نقش کیفیت تولید در کاهش عوارض جانبی آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب

مهران دباغیان*

عضو هیات علمی (استادیار)، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

*نویسنده مسئول: مهران دباغیان m.dabaghian@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵-۰۳-۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵-۰۹-۰۶

چکیده

آنتی‌سرم‌های ضد مار یا عقرب از مهم‌ترین فرآورده‌های بیولوژیک با منشأ دامی هستند که معمولا از پلاسمای حیوانات هایپرایمن، به‌ویژه اسب، تولید می‌شوند و در درمان اختصاصی آسیب‌های ناشی از مارگزیدگی و عقرب‌زدگی نقش حیاتی دارند. ماهیت هترولوگ و پروتئینی این فرآورده‌ها می‌تواند موجب بروز واکنش‌های ناخواسته در فرد دریافت‌کننده شود. این واکنش‌ها می‌توانند به صورت علائم زودرس، واکنش‌های تب‌زا یا بیماری سرمی بروز کنند. با این حال، بروز این عوارض فقط به شرایط بیمار یا نحوه تزریق وابسته نیست و کیفیت خود فرآورده نیز می‌تواند در آن سهمی مهم داشته باشد. در این مقاله، نقش مراحل مختلف تولید، از انتخاب و پایش اسب‌های تولیدکننده پلاسما تا خالص‌سازی، کنترل هضم آنزیمی، فرمولاسیون و آزمون‌های کنترل کیفیت در عوارض ناشی از آنتی‌سرم‌ها بررسی شده است. به طور کلی در فرایند تولید آنتی‌سرم، هر چه توان خنثی‌کنندگی پلاسما بالاتر باشد و در مراحل بعدی ناخالصی‌های پروتئینی، آلودگی با آندوتوکسین و تجمعات پروتئینی بهتر کنترل شوند، احتمال بروز عوارض ناخواسته نیز کمتر خواهد شد. بر این اساس، بی‌ضرری نسبی آنتی‌سرم را نباید فقط در آزمون نهایی محصول جست‌وجو کرد. این ویژگی در واقع از همان انتخاب حیوان تولیدکننده آغاز می‌شود و در تمام مراحل تولید شکل می‌گیرد.

کلمات کلیدی

آنتی‌سرم، عوارض جانبی، کنترل کیفیت

بیان مسئله و اهمیت موضوع

مارگزیدگی و عقرب‌گزیدگی از فوریت‌های پزشکی مهم و گاه مرگبار در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان به شمار می‌روند. این گزش‌ها می‌توانند با آسیب‌های موضعی، اختلالات عصبی، قلبی، انعقادی و در موارد شدید با نارسایی اندام‌ها یا مرگ همراه باشند. در چنین شرایطی، آنتی‌سرم اختصاصی همچنان مهم‌ترین درمان برای خنثی‌سازی زهر محسوب می‌شود و سازمان جهانی بهداشت نیز دسترسی به آنتی‌ونوم ایمن، مؤثر و باکیفیت را یکی از ضرورت‌های اصلی در مدیریت گزش‌های سمی می‌داند (۱).

با وجود اهمیت درمانی آنتی‌سرم‌ها، این فرآورده‌ها محصولات زیستی پیچیده‌ای هستند که معمولا از پلاسمای حیوانات هایپرایمن، به ویژه اسب، تهیه می‌شوند. در عمل، کیفیت نهایی آن‌ها نتیجه مجموعه‌ای از عوامل به‌هم پیوسته است و هرایرادی در هر یک از اجزای این مسیر ممکن است، بسته به اهمیت آن، بر بی‌ضرری [1] و توان خنثی‌کنندگی [2] محصول اثر بگذارد.

عوارض جانبی آنتی‌سرم‌ها (شامل واکنش‌های زودرس یا تأخیری) علاوه برعوامل بالینی مانند وضعیت بیمار، مقدار و سرعت فرآورده تزریق شده، ارتباط مستقیمی با ویژگی‌های خود محصول مانند بار بالای پروتئینی، باقی‌ماندن پروتئین‌های غیراختصاصی و تجمعات پروتئینی و نیز آلودگی با مواد تب‌زا [3] دارند (۲-۷). از این نظر، بخشی از پیشگیری از عوارض آنتی‌سرم پیش از رسیدن فرآورده به بیمار، در همان مراحل طراحی، تولید و کنترل کیفیت انجام می‌شود.

اهمیت این موضوع در کشورهایی مانند ایران بیشتر است؛ زیرا تنوع گونه‌های مار و عقرب، نیاز پایدار به آنتی‌سرم مؤثر و نقش تولید داخلی در تأمین سلامت عمومی، ضرورت توجه به کیفیت تولید را برجسته‌تر می‌کند. تولید آنتی‌سرم، فعالیتی صرفاً صنعتی نیست و به همکاری متخصصان دامپزشکی، ایمنی‌شناسی، سم‌شناسی، بیوشیمی، فرمولاسیون و کنترل کیفیت نیاز دارد. از این رو، هدف این مقاله بررسی این موضوع است که چگونه مدیریت علمی کیفیت در فرآیند تولید می‌تواند به کاهش عوارض جانبی آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب کمک کند و در عین حال کارآیی و اعتماد به فرآورده را حفظ نماید. در ادامه، پس از معرفی کوتاه ماهیت آنتی‌سرم و واکنش‌های ناخواسته آن، بر عواملی تمرکز می‌شود که از فرآیند تولید بر بی ضرری محصول اثر می‌گذارند.

دستاورد
ماهیت آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب و فرآیند تولید آنها

آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب، یا به بیان دقیق‌تر آنتی‌ونوم‌ها، فرآورده‌های ایمونوگلوبولینی هستند که برای خنثی‌سازی زهر و کاهش عوارض بالینی ناشی از زهر این موجودات استفاده می‌شوند. این فرآورده‌ها معمولا از پلاسمای حیوانات هایپرایمن، به‌ویژه اسب، تهیه می‌شوند و به دلیل منشأ دامی و ماهیت پروتئینی، کیفیت آن‌ها به کنترل دقیق مراحل تولید وابسته است.

فرآیند تولید به طور کلی با انتخاب زهر مناسب و آماده‌سازی آن برای ایمن‌سازی آغاز می‌شود. سپس حیوان تولیدکننده طبق یک برنامه کنترل شده با مقادیر مشخصی از زهر یا اجزای ایمنوژنیک آن ایمن می‌شود تا آنتی‌بادی اختصاصی تولید کند. پس از رسیدن پاسخ سیستم ایمنی به سطح مطلوب، خون‌گیری انجام شده و پلاسما جدا می‌شود. در ادامه، پلاسما وارد مراحل هضم آنزیمی، خالص‌سازی و فرمولاسیون می شود (تصویر ۱) (۱).

انواع واکنش‌های ناخواسته

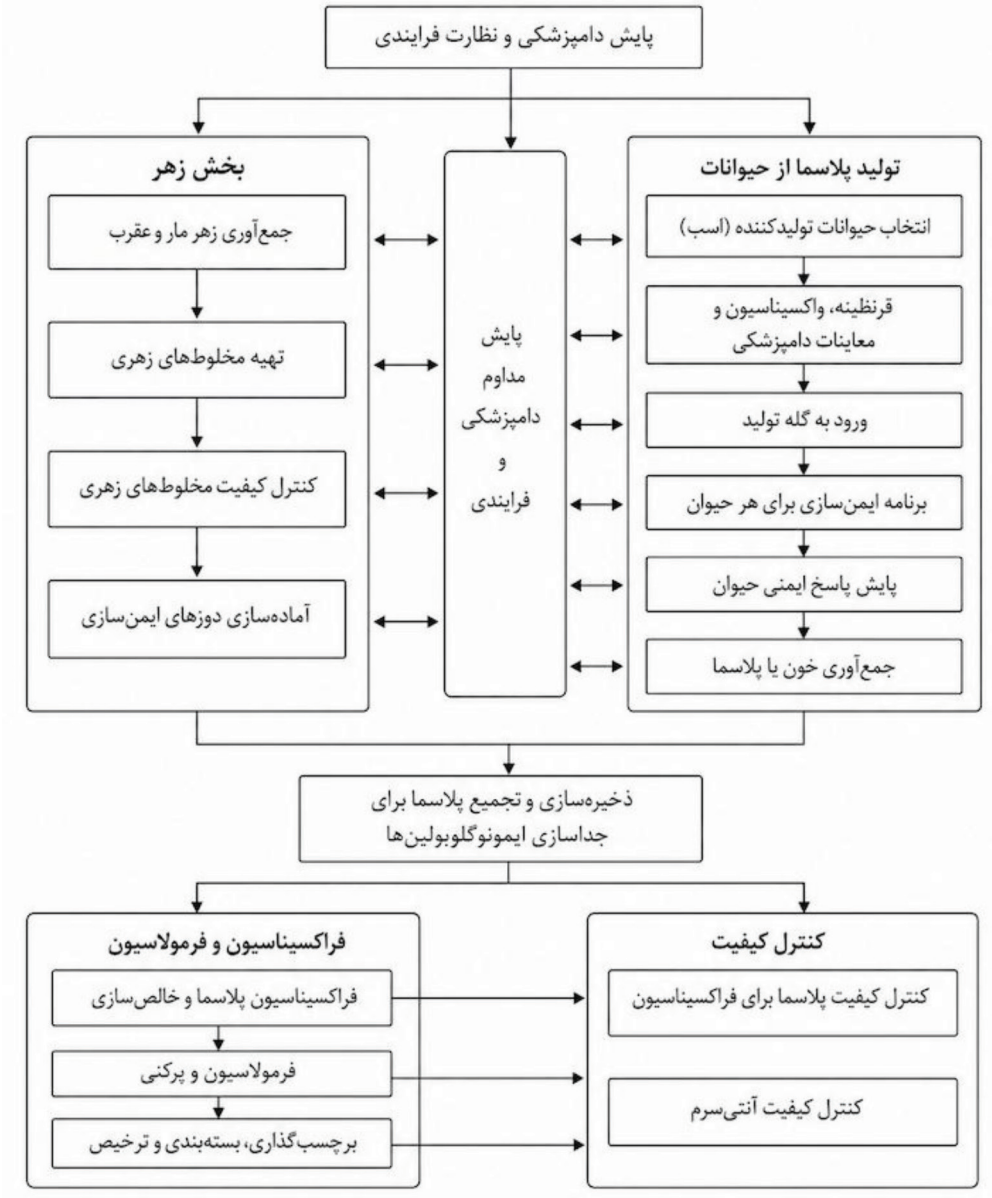
عوارض جانبی آنتی‌سرم مار یا عقرب معمولا با توجه به زمان بروز آن پس از تجویز به دو گروه اصلی حاد یا زودرس و تاخیری طبقه‌بندی می‌شود. واکنش‌های حاد عموما در زمان کوتاهی چند دقیقه تا چند ساعت و نهایتا تا ۲۴ ساعت پس از تزریق بروز می‌کنند. این واکنش‌ها از نظر مکانیسم عمل شبیه هم نیستند و می‌توانند واکنش‌های آنافیلاکتیک و شبه آنافیلاکتیک، تب‌زا و یا غیر وابسته به آنتی‌بادی IgE باشند. در مقابل واکنش‌های تاخیری معمولا چند روز بعد از تجویز آنتی‌سرم بروز می‌کنند و مهم‌ترین نوع آنها بیماری سرمی [4] است. این تقسیم‌بندی برای تولیدکننده نیز اهمیت دارد؛ چون هر گروه از عوارض معمولاً به بخشی از کیفیت محصول مربوط می‌شود: واکنش‌های زودرس بیشتر با تجمعات پروتئینی و فعالیت ضدکمپلمان، واکنش‌های تب‌زا با آلودگی پایروژنی، و بیماری سرمی با بار پروتئین هترولوگ ارتباط دارند (۲-۶).

---

1. Safety.
2. Potency.
3. Pyrogenic.
4. Sickness.

واکنش‌های حاد یا زودرس

واکنش‌های حاد می‌توانند با علائمی مانند خارش، کهیر، قرمزی پوست، تهوع، تب، لرز، تنگی نفس، برونکواسپاسم، افت فشار خون یا شوک همراه باشند. مکانیسم ایجاد واکنش‌های زودرس دقیقا مشخص نیست. این واکنش‌ها ممکن است نوعی ازدیاد حساسیت تیپ I و وابسته به آنتی‌بادی IgE باشند ولی این عوارض حتی در افرادی که هیچ سابقه برخورد با پروتئین‌های اسبی را نداشته‌اند نیز دیده شده است. واکنش‌های زودرس احتمالا با مکانیسم‌هایی مرکب از ازدیاد حساسیت تیپ I و نیز مسیر غیروابسته به آنتی‌بادی IgE مانند فعال‌سازی کمپلمان، ماست سل‌ها [5] و اثر وجود تجمعات پروتئینی ایمنوگلوبولین و قطعات آن مانند Fc به وجود می‌آید. بنابراین، همه واکنش‌های شبه آنافیلاکسی پس از تزریق آنتی‌سرم را نمی‌توان به طور ساده به حساسیت قبلی یا آنافیلاکسی واقعی نسبت داد (۳, ۷, ۸).



تصویر ۱- نمای شماتیک مراحل تولید آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب (۱).

5. Mast cells.

واکنش‌های پایروژنیک به‌عنوان زیرگروهی از واکنش‌های زودرس

از نظر زمان بروز، واکنش‌های پایروژنیک یا تب‌زا در گروه واکنش‌های حاد یا زودرس قرار می‌گیرند اما از نظر مکانیسمی تفاوت اساسی با واکنش‌های آنافیلاکتیک و شبه انافیلاکتیک دارند. این عوارض کاملا به کیفیت پایروژنیک و میکروبی فرآورده وابسته هستند و با علایمی مانند تب، لرز، درد عضلانی، ضعف، بی‌قراری و علائم شبه‌التهابی همراه هستند. یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد این نوع واکنش‌ها آندوتوکسین باکتری‌های گرم منفی است که حتی در مقادیر کم می‌تواند ایمنی ذاتی را فعال کند و منجر به آزادسازی سایتوکاین‌های التهابی شود (۱, ۵).

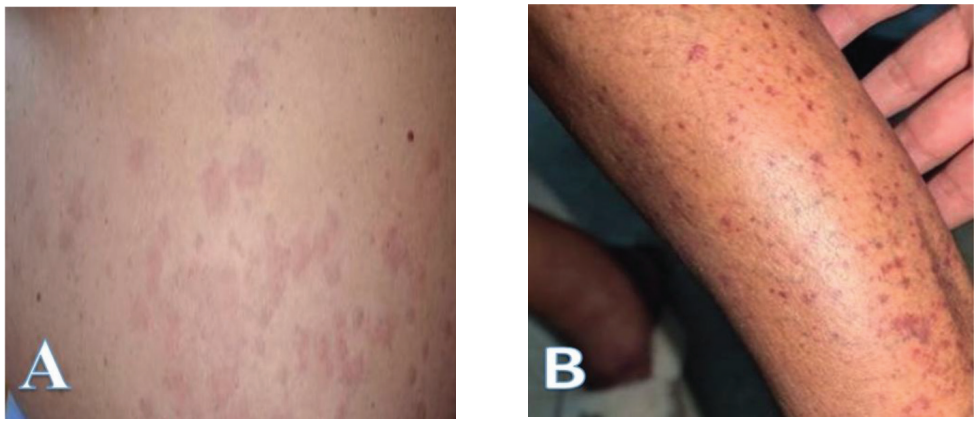
واکنش‌های تأخیری و بیماری سرمی

واکنش‌های تاخیری، به‌خصوص بیماری سرمی، بین ۵ تا ۱۴ روز بعد از تزریق آنتی‌سرم بروز می‌کنند، هر چند که در برخی منابع امکان بروز آنها را تا ۲۴ روز نیز محتمل می‌دانند. مکانیسم اصلی این واکنش‌های ناخواسته ایجاد ازدیاد حساسیت تیپ III است و در نتیجه تولید کمپلکس ایمنی میان پروتئین‌های هترولوگ موجود در آنتی‌سرم و آنتی‌بادی‌های فرد دریافت‌کننده ایجاد می‌شود. رسوب این کمپلکس‌ها در بافت‌ها و دیواره عروق می‌تواند منجر به فعال‌سازی مسیر کمپلمان شود. در نتیجه این فعال‌سازی بسیج سلول‌های التهابی به ناحیه اتفاق می‌افتد و با ترشح سایتوکاین‌های مرتبط علایمی چون تب، کهیر، خارش، بثورات پوستی، درد مفاصل، بزرگ‌شدن غدد لنفاوی و در مواردی پروتئینوری یا نوروپاتی ایجاد می‌شود (تصویر ۲).

از دیدگاه تولید میزان بروز بیماری سرمی با میزان تجویز پروتئین هترولوگ ارتباط مستقیم دارد. هرچه خلوص محصول و نسبت توان خنثی‌کنندگی به پروتئین بالاتر باشد احتمال بروز بیماری سرمی کمتر خواهد بود. از این رو کاهش پروتئین‌های غیراختصاصی و افزایش فعالیت اختصاصی محصول نهایی که در نتیجه دسترسی به پلاسما با کیفیت و فرایندهای پایین دستی بهینه حاصل می‌گردد، می‌تواند در کاهش بروز این علایم نقش اساسی داشته باشد (۲, ۳, ۵, ۷).

عوامل تولیدی مؤثر بر بی‌ضرری آنتی‌سرم

به دلیل منشا حیوانی این فرآورده‌ها، آنتی‌سرم‌های مار و عقرب در دسته محصولات پروتئینی هترولوگ قرار می‌گیرند. همانطور که پیش از این اشاره شد کیفیت این محصولات به رعایت استانداردهای لازم در هر یک از مراحل تولید وابسته است. فرآیند تولید این محصولات از انتخاب حیوان تولیدکننده مناسب، انتخاب میزان و نوع زهر مناسب جهت ایمن‌سازی و بهینه‌سازی برنامه ایمن‌سازی و خون‌گیری مناسب شروع می‌شود و با خالص‌سازی پلاسما و فرمولاسیون ادامه پیدا می‌کند. در این مسیر، ضعف در یک مرحله معمولا به مراحل بعدی نیز منتقل می‌شود. به عنوان مثال پلاسمای با توان خنثی‌کنندگی پایین منجر به تولید محصولی با توان خنثی‌کنندگی پایین می‌شود و در نتیجه باعث نیاز به تزریق میزان بالاتری آنتی‌سرم می‌شود. از طرف دیگر خالص‌سازی غیربهینه و نامناسب موجب بالا رفتن غلظت پروتئین‌های غیراختصاصی در محصول می‌شود. به علاوه خالص‌سازی نامناسب می‌تواند باعث ایجاد تجمعات پروتئینی و آلودگی با عوامل تب‌زا شود.



تصویر ۲- ضایعات پوستی در بیماری سرمی پس از دریافت آنتی ونوم مار، A) ضایعات کهیری چندشکلی، B) پورپورای پتشی قابل لمس در اندام تحتانی (۹).

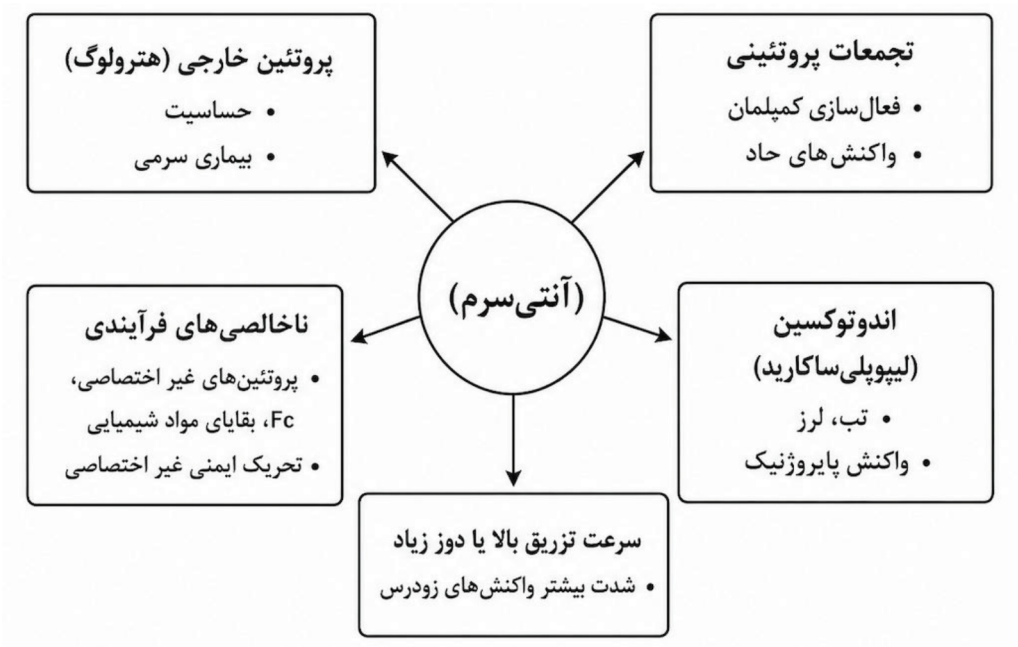
به همین دلیل، کنترل این عوامل باید مرحله به مرحله انجام شود، نه اینکه فقط در آزمون نهایی محصول بررسی گردد. در جدول ۱ مهم‌ترین عوامل تولیدی مرتبط با عوارض آنتی‌سرم و راهکارهای کنترل آن‌ها به صورت خلاصه ارائه شده است (۱).

سلامت اسب و کیفیت پلاسمای هایپرایمن

کیفیت آنتی‌سرم از وضعیت حیوان تولیدکننده پلاسما آغاز می‌شود. در این مرحله توجه به سلامت حیوانی که جهت تولید انتخاب می‌شود، نوع تغذیه، شرایط نگهداری و اجرای برنامه ایمن‌سازی و خون‌گیری مناسب تاثیر مستقیمی بر روی کیفیت محصول نهایی دارد. در طول برنامه هایپرایمن‌سازی اسب‌ها مکررا با دوزهای کنترل شده از زهر یا اجزای زهر مار یا عقرب به همراه ادجوانت مناسب ایمن‌سازی می‌شوند و پس از رسیدن به تیتر مناسب آنتی‌بادی اختصاصی، خون‌گیری در حجم بالا از اس‌بها صورت می‌گیرد. در مراکز تولید آنتی‌سرم، تمامی فاکتورهای موثر در این مرحله طی مطالعات متعدد مورد بررسی قرار می‌گیرند و میزان زهر، نوع ادجوانت، تعداد دفعات ایمن‌سازی و خون‌گیری بهینه می‌شوند. برنامه ایمن‌سازی و خون‌گیری باید طوری طراحی شود که هم پاسخ آنتی‌بادی کافی ایجاد کند و هم در طولانی مدت به وضعیت بدنی، خون‌سازی و آسایش حیوان آسیب نزند. در صورت نبود برنامه‌ای مناسب، اسب‌های تولیدکننده ممکن است در طول زمان دچار استرس فیزیولوژیک، افت وضعیت بدنی، واکنش‌های موضعی یا سیستمیک، التهاب مزمن و کم‌خونی شوند. پیامد چنین وضعیتی تنها به آسایش حیوان محدود نمی‌شود بلکه کاهش عمر کاری اسب و افت کیفیت پلاسما می‌تواند برای واحد تولیدی نیز زیان‌بار باشد. از سوی دیگر، التهاب یا آسیب بافتی طولانی مدت ممکن است با تغییر ترکیب پروتئینی پلاسما و افزایش برخی پروتئین‌های التهابی و غیراختصاصی همراه شود و در نتیجه خالص‌سازی و دستیابی به محصولی با توان خنثی‌کنندگی مناسب و بار پروتئینی کمتر را دشوارتر کند. بنابراین، پایش سلامت اسب‌های هایپرایمن باید شامل ارزیابی بالینی و آزمایشگاهی منظم باشد و به‌عنوان بخشی از نظام تضمین کیفیت تولید آنتی‌سرم در نظر گرفته شود(۱-۴).

بار پروتئینی، خلوص و فعالیت اختصاصی آنتی‌سرم

یکی از شاخص‌های مهم در کیفیت آنتی‌سرم، مقدار پروتئینی است که برای ایجاد اثر درمانی به بیمار تزریق می‌شود. بر اساس راهنمای سازمان جهانی بهداشت، غلظت کل پروتئین آنتی‌ونوم ترجیحاً نباید از ۱۰ g/dL یا ۱۰۰ mg/mL بیشتر باشد و ایمونوگلوبولین‌ها یا قطعات آن‌ها



تصویر۳- نمای شماتیک عوامل اصلی مؤثر بر بروز واکنش‌های ناخواسته پس از تجویز آنتی‌سرم؛ از جمله پروتئین‌های هترولوگ، تجمعات پروتئینی، آلودگی با اندوتوکسین، ناخالصی‌های فرآیندی و شرایط تجویز فرآورده.

باید بخش اصلی پروتئین محصول را تشکیل دهند و در شرایط ایده‌آل بیش از ۹۰ درصد باشند. در تولید آنتی‌سرم، محصول مطلوب فرآورده‌ای است که با کمترین بار پروتئینی، بیشترین توان خنثی‌سازی زهر را ایجاد کند (۱).

اگر توان خنثی‌کنندگی محصول پایین باشد، برای رسیدن به اثر درمانی به حجم بیشتری از فرآورده نیاز خواهد بود. از سوی دیگر، اگر خلوص کافی نباشد، بخش بیشتری از پروتئین تزریق‌شده را اجزای غیر اختصاصی مانند آلبومین و سایر پروتئین‌های سرمی تشکیل می‌دهند؛ پروتئین‌هایی که نقشی در خنثی‌سازی زهر ندارند، اما می‌توانند بار آنتی‌ژنی فرآورده را افزایش دهند. به همین دلیل، شاخص توان خنثی‌کنندگی به ازای هر میلی‌گرم پروتئین» یا فعالیت اختصاصی، معیار مهمی برای مقایسه کیفیت بچ‌های مختلف آنتی‌سرم است. هرچه این شاخص بالاتر باشد، برای دستیابی به اثر درمانی، پروتئین خارجی کمتری وارد بدن بیمار می‌شود (۲).

کاهش بار پروتئینی از انتخاب پلاسمای هایپرایمن با توان خنثی‌کنندگی بالا شروع می‌شود. پس از آن، هضم آنزیمی، ترسیب، خالص‌سازی و کنترل مرحله‌ای باید طوری انجام شوند که پروتئین غیرضروری کم شود، بدون آنکه توان خنثی‌کنندگی آسیب ببیند. همچنین ارزیابی فعالیت آنتی‌کمپلمان می‌تواند به شناسایی برخی مشکلات کیفی مانند تجمعات پروتئینی، باقی‌ماندن آنتی‌بادی IgG هضم‌نشده یا ناخالصی‌های پروتئینی کمک کند (۴).

نوع مولکول آنتی‌بادی، هضم آنزیمی و تجمعات پروتئینی

از نظر ساختار مولکولی، آنتی‌سرم‌های درمانی می‌توانند به سه شکل اصلی تولید شوند: آنتی‌بادی IgG کامل با وزن مولکولی حدود ۱۵۰ کیلو دالتون، قطعات $F(ab')_2$ با وزن ۱۰۰ تا ۱۱۰ کیلو دالتون و قطعات Fab با وزن حدود ۵۰ کیلو دالتون. در آنتی بادی IgG کامل، بخش Fab مسئول اتصال اختصاصی به اجزای زهر است، در حالی که بخش Fc می‌تواند با سیستم کمپلمان و گیرنده‌های ایمنی تعامل داشته باشد. در فرآورده‌های $F(ab')_2$، معمولا با هضم توسط آنزیم پپسین، بخش Fc حذف می‌شود و دو بازوی Fab متصل به هم باقی می‌مانند. هدف از این کار، حفظ قدرت خنثی‌کنندگی آنتی‌بادی و کاهش برخی واکنش‌های وابسته به Fc است. برای تولید قطعات Fab نیز معمولا از هضم آنزیمی آنتی بادی IgG با آنزیم پاپائین استفاده می‌شود. از آنجا که فرآورده‌های آنتی بادی کامل IgG ، $F(ab')_2$ و Fab دارای خصوصیات متفاوتی از نظر سایز مولکولی، نیمه عمر، انتشار بافتی و میزان نیاز به دوز و تعداد تکرار هستند، انتخاب نوع مولکول و روش فرآوری ایمونوگلوبولین می‌تواند بر مواردی چون اثربخشی و بی‌ضرری آنتی‌سرم مانند ایجاد تجمعات پروتئینی تأثیرگذار باشد (تصویر ۴) (۱۰) .

تجمعات پروتئینی در آنتی‌سرم‌ها به دایمرها، الیگومرها یا ذرات بزرگ‌تری گفته می‌شود که از اتصال آنتی بادی کامل IgG، $F(ab')_2$، Fab، قطعات ناقص هضم‌شده، باقی‌مانده Fc هضم شده یا پروتئین‌های غیراختصاصی پلاسما تشکیل می‌شوند. تجمعات حاصل از این مولکول‌ها می‌توانند از دایمرهای حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ کیلو دالتون تا الیگومرهای بسیار بزرگ‌تر متغیر باشند. این تجمعات ممکن است در هر کدام از مراحل فرآوری پلاسما مانند هضم آنزیمی نامطلوب، غلظت بالای پروتئین، تنش مکانیکی، خالص‌سازی، فرمولاسیون، لیوفیلیزاسیون یا نگهداری نامناسب ایجاد شوند.

آنتی‌سرم ضد مار یا عقرب که در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تولید می‌شود از نوع قطعه دوظرفیتی $F(ab')_2$ است. در فرآورده‌های $F(ab')_2$، حذف Fc می‌تواند برخی واکنش‌های وابسته به فعال‌سازی کمپلمان را کاهش دهد، زیرا آنتی بادی IgG ، به ویژه وقتی به صورت تجمع پروتئینی باشد، به دلیل داشتن Fc توان بالقوه بیشتری برای تعامل با C1q و شروع مسیر کلاسیک کمپلمان و بروز عوارض جانبی شبه آنافیلاکسی غیر وابسته به آنتی‌بادی IgE را دارد. به همین دلیل در بسیاری از فناوری‌های تولید آنتی‌سرم، حذف Fc از طریق هضم پپسینی به‌عنوان راهی برای کاهش برخی واکنش‌های وابسته به Fc مطرح شده است. البته مطالعات مختلف نشان داده است که حذف Fc و تولید $F(ab')_2$ به‌تنهایی تضمین کننده بی‌ضرری محصول نیست. اگر هضم نامطلوب باشد و IgG کامل و قطعات ناقص IgG یا سایر اجزا پروتئین‌های سرمی در محصول باقی بمانند ممکن است موجب ایجاد تجمعات پروتئینی شده و موجب فعال‌سازی کمپلمان و تحریک واکنش‌های زودرس یا شبه آنافیلاکسی شوند (۳, ۴, ۱۰, ۱۱) .

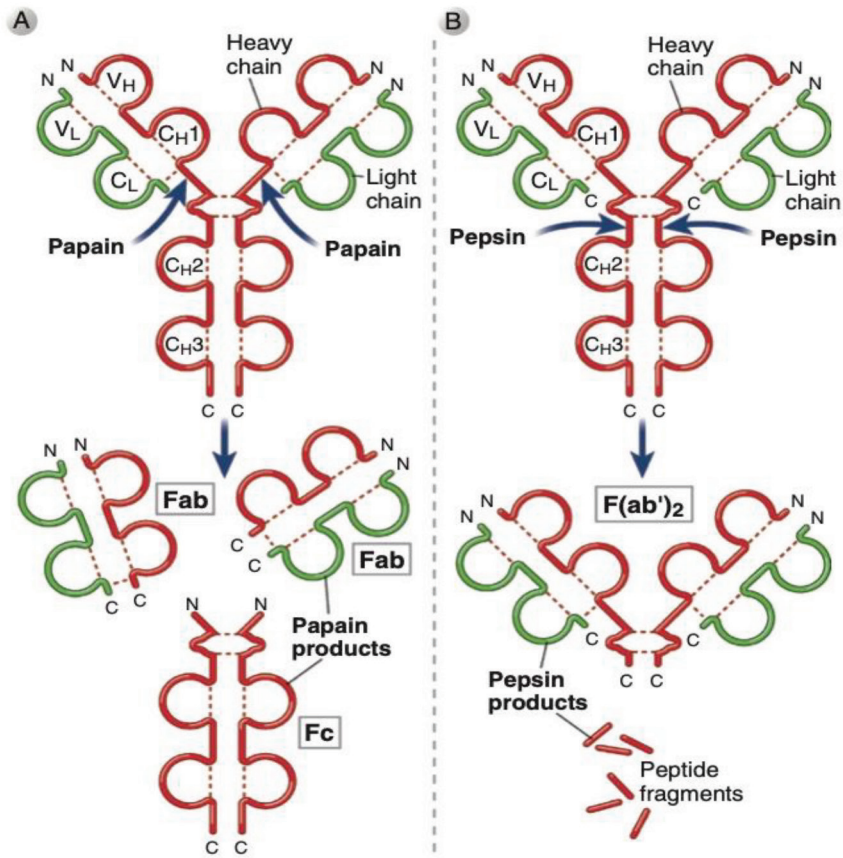
مطالعات بر روی آنزیم پپسین نشان داده است که این آنزیم در شرایط اسیدی، آنتی‌بادی IgG را در ناحیه نزدیک به ناحیه لولایی هضم می‌کند، به‌طوری که قطعه دوظرفیتی $F(ab')_2$ حفظ می‌شود و بخش Fc عمدتاً به قطعات کوچک‌تر تجزیه می‌گردد. به علاوه این آنزیم قادر است برخی از پروتئین‌های غیر آنتی‌بادی IgG را نیز هضم کند. در صورتی‌که پپسین درست کنترل نشود، خود می‌تواند منشأ ایجاد تجمعات پروتئینی شود. هضم ناکامل می‌تواند باعث باقی‌ماندن آنتی‌بادی کامل IgG شود و هضم بیش از حد می‌تواند $F(ab')_2$ را به قطعات

کوچک‌تر بشکنند؛ و تغییر غیر بهینه pH یا شرایط نمکی در زمان هضم آنزیمی می‌تواند باعث تجمع قطعات کم وزن Fc و قطعات غیر IgG هضم شده توسط پپسین و ایجاد تجمعات پروتئینی با وزن مولکولی بالا شود. به همین دلیل، pH، دما، زمان هضم و نسبت پپسین به پروتئین باید برای هر نوع آنتی‌سرم و در هر مقیاس تولیدی بهینه‌سازی و اعتبارسنجی شود تا Fc به خوبی حذف شود و تولید قطعات مناسب به خوبی انجام شود. پس از هضم، ارزیابی الگوی پروتئینی با روش‌هایی مانند SDS-PAGE، SEC-HPLC و آزمون‌های تکمیلی می‌تواند برای بررسی باقی‌ماندن IgG کامل و قطعات ناقص و تجمعات پروتئینی کارآمد باشد. تجربه بالینی با آنتی‌ونوم عقرب $F(ab')_2$ اسبی نشان داده است که فرآورده‌های خالص‌شده و کنترل شده می‌توانند با میزان پایین‌تری از واکنش‌های ناخواسته همراه باشند؛ با این حال، این بی‌ضرری نه فقط به حذف قطعه Fc بلکه به مجموعه‌ای از عوامل شامل کیفیت هضم، خالص‌سازی، فرمولاسیون و کنترل کیفیت وابسته است (۱۲, ۱۳).

کمپلکس‌های ایمنی و بیماری سرمی

کمپلکس ایمنی زمانی تشکیل می‌شود که آنتی‌ژن با آنتی‌بادی اختصاصی خود اتصال پیدا کند. این پدیده بخشی طبیعی از پاسخ ایمنی است، اما اگر کمپلکس‌ها به مقدار زیاد تشکیل شوند یا به‌خوبی پاکسازی نشوند، می‌توانند در بافت‌هایی مانند پوست، مفاصل، کلیه و دیواره عروق رسوب کنند و با فعال‌سازی کمپلمان موجب التهاب شوند. بیماری سرمی نمونه‌ای از این نوع واکنش ازدیاد حساسیت نوع III است (۱۴).

در آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب، آنتی‌ژن‌های اصلی همان پروتئین‌های هترولوگ حیوانی موجود در فرآورده هستند. این اجزا می‌توانند شامل IgG کامل، قطعات حاصل از هضم ایمونوگلوبولین، پروتئین‌های



تصویر ۴. تصویری شماتیک از برش مولکول‌های IgG توسط آنزیم‌های پاپائین (A) و پپسین (B) هضم با پاپائین موجب جداسازی دو ناحیه متصل‌شونده به آنتی‌ژن، یعنی قطعات Fab از هم و از قطعه Fc می شود. در مقابل، برش با آنزیم پپسین یک قطعه دوظرفیتی به نام $F(ab')_2$ ایجاد می کند (۱۴).

غیرایمونوگلوبولینی پلاسما مانند آلبومین، باقی‌مانده آنزیم و تجمعات پروتئینی باشند (۱-۳). پس از تزریق، بدن بیمار ممکن است علیه این پروتئین‌ها آنتی‌بادی تولید کند و تشکیل کمپلکس‌های ایمنی در گردش، در صورت رسوب بافتی، به علائم بیماری سرمی منجر شود (۳, ۷, ۱۴).

بر این مبنا خالص‌سازی آنتی‌سرم تنها می‌تواند خطر بروز علایم را کاهش دهد، اما آن را به طور کامل حذف نمی‌کند. زیرا حتی قطعات آنتی‌بادی خالص‌شده نیز منشأ حیوانی دارند. با این حال، خلوص بالاتر با کاهش پروتئین‌های غیرضروری، قطعات نامطلوب و تجمعات پروتئینی، بار آنتی‌ژنی واردشده به بدن را کمتر می‌کند. هرچه نسبت توان خنثی‌کنندگی به پروتئین بالاتر باشد، برای اثر درمانی، پروتئین خارجی کمتری تزریق می‌شود و احتمال تشکیل کمپلکس‌های ایمنی آسیب‌زا کاهش می‌یابد.

البته صرف ورود آنتی‌ژن خارجی به بدن به معنی بروز بیماری سرمی نیست. بدن در بسیاری از مواجهه‌های روزمره، عفونت‌ها یا واکسیناسیون ممکن است کمپلکس‌های ایمنی گذرا تشکیل دهد، اما این کمپلکس‌ها معمولاً محدود و قابل پاکسازی هستند. بیماری سرمی بیشتر زمانی رخ می‌دهد که مقدار آنتی‌ژن خارجی زیاد باشد، آنتی‌ژن مدت کافی در گردش باقی بماند، یا کمپلکس‌ها در شرایط مناسب برای رسوب بافتی تشکیل شوند (۱۴).

خالص‌سازی و حذف ناخالصی‌های فرآیندی

پس از تهیه پلاسما، خالص‌سازی مهم‌ترین مرحله برای کم کردن پروتئین‌های غیرضروری و ناخالصی‌های همراه است. روش خالص سازی باید توان خنثی کنندگی را حفظ کند و در عین حال پروتئین‌های غیر اختصاصی، قطعات نامطلوب ایمونوگلوبولین و باقی‌مانده آنزیم را تا حد امکان کاهش دهد. بر اساس توصیه سازمان جهانی بهداشت، ایمنوگلوبولین‌ها باید بخش عمده ترکیب پروتئینی محصول را تشکیل دهند و در شرایط ایده‌آل میزان آن‌ها در محصول نهایی بالای ۹۰٪ باشد. روش‌های خالص‌سازی مانند ترسیب با آمونیوم سولفات یا با کاپریلیک اسید بر اساس امکانات موجود و حجم تولید مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از این دو ترکیب برای تولید فرآورده‌های $F(ab')_2$ اسبی بررسی شده و یکی از رویکردهای قابل استفاده برای بهبود خلوص آنتی‌ونوم‌ها محسوب می‌شوند (۱, ۶).

انتخاب روش خالص‌سازی بر اساس توانایی آن در حفظ توان خنثی‌کنندگی، برآورد هزینه و بازده و توانایی آن در کاهش پروتئین کل و آندوتوکسین و تجمعات پروتئینی انجام می‌گیرد. هیچ روش واحدی برای همه آنتی‌سرم‌ها بهترین گزینه نیست؛ بنابراین هر فرآیند باید به‌صورت اختصاصی اعتبارسنجی شود. از منظر کنترل کیفیت خالص‌سازی زمانی موفق است که محصول نهایی دارای توان خنثی کنندگی ، پایداری و خلوص بالا و در عین حال محتوای پروتئینی، آندوتوکسین و تجمعات پروتئینی پایین باشد (۱, ۱۲).

عوامل پایروژن و کنترل آلودگی

آلودگی با مواد پایروژن یکی از فاکتورهای مهم موثر در ایجاد واکنش‌های التهابی و تب‌زا در فرد دریافت‌کننده آنتی‌سرم است. آندوتوکسین مهم‌ترین دسته از مواد پایروژن هستند که عمدتا از لیپوپلی ساکارید موجود در دیواره باکتری‌های گرم منفی نشئت می‌گیرد و حتی در مقادیر کم می‌تواند باعث فعال شدن ایمنی ذاتی و بروز تب و لرز و واکنش‌های پایروژنیک در فرد شود. از آنجا که آنتی‌سرم‌ها فرآورده‌هایی تزریقی و گاهی با حجم مصرف بالا هستند، کنترل اندوتوکسین در آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. نکته مهم در فرآیند تولید آن است که استریل بودن به معنی عاری بودن فرآورده از آندوتوکسین نیست زیرا آندوتوکسین بعد از غیرفعال شدن باکتری نیز باقی می‌ماند و با استریل‌سازی و فیلتراسیون ساده حذف نمی‌شود. به همین دلیل آزمون استریلیتی و آزمون پایروژنی دو تست مستقل در فرآیند تولید آنتی‌سرم هستند. علاوه بر آندوتوکسین‌ها، سایر اجزای میکروبی یا فرآیندی، از جمله ترکیبات حاصل از باکتری‌های گرم‌مثبت، قارچ‌ها یا بقایای سلولی، نیز می‌توانند در صورت ورود به فرآورده تزریقی موجب پاسخ تب‌زا شوند (۱).

مواد پایروژن از طریق آب، هوا، مواد اولیه و تجهیزات آلوده می‌تواند وارد فرآیند تولید شود. به همین دلیل کنترل دقیق این منابع با رعایت اصول صحیح تولید (GMP[6]) از اقدامات ضروری در فرآیند تولید محسوب می‌شود. اصول GMP مجموعه‌ای از الزامات تولیدی و کنترلی است که تضمین می‌کند فرآورده دارویی یا بیولوژیک در شرایط کنترل‌شده و مطابق با استانداردهای کیفیت تولید شود. در تولید آنتی‌سرم، رعایت GMP یعنی از ماده اولیه، محیط، تجهیزات و فرآیندها تا محصول نهایی، همگی طوری کنترل و مستندسازی شوند که خطر آلودگی و خطای تولید به حداقل برسد (۱, ۵).

6. Good Manufacturing Practice.

جدول ۱- مهم‌ترین محورهای کنترلی در فرآیند تولید آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب، اهداف کیفی و اقدام‌های پیشنهادی برای کاهش عوارض.

محور کنترلی	هدف اصلی	اقدام‌های کلیدی	منابع پیشنهادی
تولید پلاسمای هایپرایمن با توان خنثی کنندگی بالا	افزایش فعالیت اختصاصی و کاهش مقدار پروتئین تزریقی برای دستیابی به اثر درمانی	انتخاب حیوان سالم، پایش دامپزشکی، طراحی مناسب برنامه هایپرایمن سازی، کنترل خون گیری یا پلاسمافرزیس و ثبت سوابق حیوان	(۱, ۲)
کاهش پروتئین‌های غیر اختصاصی	کاهش بار آنتی ژنی، کاهش احتمال بیماری سرمی و افزایش نسبت توان خنثی کنندگی به پروتئین	کاهش/حذف پروتئین‌های غیر اختصاصی از جمله آلبومین و سایر پروتئین‌های سرمی، کنترل پروتئین کل و پایش نسبت توان خنثی کنندگی به پروتئین	(۱, ۴)
کنترل هضم آنزیمی	حذف مناسب Fc در فرآورده‌های $F(ab')_2$، حفظ توان خنثی کنندگی و کاهش قطعات نامطلوب	اعتبارسنجی pH، دما، زمان، نسبت آنزیم به پروتئین و بررسی الگوی پروتئینی پس از هضم با روش‌هایی مانند SDS-PAGE یا کروماتوگرافی	(۱, ۴, ۱۲)
بهبود خالص‌سازی	حذف ناخالصی‌ها با حفظ توان خنثی کنندگی و کاهش بار پروتئینی غیرضروری	استفاده از روش‌های مناسب رسوب‌دهی، اسید کاپریلیک، سولفات آمونیوم، فیلتراسیون، دیافیلتراسیون یا کروماتوگرافی بر اساس نوع محصول و مقیاس تولید	(۱, ۶)
کنترل اندوتوکسین و پایروژن‌ها	پیشگیری از واکنش‌های تب زا و پایروژنیک	کنترل آب، بافرها، ظروف، فیلترها، تجهیزات، محیط تولید، زمان نگهداری محلول‌ها و انجام آزمون معتبر اندوتوکسین/پایروژن در مراحل حساس	(۱, ۵)
پیشگیری از تجمعات پروتئینی	کاهش فعال‌سازی کمپلمان، فعالیت آنتی کمپلمان و واکنش‌های زودرس	کنترل pH، دما، غلظت پروتئین، تنش مکانیکی، انجماد و ذوب، فیلتراسیون کنترل‌شده، شرایط پمپ و همزن، فرمولاسیون و زنجیره سرد	(۳, ۴)
اعتبارسنجی فرمولاسیون و پایداری	حفظ توان خنثی کنندگی، شفافیت، pH، پایداری و قابلیت مصرف در طول زمان	انتخاب پایدارکننده مناسب، بررسی pH، شفافیت، رطوبت باقی‌مانده، زمان بازسازی، سازگاری با ویال/درپوش و مطالعات پایداری واقعی و تسریع‌شده	(۱, ۴)
کنترل کیفیت مرحله‌ای و نهایی	تضمین یکنواختی، بی ضرری، توان خنثی کنندگی و کیفیت بچ‌ها	آزمون‌های در حین فرآیند و محصول نهایی شامل توان خنثی کنندگی، پروتئین کل، نسبت توان خنثی کنندگی به پروتئین، اندوتوکسین/پایروژن، استریلیتی، فعالیت آنتی کمپلمان، تجمعات پروتئینی، pH، شفافیت و پایداری	(۱, ۴, ۵)

فرمولاسیون، پایداری و کنترل کیفیت مرحله‌ای

فرمولاسیون مناسب می‌تواند پایداری و بی‌ضرری محصول را تا زمان مصرف حفظ کند. انتخاب بافرو پایدارکننده و نیز تعیین غلظت نهایی پروتئین و تنظیم pH وارزیابی سازگاری با ویال و درپوش، از اجزای اصلی طراحی فرمولاسیون هستند. فرمولاسیون نامناسب می‌تواند موجب رسوب و افزایش تجمعات پروتئینی شده و در نهایت احتمال عوارض را افزایش دهد. انجام مطالعات پایداری واقعی و تسریع شده نیز برای تعیین تاریخ انقضا و شرایط نگهداری ضروری است.

کنترل کیفیت نیز زمانی مؤثرتر است که فقط در انتهای تولید انجام نشود و مراحل میانی فرآیند را نیز پوشش دهد. پایش توان خنثی‌کنندگی، پروتئین کل، الگوی پروتئینی، تجمعات پروتئینی، استریلیتی و اندوتوکسین کمک می‌کند مشکلات زودتر شناسایی و اصلاح شوند و بی‌ضرری محصول بهتر حفظ شود (۱, ۴, ۶).

با کنار هم گذاشتن این موارد، کاهش عوارض جانبی آنتی‌سرم‌ها زمانی مؤثر خواهد بود که کیفیت به صورت پیوسته در کل زنجیره تولید مدیریت شود. تولید پلاسمای با توان خنثی‌کنندگی بالا، کاهش پروتئین‌های غیراختصاصی، کنترل دقیق هضم و خالص‌سازی، پیشگیری از ورود اندوتوکسین، جلوگیری از تجمعات پروتئینی، طراحی فرمولاسیون پایدار و اجرای کنترل کیفیت مرحله‌ای می‌تواند احتمال واکنش‌های زودرس، تأخیری و پایروژنیک را کاهش دهد. به منظور جمع‌بندی مطالب، مهم‌ترین عوامل تولیدی مؤثر بر بروز یا کاهش عوارض جانبی آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب، همراه با سازوکار احتمالی اثر و راهکارهای کنترلی پیشنهادی، در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول ۱ خلاصه شده است، هر مرحله از تولید می‌تواند در بی‌ضرری محصول نقش داشته باشد؛ از وضعیت اسب تولیدکننده پلاسما تا خالص‌سازی، فرمولاسیون و کنترل نهایی (۱, ۳-۵).

توصیه ترویجی

کاهش عوارض جانبی آنتی‌سرم‌های ضد مار و عقرب از همان ابتدای مسیر تولید آغاز می‌شود. در این مسیر، سلامت اسب‌های تولیدکننده پلاسما نقش پایه‌ای دارد. حیوانی که از نظر تغذیه، وضعیت عمومی و برنامه ایمن‌سازی شرایط استاندارد و مطلوبی داشته باشد، می‌تواند پلاسمایی با کیفیت بهتر و توان خنثی‌کنندگی بالاتر تولید کند. پس از تهیه پلاسما، مرحله خالص‌سازی اهمیت زیادی پیدا می‌کند. در این مرحله باید تا حد امکان پروتئین‌های غیراختصاصی، قطعات نامطلوب ایمونوگلوبولین و تجمعات پروتئینی کاهش یابد، بدون آنکه توان خنثی‌کنندگی آنتی‌سرم آسیب ببیند. فرمولاسیون نیز باید به گونه‌ای مدیریت و اجرا شود که توان خنثی‌کنندگی و پایداری محصول تا زمان مصرف حفظ شود و خطر رسوب یا تجمع پروتئینی کاهش یابد. بنابراین، بی‌ضرری نسبی آنتی‌سرم در پایان خط تولید ایجاد نمی‌شود؛ از وضعیت اسب تولیدکننده شروع می‌شود و تا ویال نهایی ادامه پیدا می‌کند. از سوی دیگر، پزشکان، دامپزشکان و مراکز مصرف‌کننده باید پیش از تزریق، تاریخ مصرف، شرایط نگهداری و ظاهر ویال را بررسی کنند و از مصرف فرآورده‌های کدر، رسوب‌دار یا دارای شرایط نگهداری نامطمئن خودداری نمایند. رعایت سرعت مناسب تزریق و آمادگی برای مدیریت واکنش‌های زودرس نیز ضروری است.

فهرست منابع

1. WHO W. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. WHO Press Genève: OMS. 2010:1-141.
2. Morais VM, Massaldi H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases. 2009;15:2-18.
3. León G, Herrera M, Segura Á, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. Toxicon. 2013;76:63-76.
4. Squaiella-Baptistão CC, Magnoli FC, Marcelino JR, Sant'Anna OA, Tambourgi DV. Quality of horse F (ab') 2 antitoxins and anti-rabies immunoglobulins: Protein content and anticomplementary activity. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2018;24(1):16.
5. Sheraba NS, Hesham A, Fawzy M, Diab E, Basuony ME, Yassin AS, et al. Advanced approaches for endotoxin detection and removal from snake antivenoms. Toxicon. 2023;222:107003.
6. Simsiriwong P, Eursakun S, Ratanabanangkoon K. A study on the use of caprylic acid and ammonium sulfate in combination for the fractionation of equine antivenom F (ab′) 2. Biologicals. 2012;40(5):338-44.

7. de Silva HA, Ryan NM, de Silva HJ. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. British journal of clinical pharmacology. 2016;81(3):446-52.
8. Sutherland SK. Serum reactions an analysis of commercial antivenoms and the possible role of anticomplementary activity in de-novo reactions to antivenoms and antitoxins. Medical Journal of Australia. 1977;1(17):613-5.
9. Pineda ID, Ruiz JR. Purpura in serum sickness: a case of polyvalent snake antivenom reaction following Porthidium ophryomegas envenomation. Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology. 2025;54(2):1-8.
10. Gutiérrez JM, Leon G, Lomonte B, Angulo Y. Antivenoms for snakebite envenomings. Inflammation & Allergy-Drug Targets. 2011;10(5):369-80.
11. Morais V. Antivenom therapy: efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases. 2018;24(1):7.
12. Boyer L, Degan J, Ruha A-M, Mallie J, Mangin E, Alagón A. Safety of intravenous equine F (ab') 2: insights following clinical trials involving 1534 recipients of scorpion antivenom. Toxicon. 2013;76:386-93.
13. Jones RGA, Landon J. Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F (ab′) 2 fragments in high yield from serum. Journal of immunological methods. 2002;263(1-2):57-74.
14. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Henrickson S. Cellular and molecular immunology E-Book: cellular and molecular immunology 11th edition: Elsevier Health Sciences; 2025.