

AKREP ANTİVENOM ÜRETİMİ

Scorpion Antivenom Production

Özcan ÖZKAN

Refik Saydam Hıfzısıhha
Merkez Başkanlığı,
ANKARA

İletişim:
Özcan ÖZKAN
Refik Saydam Hıfzısıhha
Merkez Başkanlığı
Cemal Gürsel Cad. 18
ANKARA
Tel: 0 312 498 21 50-1135
e-posta: ozcan.ozkan@rshh.gov.tr

ÖZET

Akrep hastalık etkenlerini taşımazlar, ancak çoğu zaman kendilerini korumak amacıyla, insan ve hayvanları sokarak zehirlenmeye neden olurlar. Skorpionizm vakalarının tedavisinde halen kullanılan tek metot akrep antivenom tedavisidir. Antivenom at, koyun, keçi veya deve gibi hayvanlara küçük miktarlarda venom enjeksiyonu ile üretilmektedir. Bu hayvanlarda venomun aktif molekülüne karşı immün bir yanıt gelişir. Hayvanların kanında üretilen antikorlar hayvanlardan düzenli aralıklarla alınır. Toplanan kandan plazma ayrılır. Farklı kimyasal yöntemlerle saflaştırılır ve akrep sokmalarının tedavisinde kullanılır. Türkiye’de, akrep antivenomu 1942 yılından beri Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı’nda üretilmektedir. Bu derlemede, akrep antivenom üretim protokolü hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Akrep, antivenom, üretim, protokol

ABSTRACT

Scorpions do not harbor agents of disease but, they cause envenomations by stinging humans and animals, most of the time to protect themselves. Scorpion antivenom treatment is still the only method used for therapy of scorpionism cases. Antivenom is produced by injecting a small amount of the venom into an animal such as horse, sheep, goat, or camel. These animals develop an immune response against the venom’s active molecule. Antibodies produced in animal’s blood were taken in regular intervals. Plasma was separated from collected blood. It purified by different chemical process and used to treat of scorpion stings. In Turkey, scorpion antivenom has been produced in Refik Saydam Hygiene Center since 1942. The protocol of scorpion antivenom production was explained in this study.

Key Words: Scorpion, antivenom, production, protocol

GİRİŞ

Akrepler, hayvanlar aleminin Arthropoda şubesi, Chelicerata altşubesi, Arachnida sınıfı, Scorpiones takımında yer alan, üzerleri kalın bir kitin tabakası ile kaplı, ergin bireylerinin uzunlukları 130220 mm arasında değişen eklem bacaklılardır (13). Varlığı ve zehirlilikleri çok eski çağlardan beri bilinen akrepler, hastalık etkenlerini taşımazlar. Ancak çoğu zaman kendilerini korumak amacıyla, insan ve hayvanları sokarak zehirlenme ve ölümlere neden olabilirler (4,5). Bu nedenle akrep sokması sonucu meydana gelen zehirlenmeler (skorpionizm) tropikal ve subtropikal bölgelerde halk sağlığını tehdit etmektedir (4-6).

Skorpionizm Ülkemizin coğrafi konumu, iklim koşulları ve sosyo-ekonomik yapısı itibarı ile görülmekte olup, özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde önemli bir halk sağlığı sorunudur (1, 5, 6). Türkiye'de skorpionizme neden olan en önemli akrep türleri *Buthidae* ailesinden *Androctonus*, *Leiurus* ve *Mesobuthus* cinsine ait türlerdir (1, 5, 6). Bunlardan *Androctonus crassicauda* türünden elde edilen venom, antivenom üretiminde antijen olarak kullanılmaktadır (7, 8). Türkiye'de görülen skorpionizm vakalarında, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) tarafından üretilen ulusal antivenom kullanılmaktadır (7-9). Dünyada skorpionizm vakalarına karşı kullanılan tek ve özgün sağaltım seçeneği antivenom kullanımıdır (10-13). Bu makalede, ülkemizde kullanılan antivenom üretim protokolüne yönelik bilgiler sunulmuştur.

ANTİVENOMUN ÜRETİMİNİN TARİHÇESİ

İlk antitoksin çalışmaları difteri ve tetanoz hastalıklarının tedavisine yönelik olarak von Behring ve Kitasato tarafından yapılmıştır (Şekil 1). Bu çalışmaların takiben Calmette tarafından 1894 yılında deneysel olarak tavşandan yılan venomuna karşı ilk antivenom üretilmiştir (12, 13).

Akrep telsonlarından maserasyon yöntemi ile venom elde etme çalışmaları 1872 yılında Jousset de Bellesme tarafından başlatılmıştır (14). Bu yöntem geçmişte olduğu gibi günümüzde de birçok araştır-

mada ve antivenom üretiminde halen kullanılmaktadır. İlk akrep antivenom üretimi, Todd tarafından 1909 yılında gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda Cezayir (1936), Türkiye (1942), Tunus (1958), Bombay (1961) ve İran (1965) da akrep antivenom üretimine başlanmış (14) ve günümüzde de üretime devam edilmektedir.



Şekil 1. Atlardan ilk antitoksin üretimi (Shore, 2002).

Türkiye'de akrep antivenomu, 65 yıl ara verilmeden RSHMB bünyesinde üretilmektedir (7-9). Türkiye'de *Androctonus crassicauda* türünden elde edilen venomun, antivenom üretiminde antijen olarak kullanılmaktadır (7, 8). *A. crassicauda* venomuna karşı üretilen antivenomun, diğer akrep türlerinin (*A.australis*, *Buthus occitanus* [Cezayir], *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis* [Brezilya], *Parabuthus* spp. [Güney Afrika], *Centruroides sculpturatus* ve *C. vittatus* [ABD] (15), *Leiurus quinquestriatus*, (9) *Mesobuthus gibbosus* (16) sokmalarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir.

Başlangıçta saflaştırılmadan kullanılan at kaynaklı serumlar çok ciddi reaksiyonlarla birlikte, bazen venomun kendisi kadar tehlikeli sonuçlara neden olmuştur. Bu bağlamda antivenom üretimine yönelik araştırma ve geliştirme çalışmaları geçmişten günümüze kadar devam etmiştir (10, 12, 17).

ANTİVENOM İÇİN ÜRETİM HAYVANININ SEÇİMİ

Antivenom üretiminde at, keçi, koyun, deve ve embriyolu tavuk yumurtası (ETY) kullanılmaktadır (7, 8, 10-12, 18-21). ETY ile daha spesifik ürün elde edilmesine karşın saflaştırma (pürifikasyon) sisteminden kaynaklanan oldukça büyük maliyete sahiptir. Antivenom üretiminde bakım kolaylığı, adaptasyon yeteneğinin yüksek olması, üretim sürecinde diğer hayvanlara göre daha fazla serum elde edilmesi ve saflaştırma yönteminin iyi gelişmiş olması nedeniyle yaygın olarak at modeli kullanılmaktadır (10, 17, 21).

Antivenom üretiminde kullanımı planlanan hayvanlar, üretim sürüsüne alınmadan önce en az bir ya da iki ay izole edilmiş bir mekânda karantinaya alınmalıdır. Karantina süresince hayvanlara değişik testler uygulanır (18, 19, 22). Hastalık etkeni taşıma-

yan hayvanlar çeşitli aşılama ve antiparaziter tedavi programına alınır (Tablo 1). Karantina sonucunda veteriner hekim denetimindeki hayvanlardan; sağlıklı, kondisyonlu, genç, kuvvetli hayvanlar seçilerek üretime alınır (18, 19, 22).

Seçilen hayvanlarda yapılması gereken bazı rutin testler ve kontroller bulunmaktadır:

Ruam (Glanders-Malleus Rotz); akut ve kronik seyirli, bulaşıcı, zoonoz bir hastalıktır. Enfeksiyon atlarda kronik seyirlidir. Enfekte hayvanlar ve taşıyıcılar enfeksiyon kaynağıdır. Ruam, Kuzey Amerika, Batı ve Orta Avrupa'da eradike edilmiştir. Ancak Doğu Avrupa ve Asya'da hala görülmektedir. Bu nedenle hem üretim sürüsünün sağlığı açısından hem de elde edilen biyolojik ürünün güvenliğinin sağlanması için kullanılan atlara intradermik mallein testi uygulanır ve test sonuçları değerlendirilir (Tablo 2), (23, 24).

Tablo 1. Sağlık raporu, üretim için uygun olan atlar üretim sürüsüne alınmadan önce uygulanacak aşılama, aşı takvimi, antiparaziter tedavi planı ile yapılması gereken kontroller.

AŞI TAKVİMİ						
AŞI	UYGULAMA	0. GÜN	1.AY	2.AY	6.AY	12.AY
Tetanoz	IM	√	√	√	–	√**
Influenza	IM	√	√	–	–	√**
Rhinopneumonia	IM	√	√	–	√*	√**
Gazlı Gangren	IM	√	√	–	–	√**
Kuduz	IM	–	–	√	–	√**

*: Altı ayda bir tekrarlanır. **: Her yıl tekrarlanır.

Antiparaziter Tedavi Planı				
Tedavi	Uygulama	40. Gün	60. Gün	70. Gün
Endoparazit	Derialtı (SC)	√	√	√
Ektoparazit	Pülverizatör	√	–	–

Kontroller	
Serolojik Muayene	3 ayda bir
Paraziter Muayene	3 ayda bir
Tam Biokimya Analizi	İmmünizasyon öncesi/sonrası
Tam Kan Analizi	İmmünizasyon öncesi/sonrası

Tablo2. İntradermik Mallein uygulamasından üç gün sonra oluşan reaksiyon sonucu deri kalınlığındaki değişikliğe göre testin değerlendirilmesi

Deri Kalınlığı	Değerlendirme;
5 mm veya>	Pozitif (+)†
3-5 mm (4.9 dahil)	Şüpheli (?)
0-3 mm (2.9 dahil)	Negatif (-)

† Pozitif değerlendirilen hayvanlar; Hayvan Sağlığı ve Zabıtası (23) ve Ruam savaş yönetmeliğinde (24) belirtilen ve bildirilen prosedürler ivedilikle uygulanır.

Üretim yapılan ülkenin coğrafi ve epidemiyolojik verilerine uygun olarak Tablo 3'de gösterilen diğer enfeksiyonlar yönünden karantinada bulunan atlara serolojik testler uygulanır. Test değerlendirmeleri sonunda negatif kabul edilen atlar aşılabilir (18, 19, 22, 25).

Uygulanan tüm işlemler hayvanların kimlik kartlarına kayıt edilerek üretim sürüsüne dahil edilirler. Üretime alınan hayvanlar, immunizasyona başlamadan önce ayrı olarak yedi gün karantinada tutulur. Üretim öncesi karantinaya alınan hayvanların genel sağlık durumlarına ait veriler kayıt edilir. Bu süre sonunda veteriner hekim denetiminde immünizasyon programına uygun olan hayvanlar immünizasyon için hazırlanır (18,19,22).

VENOM ELDESİ

İçeriğindeki etken maddelerin çeşitliliği nedeniyle fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarda, araştırma materyali olarak sıkça kullanılan akrep zehiri, akreplerin telsonunda (Şekil 2) bulunan zehir bezlerinden salgılanır ve birçok protein, peptid ve biyolojik yönden etkin bileşiklerden oluşan nörotoksik etkili bir salgıdır (4, 5, 14, 26, 27) (Şekil 3). Venomun toksisitesi, bölgeden bölgeye ve aynı tür içerisinde bile değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle akrep sokması sonucu oluşan zehirlenmelerde; akrebin türü, beslenme durumu, zerk edilen zehir miktarı ve içeriği, sokma sayısı, hastanın yaşı, kilosu, sağlık durumu ve bölgenin iklimi gibi faktörlere bağlı olarak değişik klinik tabloların oluşabileceği vurgulanmıştır

Tablo3. Üretim yapılan ülke ve ithal edilme durumu göz önüne alınarak hayvanlarda araştırılması gereken viral enfeksiyonlar

Atların Viral Enfeksiyonları
<i>Eastern, Western & Venezuelan Equine encephalitis viruses*</i>
<i>St Louis encephalitis virus (SLEV)*</i>
<i>Japanese B encephalitis virus*</i>
<i>Vesicular stomatitis virus (VSV)*</i>
<i>Equine herpes virus, tip 1-5*</i>
<i>West Nile fever virus (WNV)*</i>
<i>Reovirus tip 1-3*</i>
<i>Equine influenza virus*</i>
<i>Equine morbilli virus (Hendra)*</i>
<i>Borna disease virus*</i>
<i>Equine rotavirus</i>
<i>Equine and bovine papillomaviruses (EqPV 1-2 ve BPV 1-2)</i>
<i>Equine infectious anaemia virus (EIAV)</i>
<i>Equine arteritis virus</i>
<i>African Horse Sickness (Orbi)</i>
<i>Equine parvovirus</i>

*: Zoonotik enfeksiyonlar.

(4-6, 28). Ayrıca araştırmalarda ve antivenom üretiminde venom kaynağı olarak kullanılan telsonların nakil koşulları, kurutma yöntemi, depolanması ve kullanım süresi gibi faktörlerin de venom toksisitesi üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (14, 29).



Şekil 2. Akreplerin, savunma ve beslenmede kullandıkları, içinde oval armut şeklinde zehir bezinin bulunduğu son segment (Özkan, 2005).



Şekil 3. Elektrik akımı ile istem dışı olarak elde edilen şeffaf venomun görünüşü.

Üretimi yapılacak antivenomun kökeni (orijini) belirtilmelidir. Kaynağa yönelik bu bilgiler içerisinde akrebin türü ve bölgesinin tam olarak tanımlanması gereklidir (18, 22).

Venom eldesinde maserasyon ve elektriksel uyarımla sağım yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

a) Maserasyon Yöntemi: Akrep telsonlarının kahve değirmeninde öğütülmesinden elde edilen tozun fizyolojik tuzlu su (FTS) ile +4° C' de 72 saat süre ile yapılan ekstraksiyon işlemidir (7, 28, 29).

b) Elektriksel Uyarılarla Sağım Yöntemi: 0-50 V'luk bir elektrik kaynağı ile canlı akreplerin telson bölgesine verilen elektrik akımı ile zehirin akrepten istem dışı olarak elde edilmesidir. Sağım sonucu elde edilen zehir, FTS ile sulandırılır ve liyofilize edilerek -20 ° C de kullanıncaya kadar muhafaza edilir (29).

LETALİTE TESTLERİ

Maserasyon veya elektrik uyarımı ile elde edilen venomun memeliler için toksik düzeylerinin belirlenmesi amacıyla küçük laboratuvar hayvanları (fare, sıçan) üzerinde yapılan testlerle, hayvanlarda görülen intoksikasyon semptomları ve öldürücü olan venom miktarları (mg/kg) tespit edilir.

Lethal Doz 50 (LD₅₀): 18-20g ağırlığında erkek veya dişi farelere farklı konsantrasyonlarda hazırlanan venom solusyonlarının deri altı yolla uygulanmasını takiben farelerin 24-48 saat süre ile

izlenerek ölen hayvan sayısına göre istatistiki yöntemler yardımı ile LD₅₀ sinin hesaplanması ile venomun toksisitesi belirlenir (7, 10, 17, 29-31).

Behrens & Karber ve Spearman Karber ile LD₅₀ Hesaplama için genellikle, 18-20 g ağırlığında en az 5 en fazla 10 tane fare kullanılır, 0.5 ml içerisinde venom deri altı, periton içi ya da damar içi yollarından biri kullanılarak artan miktarlarda verilir. Geometrik ilerleme ile venom miktarları seçilir. Dozlar % 0100 mortalite aralıklarına çekilmelidir. Hayvanlar 24 ya da 48 saat gözlenerek, ölen sayıları kayıt edilerek ve aşağıdaki formüller ile LD₅₀ hesaplanır (25, 28);

Spearman Karber;

$$\text{Log}_{10} \text{LD}_{50} = - (X_0 - d/2 + d \sum ri/n)$$

X ₀	:	% 100 öldüren Log ₁₀ konsantrasyonu
D	:	Dilasyon faktörü
n	:	Hayvan sayısı
ri	:	Her bir venom dozunda ölen hayvan sayısı

Behrens ve Karber;

$$\text{LD}_{50} = \text{LD}_{100} - a.b + \dots + a.b/n$$

a	:	Birbirini izleyen iki doz arasındaki fark;
b	:	Birbirini izleyen iki dozdan ileri gelen ölümlerin aritmetik ortalaması;
n	:	Her bir gruptaki hayvan sayısı

Minimal Lethal Doz (MLD): 150 g ağırlığında erkek sıçan alınarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan venom solusyonlarının deri altı yolla uygulanmasını takiben üç saat süre sonunda ölen hayvan sayısına göre en düşük öldüren doz olarak belirlenir (7, 32, 33).

İMMUNİZASYON PLANI

Venomun toksisitesine bağlı olarak, kullanılacak venom miktarı(ları) değişkenlik gösterebilmektedir. Preinsip olarak sublethal dozla başlanır ve artan dozlar şeklinde hayvanlar immunize edilir (7). Bu

nedenle üretim sürüsüne dahil edilen hayvanlara antivenom üretimine yönelik antijen olarak kullanılan venomun LD₅₀ (Tablo 4-5) ve MLD (Tablo 6-7) toksisite değerine göre başlangıç immunizasyon planı ile üretim tekrarında uygulanacak immunizasyon planları Tablo 5 ve 7'de açıklanmıştır.

BİOASSAY

Hayvanların boyun bölgesinden *Vena Jugularis dextera/sinistra*'dan kan alınır (7, 35). Kan alma işleminde de enjeksiyonda olduğu gibi saha temizlenir ve dezenfekte edilir (18). Alınan kan örneği (20 ml) 5,000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek serum örneği hazırlanır (32).

Tablo 4. Üretim sürüsüne alınan hayvanlara LD₅₀ değerine göre venomun uygulanan başlangıç immunizasyon planı.

LD ₅₀ Göre İmmünizasyon Planı		
Gün	Venom (mg)	Adjuvant
0	1mg	CFA [†]
14	2 mg	IFA [†]
21	4mg	AlOH
28	8mg	AlOH [†]
35	10mg	AlOH [†]
42	15mg	AlOH [†]
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA [°]		
45	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
48	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
51	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
51-70	İSTİRAHAT	

[†] Complete ve Incomplete Freund's Adjuvantları, Ribi Adjuvant Sistemi, TiterMax® Adjuvant Sistemi ya da diğer adjuvant sistemleri üretici tarafından tercih edilebilir (31). [°] Kan alma prosedüründe; toplam kan alımı üretici tarafından kullanılan prosedüre göre değişmektedir.

Tablo 5. Birinci immunizasyon sonucu istirahate ayrılan hayvanlara üretim tekrarında uygulanan immunizasyon planı

II. İMMÜNİZASYON (Üretim Tekrarı)		
Gün	Venom (mg)	Adjuvant
70	2 mg	IFA
77	4 mg	AlOH
84	8 mg	AlOH
91	10 mg	AlOH
98	12 mg	AlOH
105	15 mg	AlOH
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA		
108	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
111	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
114	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
114-140	İSTİRAHAT	

Tablo 6. Üretim sürüsüne alınan hayvanlara MLD değerine göre venomun uygulanan başlangıç immunizasyon planı.

MLD Göre İmmünizasyon Planı		
Gün	Venom (telson) mg	Adjuvant
0	180 mg	CFA
14	360 mg	IFA
21	720 mg	AIPO
28	1000 mg	AIPO
35	1000 mg	AIPO
42	1500 mg	AIPO
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA		
45	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
48	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
51	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
51-70	İSTİRAHAT	

Tablo 7. Birinci immunizasyon sonucu istirahate ayrılan hayvanlara üretim tekrarında uygulanan immunizasyon planı.

II. İMMÜNİZASYON (Üretim Tekrarı)		
Gün	Venom (telson) mg	Adjuvant
70	360 mg	IFA
77	720 mg	AIPO
84	1000 mg	AIPO
91	1000 mg	AIPO
98	1500 mg	AIPO
105	2000 mg	AIPO
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA		
108	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
111	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
114	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
114-140	İSTİRAHAT	

LD₅₀'ye Göre Etkili Doz 50 (ED₅₀) Belirleme; alınan kan serum örnekleri farklı oranlarda hazırlanarak LD₅₀'si belirlenen venomun 50 katı ile karıştırılır. Oluşan karışım oda sıcaklığında bir saat veya 37°C de yarım saat nötralizasyona bırakılır. Her bir karışım en az altı adet 1820 g ağırlığında, sağlıklı er-

kek veya dişi fareye derialtı yolla uygulanır. Aynı özellikteki farelere kontrol grubu olarak 5 LD₅₀ venom verilir. Hayvanlar 24 ya da 48 saat gözlem altında tutularak yaşayan hayvan sayısına göre istatistiki yöntemler yardımı ile ED₅₀'sinin hesaplanması ile serum örneğinin potensi belirlenir (7, 10, 17, 31, 35-37).

MLD'e Göre Etkili Doz Belirleme; venomun sıçanlarda belirlenen MLD sabit tutularak alınan kan serum örnekleri farklı oranlarda hazırlanarak iki MLD venom miktarı ile karıştırılır. Oluşan karışım oda sıcaklığında bir saat nötralizasyona bırakılır. Her bir karışım en az iki adet 150 g erkek sıçana derialtı yolla uygulanır. Aynı özellikteki sıçanlara kontrol grubu olarak iki MLD venom verilir. Hayvanlar üç saat gözlem altında tutularak yaşayan hayvan sayısına göre etkili serum dozu belirlenir. Yapılan bioassay değerlendirme sonunda immunizasyonu tamamlanan atlardan kan alma işlemi gerçekleştirilir (7, 32, 33, 37).

KANALMA

Üreticinin kullandığı prosedüre bağlı olarak immün hayvanlardan kan alma işlemleri apheresis veya plasmapheresis yöntemleri kullanılarak yapılır. Apheresis yönteminde hayvandan alınan kandan plazma ayırışım sonrası kanın şekilli elemanları kullanılmazken, plasmapheresis işleminde plazma ayırışımı sonunda kanın şekilli elemanları tekrar hayvana geri verilir. Bu yöntemler;

a) Apheresis: İmmünizasyon ve hiperimmünizasyon periyodu boyunca önceden hazırlanan üretim planına sadık kalınarak antikor titresini yüksek olan atlardan kan alınır. Atlardan kan boyun bölgesinden Vena jugularis dextra/sinistra'dan alınır. Kan alma işleminde de enjeksiyonda olduğu gibi saha temizlenir ve dezenfekte edilir. Önceden hazırlanmış steril toraklar yardımıyla V. jugularise girilerek 46 litrelik steril sitratlı cam silindirlere veya steril kan torbalarına kan alınır (Şekil 4). Alınacak miktar hayvanın kondisyonuna ve ağırlığına göre 35 litre olabilir. Kan alma işleminden sonra saha dezenfekte edilerek kompres uygulanarak olası kanamalar önlenir (7, 21, 22).

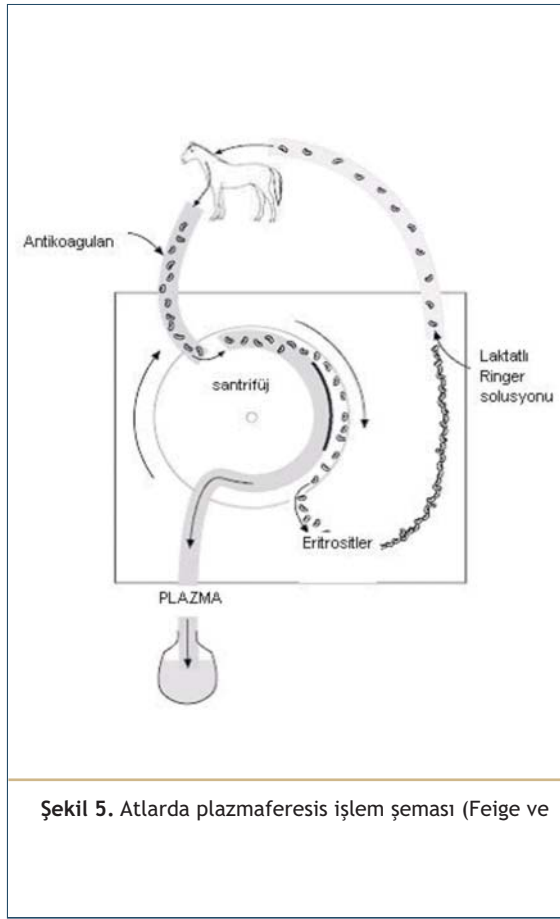
Kanın pıhtılaşmasını önleyen antikoagulan madde olan Trinatryumsitratdehidrat %15'lik çözeltisi (saf su/trinatryumsitrat dehidrat; 1000 ml:15 gr) kullanılmaktadır. Hazırlanan çözeltiden steril cam silindirlere hacminin %10'u oranında (6 000 ml : 600 ml sodyum sitrat çözeltisi) steril şartlarda konulur (32, 41).

b) Plasmapheresis: İmmünizasyon ve hiperimmünizasyon periyodu boyunca önceden hazırlanan üretim planına sadık kalınarak antikor titresini yüksek olan atlara Plasmapheresis işlemi uygulanır; Atların boyun bölgesinden V. jugularis dextra/sinistra sahaları traş edilir. Bu bölgeler antiseptikler yardımıyla dezenfekte edilir. Dezenfekte edilen saha lokal anestezi preparatlarla kateter uygulaması için hazırlanır. V.jugularise kateter yerleştirilerek Plasmapheresis cihazından kan akış hızı (70-100ml/dk) ayarlanır. Cihaz tarafından plazma ayırma işlemi sonunda kanın şekilli elemanları laktatlı ringer solusyonu ile hayvana geri verilir. Ayrılan plazma (steril plazma torbasında) toplanarak plasmapheresis işlemi tamamlanır (39, 40) (Şekil 5).

Kanların Muhafazası: 4-6 litrelik (apheresis sonucu) steril sitratlı cam sedimantasyon silindirlerine veya steril kan torbalarına (Şekil 5) alınan kanlar 4-



Şekil 4. Boyun bölgesinden Vena jugularis sinistra'dan apheresis yöntemiyle kan alınma işlemi.



Şekil 5. Atlarda plazmaferesis işlem şeması (Feige ve

8°C 'de soğuk odada, plazma ayrışması süresince muhafaza edilir ve cam sedimentasyon silindiri veya kan torbaları üzerine, alınan kana ait bilgiler (hayvanın üretim numarası; üretim tarihi; potens durumu) kaydedilir (41).

PLAZMANIN ELDE EDİLMESİ

Steril sitratlı cam sedimentasyon silindirlerine veya steril kan torbalarına aseptik şartlarda atlardan alınan kan, soğuk odada (4 - 8°C 'de) 10 gün bekletilir. Bu süre içerisinde, cam sedimentasyon silindirlerindeki kanın 2/3'ü plazmadan, 1/3' ü kanın şekilli elementlerinden oluşur. Oluşan plazma hayvanın beslenmesine bağlı olarak açık kehribar renginden açık yeşil renge kadar değişen renklerde olabilmektedir

(41). Aseptik şartlarda plazma steril cam silindirlere veya steril plazma torbasına aktarılır. Bu aktarma işlemi sırasında; sepsi/asepsi kurallarına uygun ve dibde çökmüş olarak bulunan eritrositlerin (alyuvarların) plazma ile birlikte çekilmemesine dikkat edilir. Dikkat edilmediği takdirde eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan hemoglobinin plazma renginin değişmesine neden olur (41).

Plazma Alma İşlemi Sırasında Dikkat Edilecek Başlıca Hususlar: Plazmanın hemolize olmaması için kan doğrudan akıtılmamalı, cam silindirin cidarından kanın kayarak akması sağlanmalıdır. Akan kan sitrat çözeltisi ile yavaş yapılan dairesel hareketlerle kan/sitrat karışımı homojenize edilmelidir. Üretim maliyetine yönelik tek kullanımlık cam silindirler kullanılmıyorsa, cam silindirlerin temizlenmesi işleminde kesinlikle deterjan kullanılmamalıdır. Şayet deterjan ile yıkama yapılırsa iyice durulandıktan sonra tekrar saf sudan geçirilmelidir (41).

Krezol Çözeltisinin Hazırlanması ve Plazmaya Katılması: Koruyucu madde olarak hazırlanan krezol çözeltisi (sodyum krezol: dietileter; 2:1) plazmaya % 0,45 oranında ilave edilir. Plazma krezol çözeltisi ile homojen hale getirilerek karanlıkta ve soğuk odada 4 - 8°C 'de muhafaza edilir (41).

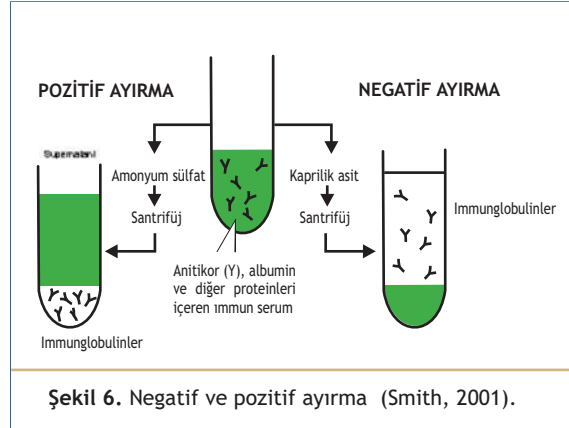
Plazmanın Saklanması Dikkat Edilecek Hususlar: Plazmanın donmamasına çok dikkat edilmelidir. Plazma 0 °C'de muhafaza edilirse 5 yıl süre ile etkinliklerinden (potens) hemen hemen hiçbir kayıp olmaz. Ancak 5°C'de ve karanlıkta muhafaza edildikleri takdirde plazmaların etkinliklerinde; her yıl azami %5, 20 °C 'de %20, 37°C 'de %50 oranında kayıp meydana gelmesine karşın saflaştırılmış ve konsantre serumlarda ise kayıp çok daha az olmaktadır. 0-5°C 'de muhafaza edilirlerse hemen hiçbir kayıp olmamakla birlikte 15°C ' yılda ortalama %3, 20°C ' yılda ortalama %5, 37°C 'de ise saflaştırılmış ve konsantre serumda %10-20 oranında kayıp olur. Bu nedenle raf ömrü süresinde meydana gelebilecek sıcaklık değişimindeki kayıplara karşılık olarak, tevzi aşamasında %20-25 fazla antivenom konulmaktadır (38).

SAFLAŞTIRMA İŞLEMİ

Kullanılan saflaştırma yöntemi Ulusal kontrol otoritesi tarafından onaylanmalıdır (22). Antivenomların çoğu ya kısmen saflaştırılmış immunglobulin G (IgG) ya da antijenin bağlandığı fragment (F(ab')₂) kullanılarak hazırlanmaktadır (10-19).

Pozitif Ayırma: Alınan plazmalar bir araya getirilir (Protein miktarı 70 mg/ml). Plazma protein miktarı 40 mg/ml olacak şekilde steril distile su ile seyreltilir. Seyreltilmiş plazmanın pH'sı 2N HCL ile 3,2 ayarlanır. pH 3,2 olan plazmaya 1:8 oranında Pepsin ilave edilir. Bir saat 37°C de yavaş bir şekilde karıştırılır ve peptik parçalama işlemi başlatılır. Ön parçalama işlemi sonunda plazmanın pH'sı 2N NaOH ilave edilerek 4,3'e ayarlanır. Plazma ısı oda sıcaklığına ayarlanır (22-24 °C), pH'sı 4,3 olan plazma karışımına %14'ü amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) tuzu olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilir. Oda sıcaklığında olan plazma bir saat yavaş bir şekilde karıştırılır. Plazma karışımının sıcaklığı 56°C yükseltilir. Bir saat sonunda plazma sıcaklığı 40°C ye indirilir. İstenmeyen proteinlerin çökmesi sağlanır ve Whatman K300 filtre kağıdı ile filtrasyon işlemi yapılır. Bu filtrasyon sonunda, filtrat ve çöküntü kısmı ayrılmış olur. Filtrat kısmı alınarak pH 7,2 olarak ayarlanır. pH'sı 7,2 olan plazma karışımına % 31'i amonyum sülfat tuzu olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilir. Oda sıcaklığında olan plazma bir saat yavaş bir şekilde karıştırılır. İmmunoglobulinler çöker (Şekil 6). Tekrar filtrasyona tabi tutulur ve çöküntü kısmı alınır. Amonyum Sülfat tuzundan ayırtmak için diyaliz işlemine tabi tutulur ve steril FTS (%0,85 NaCl) ilave edilerek serum hazırlanır (Şekil 7), (42-46).

Negatif Ayırma: F(ab')₂ İmmunoglobulin solusyonu (Protein miktarı 70 mg/ml) 1,76 N asetik asit ile pH 5,8 ayarlanır. Bu karışıma %2,5 kaprilik asit ilave edilir. Bir saat süre ile kuvvetlice karıştırılır. Karışım, 5000 x g, 30 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve çöküntü atılır (Şekil 6). Süpernatant F(ab')₂ ultrafiltrasyon yapılır. pH 1 N NaOH ilave edilerek 6,8-7,0'e ayarlanır. İmmunoglobulin F(ab')₂ antivenom hazırlanır (42-46).



Şekil 6. Negatif ve pozitif ayırma (Smith, 2001).



Şekil 7. Saflaştırılmış ürün (Özkan, 2001).

STANDARDİZASYON VE KALİTE KONTROL TESTLERİ

Antivenom üretiminde, son ürüne uygulanan kalite kontrol testleri, ulusal ve uluslararası standartlarla belirlenmiştir (18, 19, 22, 47, 48). 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete de yayımlanarak yürürlüğe Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri Tebliğlerine (96/7-8-9) uygun olmalıdır (48-51).

Gelişen ülkelerde dahi akrep sokmaları sonucu zehirlenme vakaları yaygın olarak görülmektedir (17). Bu nedenle yüksek kalitede, ucuz, standardize edilmiş antivenom ulusal kontrol otoritesi tarafından kontrol edilmelidir (18, 19, 47). Antivenom hazırlama prosedürleri ulusal ve uluslararası düzeyde iyi üretim uygulamaları (İÜU-GMP) ilkeleri gerekleri yanısıra WHO, US farmakopesi ve Avrupa

farmakopesindeki öneriler de dikkate alınarak hazırlanmalıdır (12, 47, 48).

KAYNAKLAR

- Özkan Ö, Karaer Z. Türkiye akrepleri. *Türk. Hij. Den. Biyol. Derg.* 2003; 60(2): 55-62.
- Özkan Ö, Karaer Z. Akreplerin Vücut Yapıları. *T.Parazitol Derg.* 2004; 28 (1): 54-58.
- Özkan Ö, Yaman N. Akrepler. *Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Bülteni.* Ankara, Kasım, 2004; 15-18.
- Özkan Ö, Yaman N. Akrep Zehri. *Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Bülteni.* Ankara, Şubat, 2004; 19-22.
- Ozkan O, Kat I. *Mesobuthus eupeus* scorpionism in Sanliurfa region of Turkey. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2005; 11(4), 479-491.
- Ozkan O, Kat I. *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807) scorpionism in Sanliurfa region of Turkey. *Acta Parasitologica Turcica.* 2006; 30(3), 239-245.
- Ozkan O, Adıgüzel S, Ates C, Bozyigit I, Filazi A. Optimization of Antiscorpion Venom Production. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2006; 12(2), 297-309.
- Tulga T. Scorpions found in Turkey and paraspecific action of an antivenin produced with the venom of the species *Androctonus crassicauda*. *J. Turkish Hygiene Exp Bio.*, 1964; 24; 2, 146-155.
- Tulga T. Cross-reactions between anti-scorpion (*Buthus quinquestratus*) and anti-scorpion (*Prionurus crassicauda*) sera. *J. Turkish Hygiene Exp Bio.*, 1960; 20, 191-203.
- Theakston RD., Warrell DA., Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* 2003; 41, 541-557.
- Sedik SS, Wanas S, Shehata A, Fawaz S. Development of an improved method for production of antiscorpion F(ab)₂ fragment of IgG with high yield and potency. *Journal of Natural Toxins.*, 2002; 11(2), 123-132.
- Krifi MN, El Ayeb M, Dellagi K. The Improvement and Standardization of Antivenom Production in Developing Countries: Comparing Antivenom Quality, Therapeutical Efficiency, and Cost. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 1999; 5(2), 128-141.
- Isbister GK, Graudins A, White J, Warrell D. Antivenom treatment in arachnidism. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology.* 2003; 41(3), 291-300.
- EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use. CPMP/BWP/3354/99. London, 2002, 14.
- Animal Sera. http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/en/Animal_sera. Erişim Tarihi 2006.
- Meddeb-Mouelhi F, Bouhaouala-Zahar B, Benlasfar Z, Hammadi M, Mejri T, Moslah M, Karoui H., Khorchani T, El Ayeb M. Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing *Androctonus australis hector* scorpion toxins. *Toxicon.* 2003; 42, 785-791.
- Christensen PA. Production and standardization of antivenin. In: Lee CY, *Handbook of experimental pharmacology.* Berlin: Springer Verlag, 1979:825.
- WHO, Requirements for immune sera of animal origin (Requirements for Biological Substances No.18). *WHO Techn. Rep. Ser.*, 1969, 413, 45-60.
- Hayvan Sağlığı ve Zabitası Yönetmeliği. Bakanlar Kurulu Karar Tarihi - No: 22.02.1989 89/13838. Dayandığı Kanun Tarihi - No: 08.05.1986 3285. Yayımlandığı Resmi Gazete Tarihi - No: 15.03.1989 20109
- Ruam Savaş Yönetmeliği. 12 Aralık 1977 tarih ve 16144 sayılı Resmi Gazete.
- Burnouf T, Griffiths E, Padilla A, Seddik SS, Stephano MA, Gutierrez J. Assesment of the viral safety of antivenoms fractioned from equine plazma. *Biologicals.* 2004; 32 , 115-128.
- Padilla A, Govezensky T, Possani LD, Larralde C. Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon.* 2003; 41(8), 959-965.
- Balozet L. Scorpionism in the old world. In; *Venomous Animal and Their Venoms* (Bücherl, W. & Buckley, E.E., Eds). Academic Press, New York. 1971: 3, 349-371.
- Zlotkin E, Miranda F, Rochat H. Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In *Handbook of Experimental Physiology* (Bettini S., Ed.), Springer-Verlag, Heidelberg. 1978; 48, 317-369.
- Ozkan O, Filazi A, The determination of acute lethal dose - 50 (LD50) levels of venom in mice, obtained by different methods from scorpions, *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807). *Acta Parasitologica Turcica.* 2004; 28(1), 50-53.

26. Ozkan O, Adiguzel S, Yakistiran S, Filazi A. Study of the relationship between *Androctonus crassicauda* (Oliver, 1807; Scorpiones, Buthidae) venom toxicity and telson size, weight and storing condition. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2006; 12(2), 297-309.
27. Krifi MN, Marrakchi N, ElAyeb M, Dellagi K. Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and viper venom toxicities. *Biologicals*. 1998; 26, 277-288.
28. World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO offset publication No 58. Geneva, 1981.
29. Antivenom Production Process. Lister Institute of Preventive Medicine. Federal Security Agency U.S. Public Health Service National Institute of Health (Text-book), 1948, 161.
30. Antivenom Prospectus. Scorpion antivenom production prospectus used Refik Saydam Hygiene Center of Turkish republic Health Ministry (Prospectus, using instruction). 2004.
31. Veronica M.J. Review of Selected Adjuvants used in Antibody Production. *ILAR Journal*. 1995; 37(3), 119-125.
32. Yamileth A., Ricardo E., José M.G. Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. *Revista De Biologia Tropical* 1997; 45(3), 1209-1215.
33. European Pharmacopoeia. Viper venom, antiserum, European 1997. 0145, 1712-1713.
34. Whittemore FW., Keegan HL., Borowitz JL. Studies of scorpion antivenins. 1. Paraspecificity. *Bull. World Health Organ.*, 1961; 25, 185-188.
35. WHO, Requirement for snake antivenins (Requirements for Biological Substances No.21) WHO Techn.Rep.Ser., 1971, 21-44.
36. Aşı ve Serum Uygulama Rehberi. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Sağlık İşleri Genel Müdürlüğü, No: 426. 1973; 104.
37. Feige K, Ehrat FB, Kästner SBR, Wampfler B. The effects of automated plazmapheresis on clinical, haematological, biochemical and coagulation variables in horses. *J. Vet. Med.*, 2003; 50, 185-189.
38. Slovis NM., Acvim D, Murray G. How to Approach whole blood transfusions in horses. *AAEP proceedings*. 2001; 47, 266-269.
39. Antivenom Üretim Protokolü. Refik Saydam Merkez Başkanlığı Akrep antivenom üretim protokolü. 1956.
40. Gutierrez JM, Rojas E, Quesada L, Leon G, Nunez J, Laing GD, Sasa M, Renjifo JM, Nasidi A, Warrell DA, Theakston RD, Rojas G. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG. An alternative to the antivenom crisis in Africa. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene.*, 2005; 99, 468-475.
41. Herrera M, Leon G, Segura A, Meneses F, Lomonte B, Chippaux JP, Gutierrez JM. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon*. 2005; 46, 775-781.
42. Rojas G, Manuel JJ, Gutierrez JM. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma. Description of simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. 1994; 32(3), 351-363.
43. Sezginman N, Demirtaş N. Purification and concentration of antitoxic plasmas. *J. Turk. Hyg. Exp Biol.*, 1970; 30(61), 63-72.
44. Smith D. Spitting venom the search for a cure for a Thrid World killer. *The Chemical Engineer*. 2001; 718, 3839.
45. WHO. Good manufacturing practices for biological products. WHO Techn. Rep. Ser., 1992; 822, 20-30.
46. European Pharmacopoeia. Immunsera for Human Use. Part 2. European Treaty Series No. 50. 1981, 4.
47. Sterilite Testi Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri. 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ No: 96/7. Yürütme ve İdare Bölümü, 42-45.
48. Fiziko-Kimyasal Kontroller Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri. 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ No: 96/9. Yürütme ve İdare Bölümü, 48-51.
49. Zararsızlık Testi Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri. 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ No: 96/8. Yürütme ve İdare Bölümü, 47.