Journal of Arak University of Medical Sciences
Volume 26, Issue 3
August & September 2023

Research Article

Production of Monovalent Antivenom Effective against *Androctonus crassicauda* Scorpion Venom

Fatemeh Salabi [1,*], Mahsa Lari Baghal [2], A Rahman Kordzangene [2], Ali Mohamadian [2]

[1] Assistant Professor in Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran
[2] Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

*** Corresponding author:** Fatemeh Salabi, Assistant Professor in Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: f.salabi@rvsri.ac.ir

DOI: 10.61186/jams.26.3.8

How to Cite this Article:
Salabi F, Lari Baghal M, Kordzangene AR, Mohamadian A. Production of Monovalent Antivenom Effective against Androctonus Crassicauda Scorpion Venom. *J Arak Uni Med Sci*. 2023;**26**(3):8-17. DOI: 10.61186/jams.26.3.8

Received: 03 Jan 2024
Accepted: 13 Feb 2024
Keywords:
Scorpion *Androctonus crassicauda*
Scorpion Sting
Monovalan antivenom
Lethal dose 50
© 2023 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: The scorpion of *Androctonus crassicauda* belongs to the Buthidae family, it has a strong and deadly venom for humans, and every year there are cases of death due to the sting of this scorpion. The purpose of this study is the biological evaluation of the venom of this scorpion, the production of monovalent antivenom against it, and the evaluation of the effectiveness of the produced antivenom.

Methods: The *A. crassicauda* scorpions were collected from different cities of Khuzestan province and milked by electric shock. In this research, the amount of venom protein, lethal dose 50 (LD50), immune response of horses, purification of antibodies, effectiveness of antivenom (ED50), degree of neutralization of venom with antivenom and the effect of monovalan antivenom in neutralizing the activity of hyaluronidase enzyme were evaluated. This research has been approved by the Ethics Committee of the Razi Vaccine and Serum Research Institute with code IR.RVSRI.REC.1401.017.

Results: The amount of protein and LD50 of the venom from studied scorpion were calculated to be 78 mg/ml and 11.27 µg per mouse, respectively. The results of measuring the antibody titer at different times of venom injection showed the increase in the immune response of horses against the venom. The value of ED50 was around 9 LD50 and 92.22 µg per mouse. According to the results, scorpion venom has hyaluronidase enzyme activity, and 10 µL of the produced pure antivenom was able to neutralize 100% of the venom's hyaluronidase activity.

Conclusions: In this project, extracted venom and produced antivenom showed their effectiveness. The produced antivenom was able to neutralize the venom in mice and prevented the death of the envenomed mice.

Copyright © *2023 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره ۲۶، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

تولید پادزهر مونووالان مؤثر در برابر سم عقرب *Androctonus crassicauda*

فاطمه ثعلبی [۱،*]، مهسا لاری بقال [۲]، عبد الرحمن کردزنگنه [۲]، علی محمدیان [۲]

[۱] استادیار، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، اهواز، ایران
[۲] گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، اهواز، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** فاطمه ثعلبی، استادیار گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، اهواز، ایران. ایمیل: f.salabi@rvsri.ac.ir

DOI: 10.61186/jams.26.3.8

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۷
واژگان کلیدی:
عقرب *Androctonus crassicauda*
عقرب‌گزیدگی
پادزهر مونووالان
متوسط دوز کشندگی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: عقرب *Androctonus crassicauda* متعلق به خانواده بوتیده دارای سم قوی و کشنده برای انسان است و سالیانه مواردی از مرگ و میر ناشی از گزش با این گونه عقرب گزارش می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی بیولوژیکی زهر این عقرب، تولید پادزهر مونووالان علیه آن و ارزیابی کارایی پادزهر تولید شده می‌باشد.

روش کار: عقرب‌های *A. crassicauda* از شهرهای مختلف استان خوزستان جمع‌آوری و سم‌گیری از آن‌ها با استفاده از شوک الکتریکی انجام شد. در تحقیق حاضر میزان پروتئین سم، متوسط دوز کشندگی (LD50)، پاسخ ایمنی اسب‌ها، خالص سازی آنتی‌بادی، میزان اثربخشی پادزهر (ED50)، میزان خنثی سازی زهر با پادزهر و اثر پادزهر مونووالان در خنثی سازی فعالیت آنزیم هیالورونیداز مورد ارزیابی قرار گرفتند. این پژوهش با کد IR.RVSRI.REC.1401.017 به تصویب کمیته اخلاق موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی رسیده است.

یافته‌ها: مقدار پروتئین و LD50 زهر خام عقرب مورد مطالعه به ترتیب ۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۱۱/۲۷ میکروگرم به ازای هر موش محاسبه شدند. نتایج حاصل از سنجش تیتر آنتی‌بادی در زمان‌های مختلف تزریق زهر نشان دهنده افزایشی بودن روند پاسخ ایمنی اسب‌ها نسبت به زهر بود. مقدار ED50 تقریباً ۹ برابر LD50 و ۹۲/۲۲ میکروگرم به ازای هر موش بدست آمد. بر اساس نتایج زهر عقرب دارای فعالیت آنزیم هیالورونیداز است و مقدار ۱۰ میکرولیتر از پادزهر خالص تولید شده قادر به خنثی سازی ۱۰۰ درصدی فعالیت هیالورونیداز زهر گردید.

نتیجه گیری: در این پروژه زهر استحصال شده و پادزهر تولیدی کارامدی خود را نشان دادند. پادزهر تولید شده، در موش قادر به خنثی سازی زهر بوده و مانع از مرگ موش‌هایی که با زهر مسموم شده بودند گردید.

مقدمه

عقرب‌ها با نزدیک به ۲۲۳۱ گونه شناخته شده، در بسیاری از اکوسیستم‌های زمینی پراکنده هستند. در میان این گونه‌های متعدد عقرب، تنها چند گونه سلامت انسان را تهدید می‌کنند (۱, ۲). در کشور ما سالانه موارد متعددی عقرب‌گزیدگی از نقاط مختلف گزارش شده که در برخی موارد منجر به مرگ گردیده است (۱). براساس آخرین اطلاعات موجود، تاکنون در ایران ۶۸ گونه عقرب شناسایی شده که در ۲۰ جنس و سه خانواده Buthidae، Scorpionidae و Hemiscorpiidae طبقه‌بندی شده‌اند (۳, ۴). از این میان، خطرناک‌ترین عقرب‌ها برای انسان متعلق به خانواده Buthidae هستند که با ۸۲ جنس و ۷۵۶ گونه، بزرگ‌ترین خانواده عقرب هستند که در تمام قاره‌ها به جز قطب جنوب یافت می‌شوند. حدود ۲۵ گونه از خانواده بوتیده دارای سم قوی و کشنده برای انسان هستند که از بین آن‌ها گزارش‌هایی از مرگ بر اثر گزش ناشی از عقرب گونه *Androctonus crassicauda* گزارش شده است (۲, ۵). گزارش‌هایی از مرگ و میر ناشی از گزش با گونه‌های دیگر جنس آندروکتونوس از جمله *A. australis* در الجزایر و تونس و از عقرب *A. mauretanicus* در مراکش موجود است (۶).

عقرب *A. crassicauda* بر اساس میانگین دوز کشندگی (LD50) به عنوان یکی از کشنده‌ترین گونه عقرب در جهان برای پستانداران و انسان در نظر گرفته شده است (۱, ۴). این عقرب در بخش وسیعی از ایران از جمله استان‌های بوشهر، خراسان رضوی و جنوبی، اردبیل، خوزستان و سیستان و بلوچستان یافت می‌شود (۷). آمار بیمارستانی نشان می‌دهد که در استان خوزستان عقرب *A. crassicauda* عامل ۳۵ تا ۴۰ درصد از عقرب‌گزیدگی‌ها می‌باشد. سم این عقرب حاوی پپتیدهای نوروتوکسیک است که روی اکثر اعضای حیاتی بدن تاثیرگذار هستند به همین دلیل اولین علائم گزش با این عقرب شامل درد و سوزش در محل گزش است (۲, ۸). علائم عمومی مشاهده شده پس از گزش با این عقرب شامل؛ بی قراری، سرگیجه، بیهوشی، خواب

Copyright © 2023 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

آلودگی، حرکت سریع، ناگهانی و غیرارادی چشم‌ها، افزایش ترشح غدد برون ریز، افزایش دفعات مدفوع و ادرار هستند. علائم بالینی مانند درد شدید، بی حسی اندام نیش دار، درد شکم، نشت مایع مغزی نخاعی به بیرون (رینوره)، ترشح بیش از حد بزاق، تند تپشی، تند نفسی، نبض رشته‌ای، کاهش رفلکس‌های تاندون، افت فشار خون، تشنگی شدید، استفراغ خونی، استفراغ کف آلود، کما و مرگ در قربانیان گزیده شده با این عقرب گزارش شده است. تحقیقات نشان داده که موثرترین روش بهبود افراد آسیب دیده با این عقرب استفاده از پادزهر است. در برخی از مطالعات پیشین سرم تراپی و بررسی قابلیت پادزهر مونووالان در خنثی سازی سم عقرب *همی‌اسکورپیوس لپتوروس* (۹) و *مزوبوتوس اپئوس* (۱۰) در درمان بیماران عقرب زده انجام شده است. اما با وجود اهمیت عقرب *آندروکتونوس کراسی‌کودا* در سلامت عمومی جامعه، کارهای کمی روی سم آن انجام شده است و تا جایی که اطلاع داریم پادزهر مونووالان آن تاکنون تولید نشده و مورد بررسی قرار نگرفته است (۱, ۴). به همین منظور در این مطالعه ما پادزهر مونووالان این عقرب را با استفاده از اسب به عنوان حیوان هدف تولید کردیم و به بررسی قابلیت پادزهر مونووالان اسبی در خنثی سازی سم عقرب *آندروکتونوس کراسی‌کودا* در مدل موشی پرداختیم. علاوه‌برآن، ارزیابی پاسخ ایمنی اسب‌ها و میزان اثربخشی پادزهر نیز بررسی شد. یکی دیگر از اهداف این مطالعه، ارزیابی آنتی‌بادی‌های سرم‌های اسب‌های بیش‌ایمن‌شده با زهر خام عقرب *A. crassicauda* با استفاده از تست الایزا و پتانسیل آن برای کاربرد به‌عنوان یک تست جایگزین برای سنجش *in vivo* بود.

روش کار

استحصال نمونه سم

عقرب‌های *A. crassicauda* از شهرهای مختلف استان خوزستان در فصل تابستان و پاییز جمع آوری و به صورت زنده تا زمان سم گیری در آزمایشگاه بندپایان موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- شعبه جنوب غرب کشور (اهواز) نگهداری شدند. سم‌گیری با استفاده از شوک الکتریکی انجام شد (۱۱). سم بدست آمده به روش لئوفیلتراسیون، خشک گردیده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان پروتئین سم

مقدار پروتئین موجود در محلول سم خام فعال شده، به روش پروتئین سنجی برادفورد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف (از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) محلول سرم آلبومین گاوی (BSA) تعیین شد (۱۲). جذب نوری تمام لوله‌ها پس از کالیبراسیون اسپکتروفتومتر با نمونه بلانک، در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و نمودار استاندارد تهیه گردید. در نهایت غلظت پروتئین مجهول با استفاده از جذبی که در محدوده جذب پروتئین استاندارد قرار داشت، طبق معادله خط نمودار محاسبه گردید (۱۳).

تعیین متوسط دوز کشندگی

جهت تعیین متوسط دوز کشندگی (LD50) سم خام از موش سوری با وزن ۱۸ تا ۲۲ گرم استفاده شد. این موش‌ها از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردیدند. موش‌ها به گروه‌های ۴ تایی تقسیم شدند. دوزهای مختلف سم محلول (یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر نرمال سالین) تهیه و حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از هر دوز به صورت داخل وریدی به موش‌ها تزریق شد (۴ تکرار به ازای هر دوز). ضریب فواصل بین رقت‌ها ۱/۱۲۵ در نظر گرفته شد. به گروه شاهد، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی به جای سم به موش‌ها تزریق شد. مرگ و میر موش‌ها پس از ۴۸ ساعت ثبت شد و LD50 (به عنوان حداقل مقدار سمی که باعث مرگ در ۵۰ درصد از موش‌های تزریق شده می‌گردد) بر اساس روش اسپیرمن و کاربر محاسبه شد (۱۴). نتایج بدست آمده از سنجش LD50 سم عقرب *A. crassicauda* در موش‌ها برای یافتن میزان سم *A. crassicauda* مورد نیاز برای تزریق به اسب بر اساس وزن تصحیح گردید و در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت.

ایمن سازی و ارزیابی پاسخ ایمنی اسب‌ها

جهت ایمن سازی اسب‌ها، ۳ رأس مادیان ۳ ساله با وزن حدود ۴۵۰- ۴۰۰ کیلوگرم انتخاب شدند. آنتی ژن عقرب *A. crassicauda* همراه ادجوانت فروند (کامل و ناقص) ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید. ۵ دوز مختلف سم بر اساس نتایج بدست آمده از تست LD50 تعیین شدند. تزریقات به صورت زیر پوستی در ناحیه گردن در هفت دوره با فاصله یک هفته‌ای و مطابق برنامه ارائه شده در جدول ۱ انجام شد. برای بررسی ایمن سازی اسب‌ها، خونگیری قبل از هر دوره تزریق زهر به میزان ۱ میلی‌لیتر از ورید وداج گردنی هر اسب صورت گرفت. سرم نمونه‌های خونی بلافاصله جداسازی گردید و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از پایان آخرین مرحله خونگیری، تیتر آنتی بادی سرم‌های جداسازی شده به روش الایزا به شرح زیر اندازه گیری شد.

جدول ۱. برنامه ایمن سازی اسب‌ها و دوز سم عقرب Androctonus crassicauda

دوره تزریقات	میزان سم تزریقی (میلی‌گرم)	ادجوانت
۱	۰/۰۵	فروند کامل
۲	۰/۱	فروند کامل
۳	۰/۲۵	فروند ناقص
۴	۰/۵	فروند ناقص
۵	۰/۷۵	فروند ناقص
۶	۱	فروند ناقص
۷	۲	فروند ناقص

برای انجام تست الایزا ابتدا یک میلی‌گرم سم عقرب *A. crassicauda* در یک میلی‌لیتر بافر کوتینگ کربنات سدیم-بی کربنات سدیم فعال سازی شد. این تست دو بار تکرار شد. بار اول برای یافتن بهترین غلظت سم و رقت سرم بود. به این منظور غلظت‌های متفاوت سم (۲ تا ۱۶ میکروگرم سم در ۴ تکرار) در ۵۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ تهیه شدند و ۵۰ میکرولیتر از هر غلظت در ته گودی‌های پلیت الایزا کوت شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از شستشوی پلیت، عمل بلاکینگ با استفاده از محلول BSA دو درصد انجام شد. برای تعیین بهترین رقت سرم، ۴ رقت مختلف سرم (۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰ و ۱/۲۵۰) تهیه و حدود ۵۰ میکرولیتر از هر رقت به هر چاهک طوری اضافه شد که هر یک از غلظت‌های سم در مجاورت ۴ رقت سرم قرار داده شدند. پلیت الایزا به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد و سپس شستشو شد. در ادامه HRP Conjugated protein A/G (رهازیست پادتن، ایران) با رقت ۱/۵۰۰ تهیه شده و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. پلیت به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر TMB اضافه شده و در جای تاریک نگهداری شد. در انتها اسید کلریدریک ۱۰ درصد به عنوان محلول متوقف کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه شد. بلافاصله میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا Reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. بار دوم تست با بهترین غلظت سم و بهترین رقت سرم تکرار شد. تجزیه و تحلیل آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9.0 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال خطای یک درصد صورت گرفت.

ارزیابی میزان خنثی سازی سم با سرم اسب‌های ایمن شده (تست SN) به روش الایزا

برای تعیین میزان خنثی سازی زهر عقرب *A. crassicauda* با سرم اسب‌های ایمن شده علیه آن که به تست خنثی سازی سرم یا SN معروف است از تست الایزا استفاده کردیم. برای این منظور از نمونه‌های سرم جداسازی شده از اسب‌های ایمن شده با آنتی‌ژن تک ظرفیتی زهر عقرب *A. crassicauda* استفاده شد. بطور مختصر، میزان ۵۰ میکرولیتر از سم ۱۰ میکروگرم در ۵۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ (معادل ۱ میکروگرم سم) در ته تمام گودی‌های پلیت الایزا بجز کنترل‌ها ریخته شد. پس از مرحله بلاکینگ، مقدار ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف سرم جمع آوری شده در یک هفته پس از تزریق آخر (بین ۱/۲۰ تا ۱/۲۰۰۰) به چاهک اضافه شد. مراحل بعدی مشابه تست الایزای ذکر شده در فوق است. تجزیه و تحلیل آماری مشابه تست الایزا انجام شد.

خالص سازی آنتی بادی و بررسی آنتی بادی خالص سازی شده

روش استاندارد استفاده از آمونیوم سولفات اشباع شده برای تخلیص و تغلیظ آنتی بادی اسب به کار گرفته شد (۱۵). برای بررسی کمیت و کیفیت آنتی بادی تولید شده علاوه بر تست الایزای ذکر شده در فوق از SDS-page (الکتروفورز ژل دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید) نیز استفاده شد. الکتروفورز پلاسمای ایمن شده اسب با سم قبل و بعد از تصفیه به روش SDS-PAGE با ژل آکریل آمید ۱۲٪ مطابق روش مطالعه پیشین انجام شد (۱۵). جهت بررسی کیفیت پلاسما قبل و بعد از تصفیه، پلاسما به میزان ۲۰ برابر رقیق سازی شد.

ارزیابی میزان اثربخشی پادزهر به روش درون تنی (ED50)

برای بررسی قدرت خنثی سازی زهر عقرب *A. crassicauda* توسط پادزهر تک ظرفیتی تولید شده در این پژوهش به روش درون تنی (ED50)، از موش‌های سوری نر با وزن ۲ ± ۱۸ گرم استفاده شد. برای این منظور ابتدا غلظت‌های مختلف سم (۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم) با استفاده از سرم فیزیولوژی به حجم ۱ سی‌سی رسانده شدند. به همه رقت‌های تهیه شده ۱ سی‌سی از پادزهر تولید شده اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. در نهایت از هر رقت ۰/۵ سی‌سی به هر موش (۳ رأس موش به ازای هر تیمار) به صورت داخل وریدی تزریق شد و موش‌ها تا ۲۴ ساعت از نظر علایم و مرگ و میر بررسی شدند. در نهایت میزان متوسط دوز مؤثر بر اساس روش حسابی Karber-Behrens محاسبه شد (جدول ۲) (۱۶).

جدول ۲. میزان متوسط دوز مؤثر بر اساس روش حسابی Karber-Behrens

رابطه ۱):	$ED50 = LD100 - \Sigma(a \times b)/n$
n تعداد کل حیوانات یک گروه است	
a تفاوت بین دو دوز متوالی ماده تجویز شده است	
b میانگین تعداد حیوانات مرده در دو دوز متوالی است	
LD100 دوزی است که باعث مرگ ۱۰۰٪ همه حیوانات آزمایش شده می‌گردد	

اثر پادزهر مونووالان در خنثی سازی فعالیت آنزیم هیالورونیداز

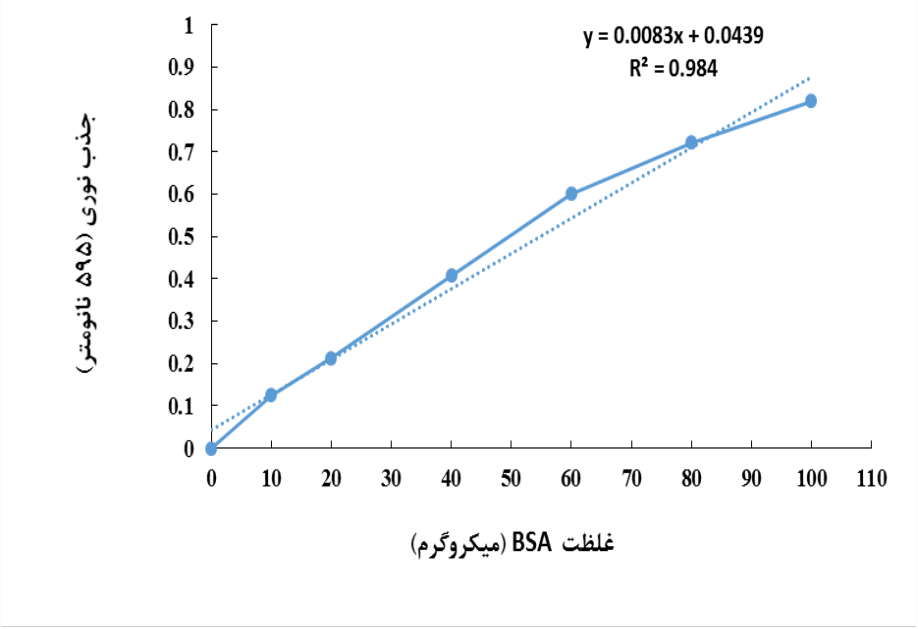
فعالیت هیالورونیداز سم به روش توربیدومتری با استفاده از هیالورونیک اسید اندازه گیری شد (۱۳). برای ارزیابی توانایی پادزهر مونووالان تولید شده علیه سم عقرب *A. crassicauda* در خنثی سازی فعالیت آنزیم هیالورونیداز ابتدا غلظت ثابتی از سم فعال شده (۱۰۰ میکروگرم) با مقادیر مختلف پادزهر خالص و رقیق شده ۱:۱۵ (از صفر تا ۱۰۰ میکرولیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مجاورت داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر هیالورونیک اسید (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۸۰۰ میکرولیتر بافر استات اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. در نهایت، واکنش با افزودن ۱ میلی‌لیتر ستیل تری متیل آمونیوم برمید (سیگما آلدریچ،H5882 (۲/۵ درصد وزنی به حجمی) متوقف شد. جذب نوری هر نمونه در طول ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت هیالورونیداز به صورت درصد هیالورونات

هیدرولیز شده در مقایسه با جذب لولهٔ آزمایش بدون سم (آنزیم) به عنوان صد درصد توربیدیتی محاسبه شد. اختلاف فعالیت آنزیم هیالورونیداز سم نمونه شاهد (بدون مجاورت با پادزهر) با سایر نمونه‌ها بیانگر میزان خنثی سازی فعالیت آنزیم می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح احتمال خطای یک درصد انجام شد.

یافته‌ها

پروتئین سم خام

سنجش میزان پروتئین به روش پروتئین سنجی برادفورد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول سرم آلبومین گاوی انجام شد. بر اساس منحنی استاندارد، مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام عقرب *A. crassicauda*، ۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. منحنی استاندارد BSA رسم شده به روش برادفورد (λ ۵۹۵=nm)

میزان متوسط دوز کشندگی

متوسط دوز کشندگی (LD50) سم عقرب *Androctonus crassicauda* به روش اسپیرمن و کاربر تعیین گردید (جدول ۳). جهت تعیین متوسط دوز کشندگی، دوزهای بین ۷ تا ۲۰ میکروگرم از زهر یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر با ضریب فواصل بین رقت‌های ۱/۱۲۵ تعیین و تزریق شدند. بر اساس نتایج بدست آمده، میزان تلفات در دوز ۷/۸۷، صفر درصد و در دوز ۱۷/۹۵، صد درصد بود. براساس محاسبات انجام شده با روش اسپرمن و کاربر دوز ۱۱/۲۷ به عنوان متوسط دوز کشندگی به ازای هر موش در نظر گرفته شد.

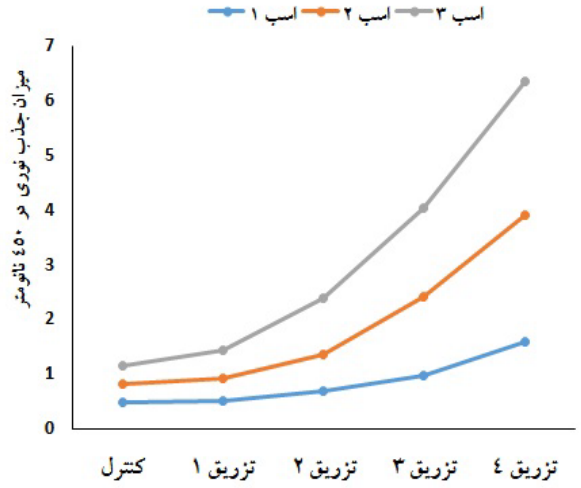
جدول ۳. متوسط دوز کشندگی (LD50) سم عقرب آندروکتونوس کراسی‌کودا در موش سوری (میکروگرم به ازای هر موش) با روش اسپیرمن و کاربر

دوز ۱۰۰ درصد کشندگی	تعداد کل تلفات	LD50 دوز ۱۰۰ درصد کشندگی
۱۸/۶۶	۱۱	۱۱/۲۷

ارزیابی پاسخ ایمنی اسب‌ها

تیتراسیون آنتی بادی

تیتر آنتی‌بادی در اسب‌های بیش ایمن شده با زهر عقرب *A. crassicauda* با استفاده از روش الایزا بررسی شد. به منظور بررسی کمیت آنتی‌بادی تولید شده، خونگیری از اسب‌ها و جداسازی سرم آن‌ها انجام شد. براساس نتایج حاصل از ستاپ تست الایزا، بهترین غلظت زهر ۸ میکروگرم و بهترین رقت سرم ۱/۵۰ بود، بنابراین تیتراسیون آنتی‌بادی با استفاده از این یافته‌ها برای نمونه‌های سرم اسبی انجام شد که نتایج آن بصورت نمودار در شکل ۲ قابل مشاهده است. نتایج نشانگر آنست که اسب‌ها به خوبی در مقابل آنتی‌ژن عقرب *A. crassicauda* ایمن شدند. از روند تیتر آنتی‌بادی در شکل ۲ استنباط می‌شود که هرچه دفعات تزریق آنتی‌ژن افزایش یابد پاسخ ایمنی اسب‌ها و تولید آنتی‌بادی در بدن آن‌ها بطور معنی داری (در سطح احتمال خطای یک درصد) افزایش می‌یابد (شکل ۲).



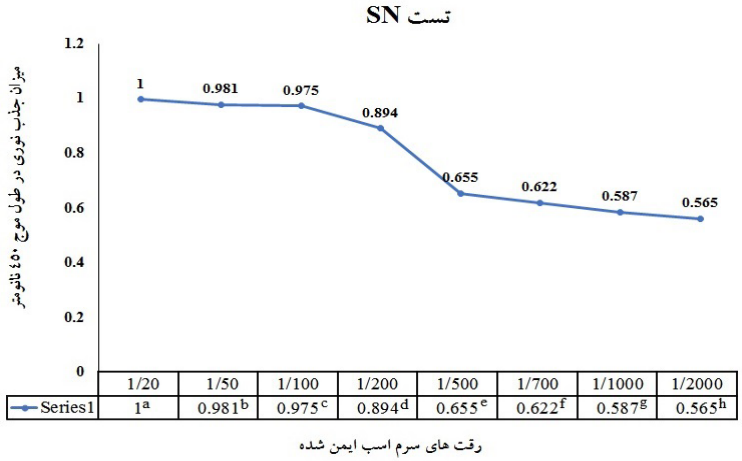
اسب ۱	0.4895^{e}	0.51^{d}	0.7025^{c}	0.966^{b}	1.593^{a}
اسب ۲	0.3405^{e}	0.418^{d}	0.663^{c}	1.443^{b}	2.314^{a}
اسب ۳	0.3325^{e}	0.5215^{d}	1.033^{c}	1.643^{b}	2.444^{a}

شکل ۲. پاسخ آنتی بادی در ۳ اسب در طول برنامه ایمن سازی

*در هر سطر میانگین‌هایی با حروف غیر مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

خنثی سازی زهر با سرم اسب‌های ایمن شده (تست SN)

با استفاده از تست الایزا، واکنش متقابل زهر (آنتی‌ژن) و سرم اسب‌های ایمن شده با زهر عقرب *A. crassicauda* (آنتی‌بادی) بررسی شد (شکل ۳). بدین منظور، رقت‌های مختلفی از سرم اسب‌های ایمن شده برای خنثی‌سازی سم استفاده شد. نتایج بصورت نمودار در شکل ۳ قابل مشاهده است. با توجه به این نمودار، جذب نوری در نمونه‌های سرم غلیظ‌تر بالاتر می‌باشد. بالا بودن عدد جذب نوری به معنی بالاتر از نیاز بودن میزان آنتی‌بادی‌های لازم جهت خنثی‌سازی یک مقدار ثابت زهر است. با رقیق شدن سرم میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر کاهش یافته است که نشان‌دهنده به تعادل رسیدن میزان آنتی‌بادی‌ها در مواجهه با مقدار ثابت زهر است. با توجه به این توضیحات، بهترین رقت سرم در مواجهه با ۱ میکروگرم زهر عقرب *A. crassicauda*، ۱ به ۲۰۰۰ میکرولیتر به دست آمد که با رقت‌های دیگر تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد. این به این معنی است که ۵۰ میکرولیتر از سرم دوهزار بار رقیق شده برای خنثی سازی ۱ میکروگرم زهر کافی می‌باشد.



شکل ۳. مقایسه میانگین خنثی سازی غلظت‌های مختلف سم عقرب A. crassicauda توسط رقت‌های مختلف پادزهر با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد

*میانگین‌هایی با حروف غیر مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

تعیین متوسط دوز مؤثر (ED50) The median effective dose

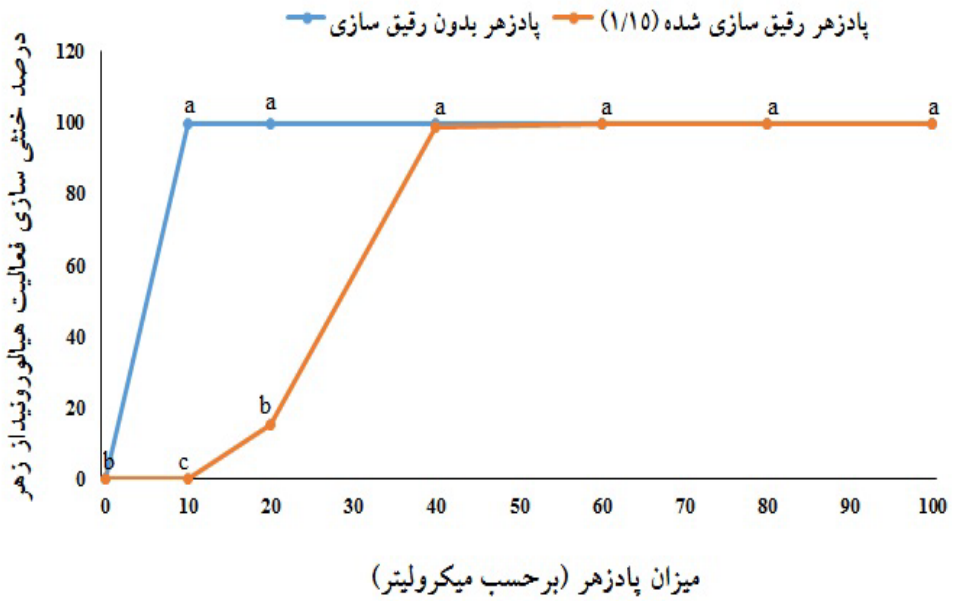
پس از تخلیص و تغلیظ آنتی‌بادی‌های پلاسمای اسب و تولید پادزهر مؤثر علیه عقرب *A. crassicauda*، اثر بخشی پادزهر تولید شده با مجاورت دادن مقدار ثابت پادزهر با مقادیر متفاوت سم عقرب به صورت افزایشی بررسی شد. بنابر نتایج بدست آمده دوز ۱۰۰ درصد کشندگی در این تست ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر موش بود (جدول ۴). بنابراین مقدار ED50 حدود ۹۲/۲۲ میکروگرم به ازای هر موش محاسبه شد که تقریباً ۹ برابر LD50 بدست آمد. این به معنی این است که پادزهر تا ۹ برابر LD50 را می‌تواند خنثی کند. نتایج در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴. تعیین ED50 با روش حسابی Karber-Behrens

گروه	دوز (میکروگرم به ازای هر موش)	تعداد موش در هر گروه	تعداد تلفات در هرگروه
۱	۶۰	۳	۰
۲	۸۰	۳	۱
۳	۱۰۰	۳	۳

مجاورت سم با پادزهر و سنجش میزان خنثی سازی هیالورونیداز سم

خنثی‌سازی فعالیت آنزیم هیالورونیداز زهر با استفاده از غلظت‌های مختلف دو پادزهر خالص و رقیق شده در شکل ۴ بصورت نمودار نشان داده شده است. براساس نتایج بدست آمده، مقدار ۱۰ میکرولیتر از پادزهر خالص قادر به خنثی سازی ۱۰۰ درصدی فعالیت هیالورونیداز در ۱۰۰ میکروگرم زهر می‌باشد (شکل ۴) در حالی‌که این مقدار برای پادزهر رقیق شده به نسبت ۱:۱۵ تقریباً ۴۰ میکرولیتر می‌باشد که در مقایسه با مقادیر کمتر تفاوت آماری معنی‌داری نشان دادند. سطح معنی‌داری نتایج مقایسه میانگین‌ها در نمودار قابل مشاهده است.

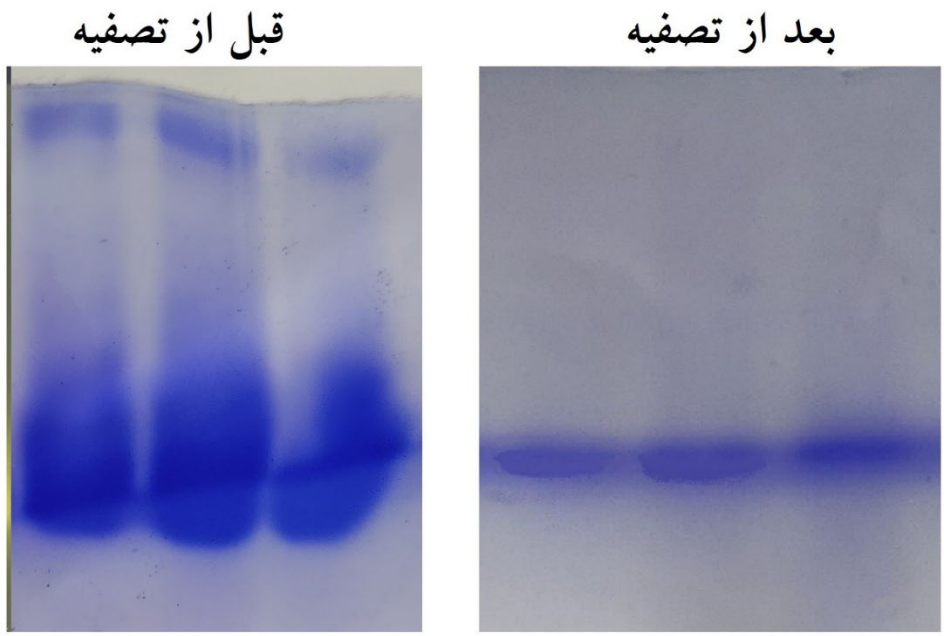


شکل ۴. خنثی‌سازی فعالیت هیالورونیداز سم عقرب A. crassicauda در غلظت‌های مختلف پادزهر

* میانگین‌هایی با حروف غیر مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

الکتروفورز پلاسمای ایمن شده اسب با سم

برای بررسی کیفیت آنتی‌بادی در پلاسمای ایمن‌شده اسب با سم عقرب مورد مطالعه قبل و بعد از تصفیه از روش الکترفورز SDS-page (الکتروفورز ژل دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید) استفاده شد. بررسی‌ها نشان داد که پلاسمای بیش ایمن شده اسب‌های تحت شارژ با زهر عقرب *A. crassicauda* قبل از تصفیه دارای چند باند می‌باشد که نشانگر پروتئین‌های موجود در پلاسما به ویژه آلبومین است (شکل ۵). باندی که در بالای ژل قابل مشاهده است نشانگر وجود پروتئین آلبومین است درحالیکه این باند در پروفایل پلاسمای بعد از تصفیه وجود ندارد. در پروفایل پلاسما بعد از تصفیه فقط یک باند که مربوط به آنتی‌بادی‌ها است به چشم می‌خورد.



شکل ۵. الکتروفورز پلاسمای بیش ایمن شده اسب‌ها قبل و بعد از فرایند تصفیه پلاسما

بحث

عقرب *A. crassicauda* متعلق به خانواده بوتیده یکی از شش گونه عقرب خطرناک در ایران است که گزارش‌هایی از مرگ بر اثر نیش این عقرب وجود دارد. این عقرب در اکثر مناطق ایران پراکنده است و دارای سم نوروتوکسیک و کشنده برای انسان است که اکثر اندام‌های حیاتی بدن انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲, ۱۷). زهر آن در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی جهت تهیه پادزهر پلی والان ضد عقرب زدگی مورد استفاده قرار گرفته است. با وجود اهمیت زیاد زهر این عقرب در تولید پادزهر براساس دانسته‌های ما تاکنون پادزهر مونووالان این عقرب تولید و مطالعه نشده و تیتر آنتی‌بادی آن در اسب به عنوان حیوان هدف با استفاده از روش الایزا بررسی نشده است. به این منظور در این مطالعه، علاوه بر سنجش میزان پروتئین و متوسط دوز کشنده زهر این عقرب در موش، اسب‌ها در هفت دوره با دوزهای مختلف زهر این عقرب مورد مطالعه ایمن شدند. خونگیری از اسب‌های شارژ شده با سم عقرب*A. crassicauda* و جداسازی سرم آن‌ها برای بررسی کمیت آنتی‌بادی تولید شده با استفاده از تست الایزا و جداسازی پلاسما برای تصفیه و تغلیظ آنتی‌بادی انجام شد. علاوه بر این ما خنثی سازی زهر را با روش الایزا و اثربخشی پادزهر را به روش درون تنی انجام دادیم. میزان پروتئین زهر بدست آمده در این مطالعه (۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان دهنده کیفیت بالای زهر مورد استفاده است. مطابق با این گزارش، در مطالعه پیشین ما میزان پروتئین زهر خام این عقرب ۷۱/۸۰ درصد گزارش شده است (۱۸). در حالیکه Salama و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از خوانش نمونه‌های زهر در جذب نوری ۲۸۰ نانومتر میزان پروتئین سم عقرب *A. crassicauda* را ۸/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند (۱۹). روش مورد استفاده جهت سنجش پروتئین، تازه بودن زهر و جذب نوری خوانش نمونه‌ها در نتایج بدست آمده بیش‌ترین تأثیر را دارند. به منظور تعیین دوزهای مؤثر جهت تزریق به حیوان هدف متوسط دوز کشندگی زهر این عقرب محاسبه شد که بر اساس نتایج ۱۱/۲۷ میکروگرم به ازای هر موش یا ۰/۵۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدست آمد که تصحیح شده آن در اسب هایی با وزن حدود ۴۵۰-۴۰۰ کیلوگرم بین ۲۲۵ تا ۲۵۴ میلی‌گرم به ازای اسب می‌باشد. ما در اینجا دوزهای تزریقی به اسب‌ها را تا ۱ برابر LD50 در نظر گرفتیم. در مطالعات پیشین، مسیحی پور و همکاران در سال ۱۳۹۲ متوسط دوز کشندگی سم عقرب*آ پیستوبوتوس سوسنی* را ۱۰/۸۳ میکروگرم به ازای هر موش گزارش کرده بودند (۲۰). در مطالعه مشیری و همکاران در سال ۱۴۰۰، متوسط دوز کشندگی سم عقرب *Odontobuthus doriae*، ۰/۱۴ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن گزارش شده است (۲۱).Brwa Nawzad و همکاران در سال ۲۰۱۸ متوسط دوز کشندگی سم عقرب *Hottentotta saulcyi* را ۱/۰۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش کردند (۲۲).

سنجش آنتی‌بادی تولید شده در برنامه ایمن‌سازی علیه زهر یکی از بهترین روش‌های اطمینان از پادزهر تولیدی می‌باشد. در این پژوهش نتایج سنجش تیتر آنتی‌بادی با تست الایزا علاوه بر افزایش تولید آنتی‌بادی پس از هر بار تزرق آنتی‌ژن، موید توان بالای این تست برای ارزیابی اتصال آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط اسب‌های بیش ایمن شده با زهر عقرب مورد نظر در برنامه‌های تولید پادزهر بود. نتایج این مطالعه با کار Silva و همکاران (۲۰۲۳) که روش آزمایشگاهی ELISA را برای اندازه‌گیری تمایل آنتی‌بادی‌های موجود در سرم اسب‌های بیش ایمن شده با سم عقرب *Tityus serrulatus* ارزیابی کردند و Sifi و همکاران در سال ۲۰۱۸ که تیتر IgY در برابر سم عقرب *Androctonus australis hector* را با روش الایزا مورد ارزیابی قرا دادند (۲۳, ۲۴) همخوانی دارد.

بهترین رقت برای آنتی‌بادی در تست الایزا با توجه به نوع زهر مورد استفاده، غلظت زهر، حیوان هدف و شرایط آزمایش تعیین می‌گردد. در مطالعه ما بهترین رقت برای آنتی بادی (F(ab')2) اسب ایمن شده با زهر عقرب مورد مطالعه ۱:۵۰ بدست آمد در حالیکه در مطالعه‌ای که

توسط Peres و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شده بود بهترین رقت برای آنتی بادی ($F(ab')2$) اسب ایمن شده با زهر افعی *Bothrops jararaca* رقت ۱:۲۰۰ گزارش شده است (۲۵). نتایج بدست آمده از تیتر آنتی‌بادی در این مطالعه نیز با نتایج ما همخوانی دارد. علاوه‌بر این، Brwa Nawzad و همکاران در سال ۲۰۱۸ تیتر آنتی‌بادی ناشی از تزریق سم عقرب *Hottentotta saulcyi* را در سه اسب بررسی کردند. در این مطالعه پاسخ ایمنی اسب‌ها به روش ایمونودیفیوژن دوگانه Ouchterlony بررسی شد که نتایج در راستای نتایج بدست آمده در این تحقیق بود (۲۲). بهدانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ تولید آنتی‌ونوم از شتر ایمن شده با سم عقرب *همی اسکورپیوس لپتوروس* را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند روند پاسخ ایمنی شترها نسبت به سم افزایشی بوده و شترها به خوبی با آنتی ژن ایمن شده بودند. این محققین همچنین گزارش کردند که روند ایمن سازی شترها پس از تلقیح دوم رو به افزایش گذاشته است و با تکرار تزریقات تفاوت چندانی ایجاد نشده است (۹). نکته‌ای که در اینجا باید مورد توجه قرار گیرد اینست که؛ تفاوت در جزئیات نتایج بدست آمده با توجه به تفاوت در حیوان هدف، آنتی‌ژن تزریقی، دوز و دفعات تزریق قابل قبول است.

در مجموع نتایج این پژوهش حاکی از توان تست الایزا برای بررسی میزان خنثی سازی زهر توسط آنتی‌بادی سرم نیز بود. با توجه به نتایج بدست آمده برای خنثی سازی ۱ میکروگرم زهر عقرب *A. crassicauda* ۵۰ میکرولیتر از سرم ۱:۲۰۰۰ رقیق شده مؤثر خواهد بود. مطالعه مشابهی که از تست الایزا برای بررسی خنثی سازی زهر عقرب توسط سرم بیش ایمن شده اسب استفاده کرده باشد یافت نشد اما در مطالعه‌ای که روی زهر افعی *Bothrops jararaca* انجام شده نتایج مشابهی به دست آمد (۲۵). در مطالعه دیگری، گلچین فر و همکاران در سال ۱۳۹۵ از تست الایزا به این منظور استفاده کردند که آنها غلظت ۱ میکروگرم در میلی لیتر را به‌عنوان بهترین غلظت سم مار پلی والان و رقت ۱/۱۵۰۰ را به‌عنوان بهترین رقت برای کونژوگه آنزیمی گزارش کردند (۲۶).

در این مطالعه ما با استفاده از روش استاندارد آمونیوم سولفات اشباع شده تخلیص و تغلیظ آنتی‌بادی‌های پلاسمای اسب بیش ایمن شده را انجام دادیم. این روش در مطالعات مشابه انجام شده است (۱۵). پس از آن، اثر بخشی پادزهر تولید شده با تست پوتنسی روی موش بررسی شد. در این مطالعه دوز ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر موش منجر به ۱۰۰ درصد کشندگی شد. مقدار ED50 بر اساس رابطه اشاره شده در مواد و روش ۹۲/۲۲ میکروگرم به ازای هر موش (۲۰ گرم) به دست آمد که برابر با ۴/۶۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تقریباً ۹ برابر LD50 می‌باشد. در واقع، هر میلی‌لیتر از پادزهر توان خنثی‌سازی ۴/۶۱۱ میلی‌گرم زهر را دارد. مدنی و همکاران در سال ۱۳۹۷ متوسط دوز مؤثر پادزهر در برابر سم مار شاخدار ایرانی را ۶۴۰۱/۳۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۷). در مطالعه Aguilar و همکاران در سال ۲۰۱۴ متوسط دوز مؤثر آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه سم مار مرجانی در زرده تخم مرغ‌های ایمن شده ۴۷۷/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد (۲۸). Brwa Nawzad و همکاران در سال ۲۰۱۸ متوسط دوز مؤثر پادزهرعلیه زهر عقرب*Hottentotta saulcyi* را ۸۳ برابر LD50 که هر میلی‌لیتر از پادزهر توان خنثی‌سازی ۱/۷۸ میلی‌گرم زهر را دارد گزارش کردند (۲۲).

از یافته‌های پژوهش حاضر استنباط می‌شود که زهر این عقرب فعالیت آنزیمی هیالورونیداز را نشان داد که این یافته با تحقیقات قبلی ما همخوانی دارد (۴). علاوه بر آن، نشان دهنده قدرت پادزهر تولید شده در خنثی سازی اثرات پاراکلینیکی ناشی از فعالیت این آنزیم در زهر عقرب است. Kadkhodaei و همکاران در سال ۲۰۰۶ فعالیت آنزیم هیالورونیداز را در سم خام عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس گزارش کردند (۲۹). Guerra-Duartea و همکاران در سال ۲۰۱۹ علاوه بر گزارش فعالیت هیالورونیداز در زهر چند گونه عقرب تایتوس برزیلی، با مقایسه اثر مهار آنزیم هیالورونیداز توسط پادزهرهای تولیدی سه شرکت تولید کننده پادزهر گزارش کردند که پادزهرهای درمانی عقرب‌گزیدگی به طور قابل توجهی فعالیت هیالورونیداز سم تمام عقرب‌های مورد مطالعه را مهار کرد (۳۰).

نتیجه الکتروفورز پلاسمای ایمن شده اسب با سم تأیید کننده درستی روش جداسازی و خلوص آنتی‌بادی‌ها بود. Mateljak Lukačević و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای تجزیه و تحلیل پروفایل پلاسمای اسب‌های هایپر ایمن شده و تخلیص شده به وسیله سولفات آمونیوم را به روش‌های مختلفی از جمله SDS-page به تصویر کشیده‌اند (۳۱) که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

نتیجه گیری

در این مطالعه، آنتی‌ونوم مونووالان تولید شده به طور مؤثر سمیت زهر عقرب *A. crassicauda* را خنثی کرده و از مرگ موش‌های مسموم شده با زهر این عقرب جلوگیری کرد. نتایج نشان داد که تست الایزای بهینه‌شده برای سنجش تیتر آنتی‌بادی و میزان خنثی سازی زهر عقرب توسط پادزهر روشی مؤثر می‌باشد. این مطالعه می‌تواند راهنمای خوبی برای تولید پادزهر مونووالان، سنجش تیتر آنتی‌بادی و میزان خنثی‌سازی زهر به روش الایزا، محاسبه LD50 و ED50 زهر باشد.

رعایت موازین اخلاقی در پژوهش

پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی با کد اخلاق IR.RVSRI.REC.1401.017 موردتصویب قرار گرفته است و کلیه اصول اخلاقی در انجام آن رعایت شده است.

حامی مالی

این تحقیق بخشی از طرح مصوب شماره ۲-۸۳-۱۸-۰۴۱-۰۰۰۶۰۷ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی و تولید که تصویب و پشتیبانی مالی این پروژه را عهده‌دار بوده‌اند تشکر می‌شود. در خاتمه از تمام همکاران شعبه اهواز که در انجام این تحقیق همکاری داشته‌اند کمال تشکر و سپاسگزاری به عمل می‌آید.

تضاد منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچگونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

نقش نویسندگان

طراحی و نظارت بر پژوهش: فاطمه ثعلبی؛ جمع آوری داده‌ها: فاطمه ثعلبی، مهسا لاری بقال، عبدالرحمن کرد زنگنه، علی محمدیان؛ آنالیز

و تحلیل نتایج: فاطمه ثعلبی؛ نوشتن مقاله: فاطمه ثعلبی، مهسا لاری بقال؛ کلیه نویسندگان متن نهایی را خوانده و مورد تأیید قرار داده‌اند.

References

1. Dehghani R, Ghorbani A, Varzandeh M, Karami-Robati F. Toxicity Mechanism of Dangerous Scorpion Stings in Iran. *J Arthropod Borne Dis*. 2023;**17**(2):105-119. **doi:** 10.18502/jad.v17i2.13616 **pmid:** 37822761
2. Salabi F, Jafari H. Differential venom gland gene expression analysis of juvenile and adult scorpions Androctonus crassicauda. *BMC Genomics*. 2022;**23**(1):636. **doi:** 10.1186/s12864-022-08866-1 **pmid:** 36076177
3. Firoozfar F, Saghafipour A, Jesri N. Scorpions and Their Human Mortality Report in Iran: A Review Article. *Iran J Public Health*. 2019;**48**(12):2140-2153. **doi:** 10.18502/ijph.v48i12.3545
4. Salabi F, Jafari H. New insights about scorpion venom hyaluronidase; isoforms, expression and phylogeny. *Toxin Rev*. 2023;**42**(1):69-84. **doi:** 10.1080/15569543.2021.2018613
5. Ghorbani A, Mansouri B, Baradaran M. Effects of climate variables on the incidence of scorpion stings in Iran for five years. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2021;**27**:e20200110. **doi:** 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0110 **pmid:** 34262606
6. Benguedda AC, Laraba-Djebari F, Ouahdi M. Fifteen years' experience in scorpion envenomation control in Algeria. *Bull Soc Pathol Exot*. 2002;**95**(3):205-208.
7. Sharifinia N, Gowhari I, Hoseiny-Rad M, Aivazi AA. Fauna and Geographical Distribution of Scorpions in Ilam Province, South Western Iran. *J Arthrop Borne Diseas*. 2017;**11**(2):242-248.
8. Martin-Eauclaire MF, Benoit E, Marchot P, Barbier J, Molgo J, Servent D. Special issue on <<Toxins: from threats to benefits>>. *Toxicon*. 2013;**75**:1-2. **doi:** 10.1016/j.toxicon.2013.08.001 **pmid:** 23927926
9. Behdani M, Hosseininejad Chafi M, Zeinali S. Production of antiserum from camels immunized with Hemiscorpius lepturus scorpion venom: evaluation of its neutralization effect in mice. *J Facult Med Tehran Univ Med Sci*. 2010;**68**(5):268-273.
10. Khoobdel M, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T, Khosravi M, Taheri M, Koochakzadeh A, et al. The production of monovalent and anti-idiotype antivenom against Mesobuthus eupeus (Scorpionida: Buthidae) venom in rabbits. *Toxicon*. 2013;**76**:44-49. **doi:** 10.1016/j.toxicon.2013.09.006 **pmid:** 24055069
11. Salabi F, Jafari H, Nazari N, MoAzen Reza Mahaleh H. Comparison of three methods of administration of scorpion venom (injection, spray and oral) against sugarcane stem-eating pest Sesamia nonagrioides (lef.). (Persian). *Veterinar Res Biol Product*. 2018;**123**:66-74.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;**72**:248-254. **doi:** 10.1006/abio.1976.9999 **pmid:** 942051
13. Nazari M, Rooshanfekr HA, Salabi F. Isolation, characterization, and biological activity of Phospholipase A2 (PLA2) and Hyaluronidase from Iranian honey bee venom (Apis Mellifera meda). *Agricultur Biotechnol J*. 2023;**15**(2):141-156.
14. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RC. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Evn Sci Technol*. 1997;**7**(11):714-719. **doi:** 10.1021/es60130a004
15. Nazari M, Rooshanfekr HA, Salabi F, Fayazi J, Mohamadian A, Kavosh F. Production of the First Effective Immune Equine Serum Antivenom against Iranian Honey Bees (Apis mellifera meda). *RAP*. 2015;**14**(41):1-12.
16. Pandit DN, Jaiswal A. Evaluation of acute toxicity, stress and safe level of chloramphenicol and ginger to an Indian air-breathing fish, Channa punctatus (Bloch). *J Entomol Zool Stud*. 2020;**8**(2):247-251.
17. Salabi F, Vazirianzadeh B, Baradaran M. Identification, classification, and characterization of alpha and beta subunits of LVP1 protein from the venom gland of four Iranian scorpion species. *Sci Rep*. 2023;**13**(1):22277. **doi:** 10.1038/s41598-023-49556-6 **pmid:** 38097679
18. Salabi F, Nemati M, Lari baghal M. Fractionation and enzymes activity measurement of the scorpion Androctinus crassicoda (Scorpionida: Buthidae) venom. *Iran Veterinar J*. 2024;**19**(3):5-13.
19. Salama WM, Sharshar KM. Surveillance study on scorpion species in Egypt and comparison of their crude venom protein profiles. *J Basic Appl Zool*. 2013;**66**(2):76-86. **doi:** 10.1016/j.jobaz.2013.10.003
20. Masihipour B, Saleh Moghadam M, Zare Mirkabadi A, Navidpour Sh, Rabiei H. Isolation of lethal fraction from Apistobuthus sosane scorpion venom. (Persian). *Animal Environ Sci Res Quarter*. 2012;**5**(1):1-8.
21. Moshieri M, Shiravi AH, Navidpour Sh, Zulfaqarian H, Islampanah M. Investigating the interaction effect of Odontobuthus doriae scorpion venom and cyclosporine drug on the levels of liver enzymes ALT, AST and liver histology in small laboratory mice. (Persian). *Anim Physiol Develop Sci Res Quarter*. 2021;**54**(3):17-28.
22. Ismael BN, Abass KS, Khalil KA, Salih KA. Preparation of F(ab')(2) antivenom in Iraq against scorpion (Hottentotta saulcyi) venom. *Biologicals*. 2018;**56**:19-23. **doi:** 10.1016/j.biologicals.2018.08.005 **pmid:** 30153952
23. Silva LT, Junior RS, Teixeira de Carvalho TX, Moutinho Pataca LC, Dias Heneine LG. Analysis of antibodies avidity for Tityus serrulatus scorpion venom in antivenom production and its potential for application as a potency test. *Toxicon*. 2023;**236**:107315. **doi:** 10.1016/j.toxicon.2023.107315 **pmid:** 37827265
24. Sifi A, Adi-Bessalem S, Laraba-Djebari F. Development of a new approach of immunotherapy against scorpion envenoming: Avian IgYs an alternative to equine IgGs. *Int Immunopharmacol*. 2018;**61**:256-265. **doi:** 10.1016/j.intimp.2018.06.013 **pmid:** 29902709
25. Peres CM, Bastos MF, Ferreira J, Sartori A. Detection and neutralization of venom by ovine antiserum in experimental envenoming by Bothrops jararaca. *J Venomous Anim Toxin Tropic Diseas*. 2006;**12**(1):124-136. **doi:** 10.1590/S1678-91992006000100010
26. Golchinfar F, Madani R, Emami T, Zulfaqarian H, Zare A, Mohammadpour A. Designing a competitive ELISA method to evaluate the potency of anti-snake serum. (Persian). *J Veterinar Med Res Develop*. 2015;**110**:9-16.
27. Madani R, Razavi SM, Golchin F. Determination of lethal dose and effective dose in Iranian horned snake venom. (Persian). *J Veterinar Res Biol Product*. 2017;**120**:70-76.
28. Aguilar I, Sanchez EE, Giron ME, Estrella A, Guerrero B, Rodriguez-Acosta FA. Coral snake antivenom produced in chickens (Gallus domesticus). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;**56**(1):61-66. **doi:** 10.1590/S0036-46652014000100009 **pmid:** 24553610
29. Kadkhodaei Eliadrani M, Amouzgari Z, Hanifi H. The activity of phospholipase A2 and hyaluronidase in the venom of the scorpion Mesobutus opius opius. *Faiz Sci Res Quarter*. 2006;**10**(4):24-30.
30. Guerra-Duarte C, Rebello Horta CC, Ribeiro Oliveira-Mendes BB, de Freitas Magalhaes B, Costal-Oliveira F, Stransky S, et al. Determination of hyaluronidase activity in Tityus spp. Scorpion venoms and its inhibition by Brazilian antivenoms. *Toxicon*. 2019;**167**:134-143. **doi:** 10.1016/j.toxicon.2019.06.019 **pmid:** 31207348
31. Mateljak Lukacevic S, Kurtovic T, Lang Balija M, Brgles M, Steinberger S, Marchetti-Deschmann M, et al. Quality-Related Properties of Equine Immunoglobulins Purified by Different Approaches. *Toxins (Basel)*. 2020;**12**(12). **doi:** 10.3390/toxins12120798 **pmid:** 33327454