزریق هشتم (خونگیری نهایی).

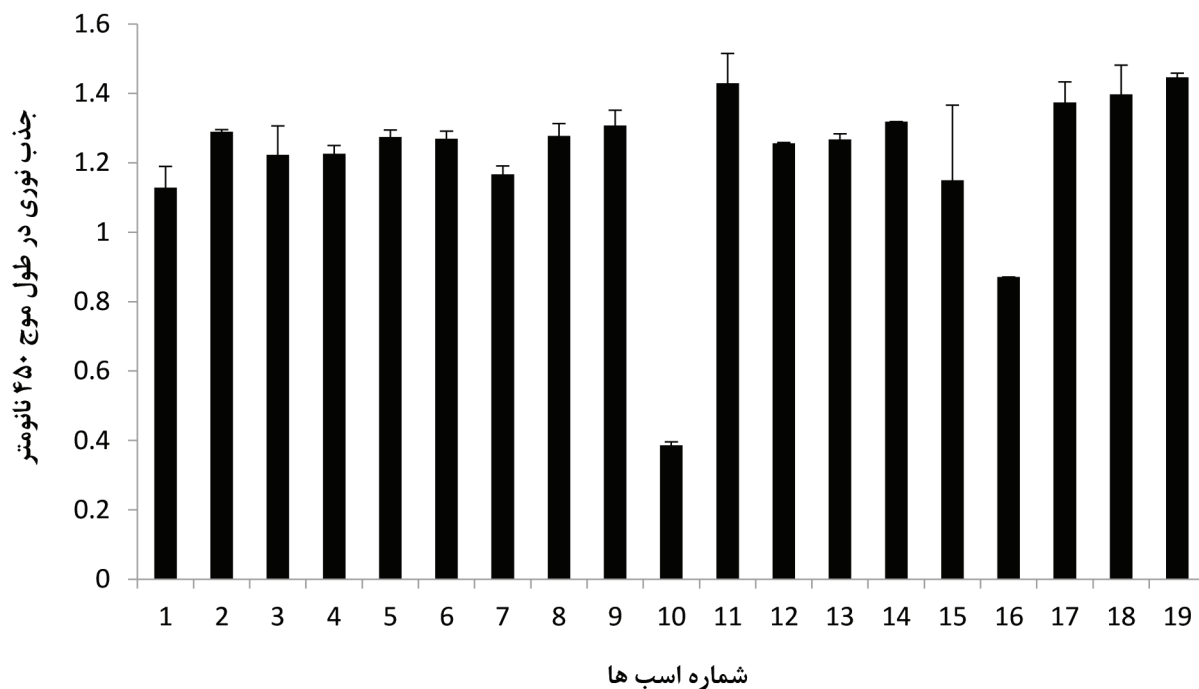
ج

خونگیری بعد از تزریق دوم

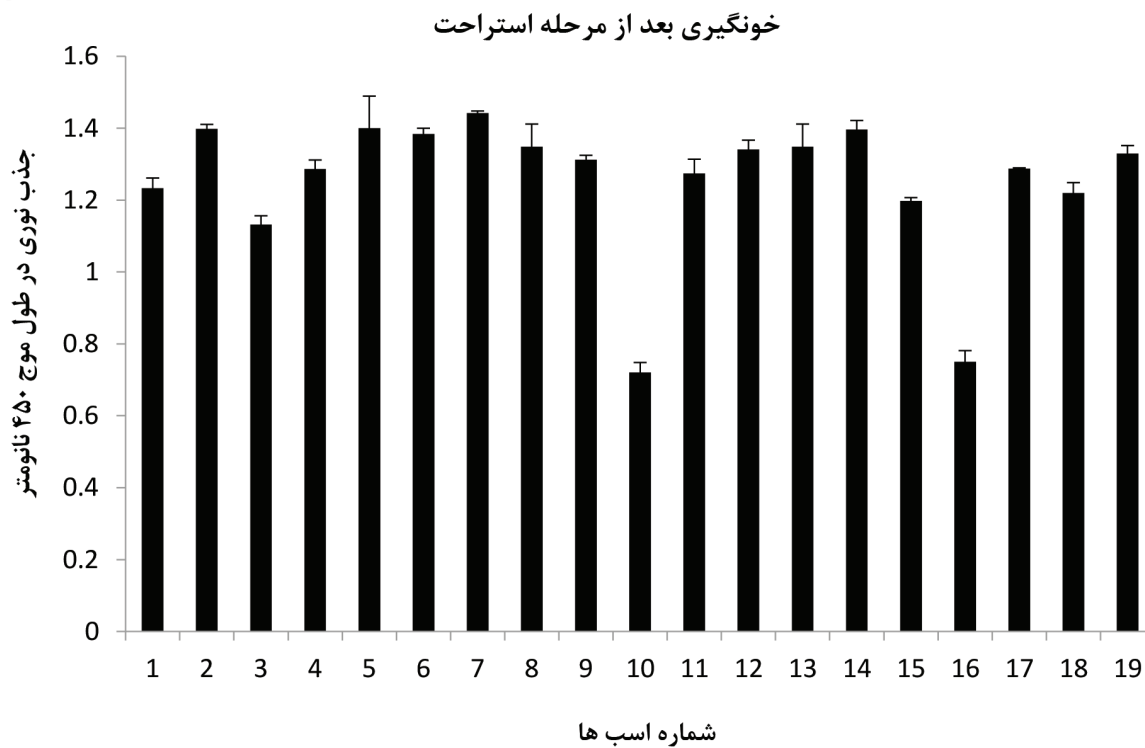


د

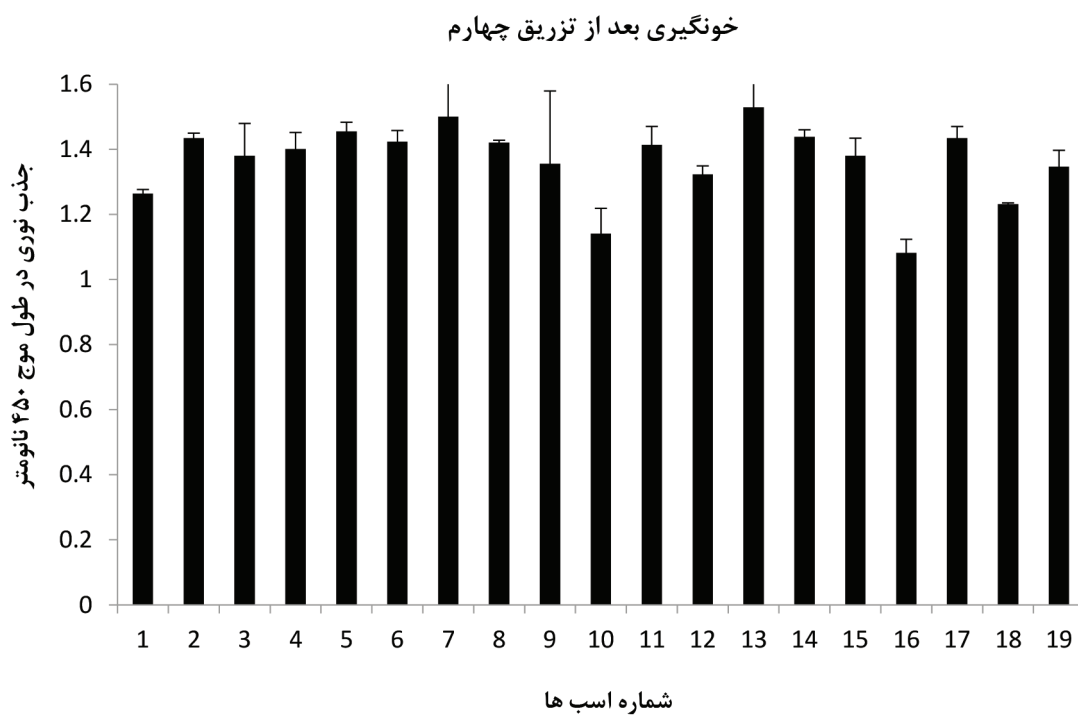
خونگیری بعد از تزریق سوم



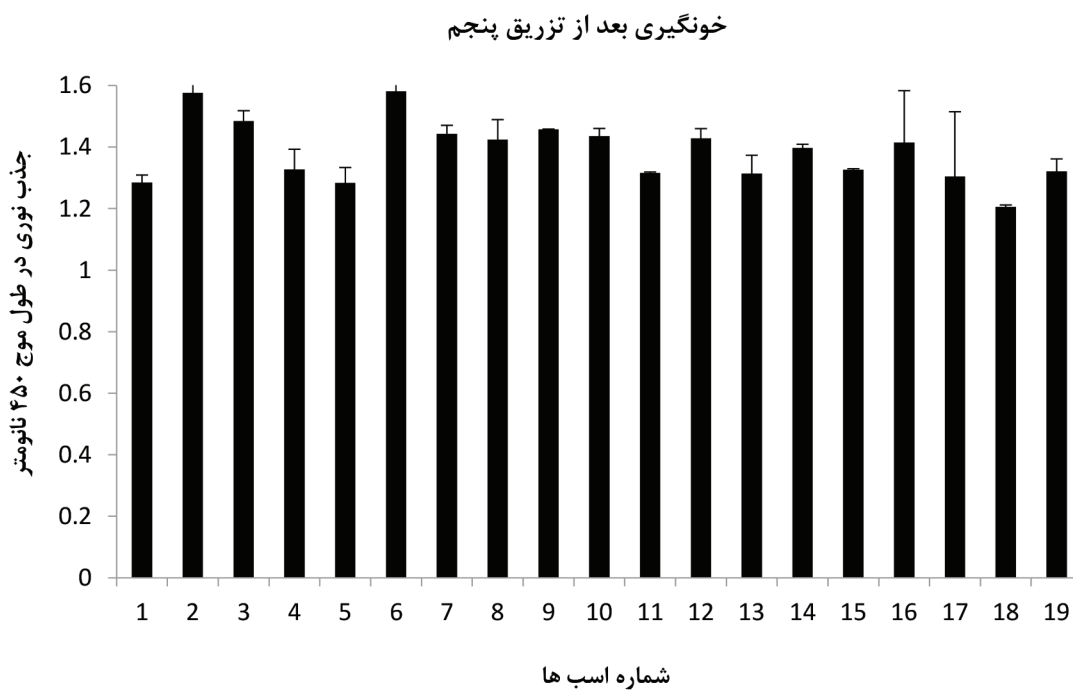
۵



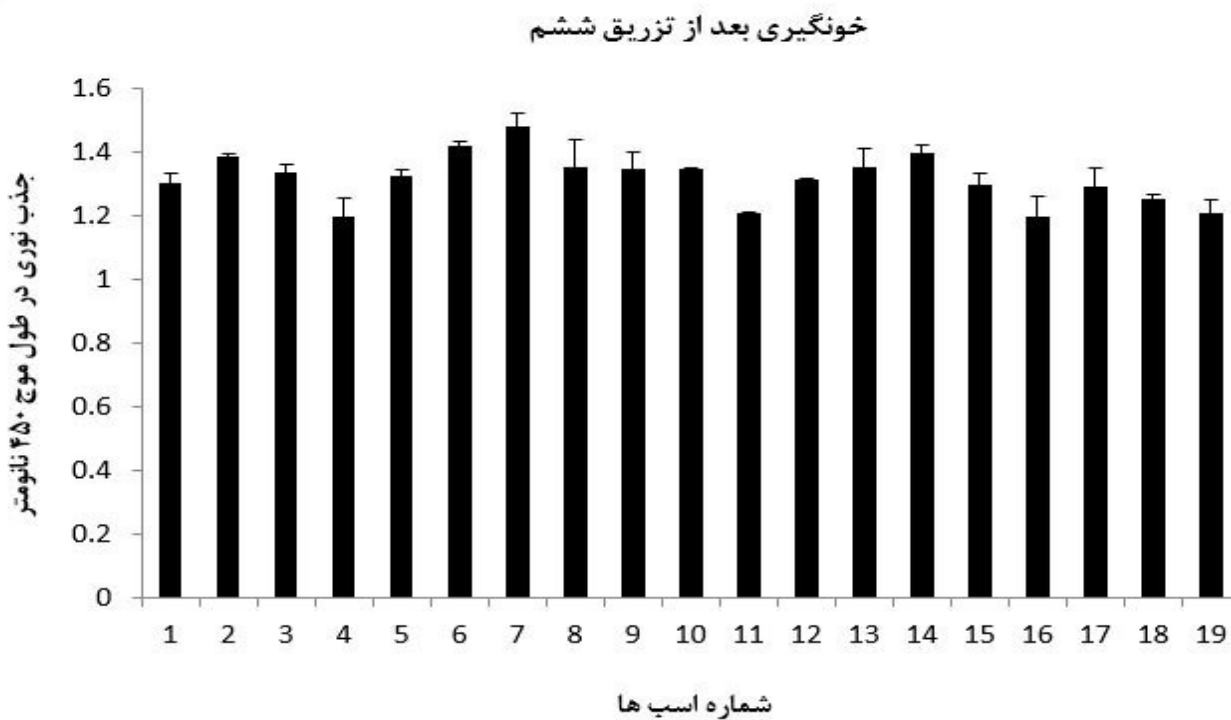
۹



ز

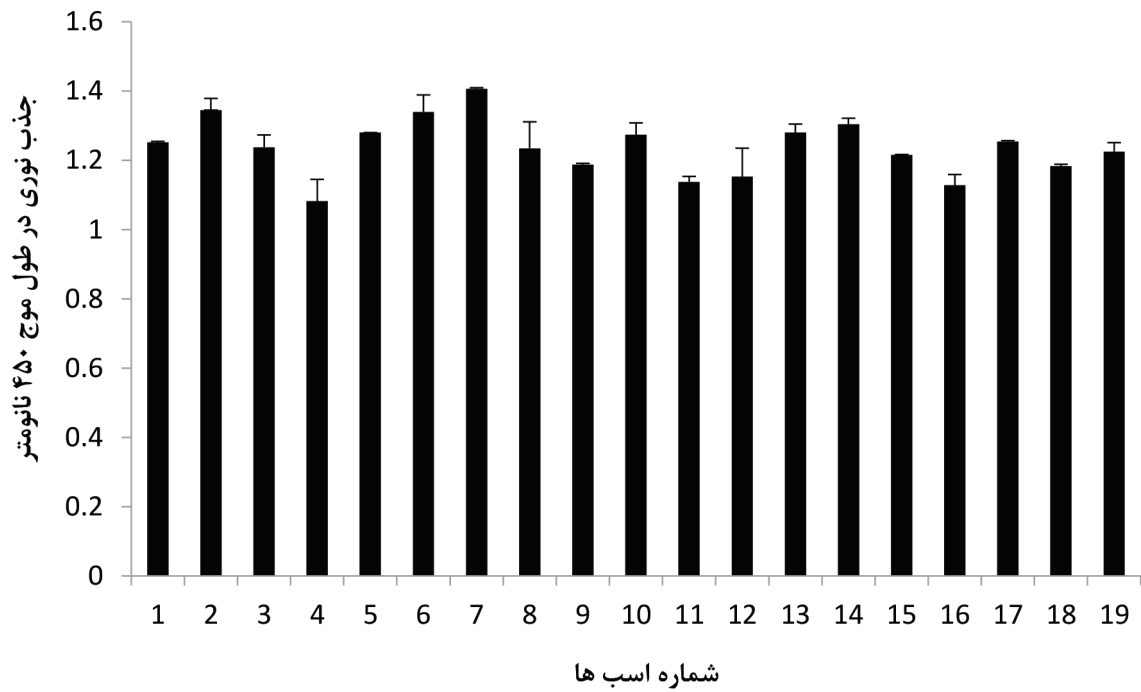


ح



ط

خونگیری بعد از تزریق هفتم



ط

خونگیری بعد از تزریق هشتم

