


## Research Paper

# Production of the First Effective Immune Equine Serum Antivenom against Iranian Honey Bees (*Apis mellifera meda*)

Mahmoud Nazari<sup>1</sup>, Hedayatolah Roshanfekr<sup>2</sup>, Fatemeh Saalabi<sup>3</sup>, Jamal Fayazi<sup>4</sup>, Ali Mohammadian<sup>5</sup> and Fariba Kavosh<sup>6</sup>

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, (Corresponding author: M.nazari@asnruk.ac.ir)  
2 and 4- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran  
3, 5 and 6- Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

Received: 13 September, 2023

Accepted: 6 December, 2023

## Extended Abstract

**Background:** Bee venom is a colorless, acidic liquid (pH 4.5-5.5) that contains 18 different compounds, including enzymes, peptides, and biological amino acids. Some of these compounds have anti-inflammatory properties, while others possess toxic and allergenic properties. Bee venom is produced by female worker bees, with the most important peptides being melittin, apamin, adolapin, and mast cell degranulating (MCD) peptide. The key enzymes in bee venom include hyaluronidase and phospholipase A2 (PLA2). Historically, bee venom has been used in traditional medicine to treat various diseases, such as rheumatoid arthritis, and to alleviate muscle pain. Massive bee attacks are considered a public health problem in several countries, including Iran. Currently, no specific therapy exists for bee stings; treatment typically involves chemical drugs. This has led us to explore the development of Fab-based antivenom as a potential new treatment. To date, no efforts have been made in Iran to produce Fab-based antivenom for individuals sensitive to bee stings. Therefore, this research aimed to produce an effective and safe horse serum antidote against the Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*).

**Methods:** Crude bee venom (BV) was collected from Iranian bees (*Apis mellifera meda*) using an electric bee venom-collecting machine. The venom dries quickly in the air; therefore, it was collected daily from glass plates using special spatulas and stored in dark glass containers in a freezer at -20°C for future experiments. To remove mucus and extraneous substances, the venom was dissolved in a 1:1 ratio with saline (physiological serum) and centrifuged at high speed. After centrifugation, the upper clear solution was separated and filtered using a 0.2-micron filter. The protein concentration in the crude venom solution was determined using the Bradford protein assay method, based on a standard curve obtained from different concentrations of bovine serum albumin (BSA) solution.

The median lethal dose (LD50) of BV was determined using 24 male mice, which were divided into four groups. Different doses of venom (60, 70, 80, 90, 100, and 110 µg/ml) dissolved in sterile normal saline were injected intravenously. The control group received 0.5 ml of saline solution. Mortality was recorded after 24 hours, and LD50 was calculated using probit analysis. Three horses were used to produce antivenom against honey bee venom. The horses were immunized with Iranian bee venom seven times at 7-day intervals, and immunogenicity was evaluated under laboratory conditions using the ELISA test. The precipitated antivenom with saturated ammonium sulfate was used to perform the neutralizing test in mice. To assess the quality of the antivenom, the neutralization of phospholipase A2 activity was tested with different concentrations of antivenom. Finally, the median effective dose (ED50) was calculated using probit analysis. Three adult mares (three years old, weighing 400 to 450 kg) were used for immunization. Bee venom was injected with complete and incomplete Freund's adjuvant; complete Freund's adjuvant was used in the first two inoculations, while incomplete Freund's adjuvant was used in subsequent ones. Venom doses were incrementally increased from 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, to 4000 micrograms over seven inoculations at 7-day intervals, administered subcutaneously (in the neck). Horse antibody isolation was performed using the saturated ammonium sulfate method. Immunogenicity evaluation was conducted via the ELISA test. The serum from immunized horses



and the precipitated antivenom were also used for neutralization tests in mice. The neutralization of phospholipase A2 activity was assessed with various concentrations of antivenom. The effectiveness of the prepared antivenom was determined by calculating the ED50 value through probit analysis.

**Results:** The total protein concentration in the crude BV solution was calculated to be 56 mg/ml, and the LD50 of the crude BV was determined to be 4.84 µg/g. ELISA test results indicated an immune response that increased throughout the immunization schedule. Neutralization of phospholipase A2 activity with different concentrations of antivenom demonstrated that Iranian bee venom possesses phospholipase activity, and 120 µg/ml of this antidote can completely neutralize the activity of phospholipase A2. Furthermore, 55 micrograms of antivenom are required to neutralize 50% of phospholipase A2 activity in 100 micrograms of venom. The ED50 value is approximately 54 times the LD50, indicating that the antivenom can neutralize up to 54 times the LD50. Therefore, the death caused by 4 mg of bee venom can be neutralized by 1 ml of antivenom, resulting in an average effective dose (ED50) of 4 mg/ml. If 100 micrograms of venom enters the body with each bee sting, then 1 ml of the produced antivenom can neutralize 40 bee stings.

**Conclusion:** The results indicate that horse antivenom against honey bee venom is capable of neutralizing crude venom in a mouse model.

**Keywords:** Antivenom, Equine, Iranian honey Bees

**How to Cite This Article:** Nazari, M., Roshanfekar, H., Salabi, F., Fayazi, J., Mohamadian, A., & Kavosh, F. (2024). Production of the First Effective Immune Equine Serum Antivenom against Iranian Honey Bees (*Apis mellifera meda*). *Res Anim Prod*, 15(1), 95 -104. <https://doi.org/10.61186/rap.15.43.86>



## مقاله پژوهشی

تولید اولین پادزهر سرم اسبی موثر و ایمن در مقابل زنبور عسل ایرانی  
(*Apis mellifera meda*)محمود نظری<sup>۱</sup>، هدایت اله روشنفکر<sup>۲</sup>، فاطمه ثعلبی<sup>۳</sup>، جمال فیاضی<sup>۴</sup>، علی محمدیان<sup>۵</sup> و فریبا کاوش<sup>۶</sup>۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران،  
(نویسنده مسوول: M.nazari@asnruk.ac.ir)

۲ و ۴- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

۳، ۵ و ۶- سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اهواز، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۵

صفحه: ۹۵ تا ۱۰۴

## چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** زهر زنبور عسل ترکیبی مایع، بیرنگ و اسیدی (pH 4.5-5.5) است که شامل ۱۸ ترکیب متفاوت مانند آنزیم‌ها، پپتیدها و آمینو اسیدها و زیستی می‌باشد. برخی از این ترکیبات دارای خواص ضد التهابی و برخی دارای خواص سمی و آلرژن می‌باشد. مهمترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل هستند. مهمترین آنزیم‌های موجود در زهر زنبور می‌توان هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 را نام برد. زهر زنبور عسل در ادوار گذشته بخصوص در درمان سنتی همواره به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتریت روماتوئید و همچنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار گرفته است. زنبورگزیدگی به‌عنوان یکی از مشکلات در سیستم بهداشت عمومی برخی از کشورهای دنیا از جمله ایران مطرح می‌باشد. در حال حاضر درمان خاصی برای زنبورگزیدگی وجود ندارد و درمان تا حدودی توسط داروهای شیمیایی انجام می‌شود. در سال‌های گذشته پادزهر مبتنی بر Fab از اسب و گوسفند به‌عنوان یک درمان جدید بالقوه مطرح شده است. تاکنون در ایران اقدامی جهت تولید آنتی‌ونوم (پادزهر) برای نجات افراد حساس به نیش زنبور صورت نگرفته است. لذا هدف از این تحقیق تولید پادزهر سرم اسبی موثر و ایمن در مقابل زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) بود.

**مواد و روش‌ها:** زهر خام از زنبور عسل ایرانی به‌وسیله دستگاه زهرگیر تهیه گردید. زهر در مجاورت هوا سریعاً خشک می‌شود. زهر خشک شده هر روز به کمک کاردک‌های مخصوص از روی صفحات شیشه‌ای جمع‌آوری و برای استفاده بعدی در شیشه‌های تیره رنگ در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. به‌هنگام استفاده از سم، برای حذف موکوس و مواد اضافه، سم به نسبت ۱ به ۱ با محلول سالین (سرم فیزیولوژی) حل شده و با دوز بالا سانتریفیوژ می‌گردد. بعد از سانتریفیوژ محلول شفاف بالایی جدا و با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر می‌گردد. مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به‌روش پروتئین سنجی برادفورد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول سرم آلبومین گاوی (BSA) تعیین شد. مقدار متوسط دوز کشندگی (LD50) با ۲۴ میلی‌لیتر) محلول در نرمال سالین استریل به‌صورت داخل وریدی به آنها تزریق شد. به موش‌های شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر از دوزهای مختلف زهر (۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکروگرم در ۲۴ ساعت ثبت شد و LD50 بر اساس آنالیز پروبیت محاسبه گردید. در این پژوهش از ۳ اسب مادبان بالغ ۳ ساله (۴۰۰ تا ۴۵۰ کیلوگرم) استفاده گردید. برای ایمن سازی اسب‌ها زهر زنبور به همراه ادجوانت فروند کامل و ناقص تزریق گردید. در تلقیح اول و دوم از ادجوانت فروند کامل و در تلقیح‌های بعدی از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد. تلقیح سم به صورت افزایشی به ترتیب از ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در طی ۷ مرتبه با فواصل زمانی ۷ روز اجرا شد. تزریق به صورت زیر پوستی (گردن) انجام شد. جداسازی آنتی بادی اسب با پروتکل استاندارد روش آمونیم سولفات اشباع شده اجرا شد. ارزیابی ایمنی‌زایی در شرایط آزمایشگاهی با تست الیزا انجام گرفت. سرم اسب‌های ایمن شده و نیز آنتی‌ونوم حاصل از رسوب آمونیم سولفات اشباع از نظر خنثی‌سازی سم ارزیابی شدند. جهت بررسی کیفیت پادزهر، خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از غلظت‌های مختلف پادزهر اجرا شد. در نهایت متوسط دوز موثر (ED50) برای پادزهر در موش سوری تعیین گردید. برای تعیین کارایی پادزهر اسبی تهیه شده، زهر زنبور به‌صورت دوز افزایشی با مقدار ثابت پادزهر مخلوط و به موش تزریق شد.

**یافته‌ها:** مقدار LD50 برای زهر زنبور ۴/۸۴ میکروگرم برای هر گرم وزن زنده موش به‌دست آمد. نتایج تست الیزا نشان داد که روند پاسخ اسب‌ها نسبت به زهر افزایشی بوده و به‌خوبی با آنتی ژن ایمن شده‌اند. خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از غلظت‌های مختلف پادزهر نشان داد که سم زنبور عسل ایرانی دارای فعالیت فسفولیپازی است و ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این پادزهر قادر به خنثی کردن کامل فعالیت سم فسفولیپاز A2 است. از این داده‌ها مشخص است که اولاً سم زنبور عسل ایرانی دارای فعالیت فسفولیپازی است و دوماً ۵۵ میکروگرم پادزهر برای خنثی کردن ۵۰ درصدی فعالیت فسفولیپاز A2 در ۱۰۰ میکروگرم زهر مورد نیاز است. مقدار ED50 تقریباً ۵۴ برابر LD50 خواهد شد. این بدان معنی است که پادزهر تا ۵۴ برابر LD50 را می‌تواند خنثی کند. بنابراین مرگ ایجاد شده به‌وسیله ۴ میلی‌گرم سم زنبور با ۱ میلی‌لیتر پادزهر خنثی می‌شود به‌همین دلیل میزان متوسط دوز موثر ED50 برابر با ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خواهد بود. اگر در هر بار نیش زنبور مقدار ۱۰۰ میکروگرم زهر وارد بدن شود پس ۱ میلی‌لیتر از این پادزهر می‌تواند ۴۰ نیش زنبور را خنثی کند. **نتیجه‌گیری:** پادزهر سرم اسبی که علیه سم زنبور عسل ایرانی به‌دست آمد، در مدل حیوانی قادر به خنثی سازی سم بوده و از مرگ موش‌هایی که با سم تلقیح شده بودند جلوگیری می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: اسب، پادزهر، زنبور عسل ایرانی

## مقدمه

زنبور عسل ایجاد کرده است. به‌طوری‌که میزان فعالیت زاد و ولد، گرده‌افشانی، تنوع و پراکنش و حساسیت به عوامل بیماری‌زا و آفات آن‌ها تحت تأثیر قرار گرفته و در درازمدت می‌تواند، منجر به تغییرات زیادی در جمعیت زنبور عسل شود (Norooz Valashedi & Bahrami Pichaghchi, 2022). با این وجود تاکنون در کشور ما زنبور عسل کمتر مورد مطالعه و توجه قرار گرفته است. زنبور عسل از جانوران متعلق به دسته حشرات و راسته پرده‌بالان است که نقش کلیدی در تولید

امروزه مطالعه گونه‌های بومی به‌منظور شناخت ظرفیت‌ها و حفاظت از آنها به‌طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است (Rohipoor et al., 2019; Mohamadi ahvazi et al., 2021). یکی از این گونه‌های بومی که باید مورد توجه قرار گیرد، زنبور عسل ایرانی است (Nazari et al., 2023). در سال‌های گذشته تغییرات آب و هوایی و مخصوصاً گرم شدن هوا، تغییرات بسیار زیادی در رفتار و زندگی

اغلب موارد نیش زدن زنبور باعث تورم و درد در محل، به خاطر یک واکنش سمی غیرحساسیتی به زهر زنبور می‌شود. واکنش‌های حساسیتی به نیش زنبور ممکن است خفیف باشد و با درد و قرمزی موضعی پوست همراه باشد. در عین حال ممکن است واکنشی عمومی‌تر به همراه تورم، کهیر و قرمزی باشد. در موارد شدیدتر ممکن است کل بدن دچار تورم شود، تورم عروقی منتشرشده، مشکل تنفسی و آنافیلاکسی شدید با شوک و افت فشار خون بوجود آید. واکنش آلرژی نسبت به سم زنبور در طول ده دقیقه پس از گزیده شدن به وجود می‌آید. واکنش‌های شدید حساسیتی تهدید کننده حیات در افراد دارای آلرژی شدید، در افراد مسن، افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی و در موارد گزش‌های متعدد ممکن است روی دهد. در موارد واکنش‌های خفیف به سم زنبور تنها مصرف قرص‌های آنتی هیستامین کافی است، در حالیکه در موارد واکنش‌های شدیدتر یا آنافیلاکسی ممکن است برای احیای بیمار به تزریق آدرنالین، آنتی هیستامین، کورتون و تزریق سرم نیاز باشد (Hall, 2010).

تعداد حملات انبوه زنبورها در قاره آمریکا توسط زنبورهای مهاجم آفریقایی (*Apis mellifera scutellata*)، که به نام "زنبور قاتل" نیز شناخته می‌شود، به طور چشمگیری افزایش یافته است. به گفته وزارت بهداشت برزیل، تعداد گزش‌ها مربوط به این حشرات بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۰ در برزیل به بیش از ۴۷۰۰۰ مورد رسیده است که با ۱۵۳ مورد مرگ همراه بوده است (Santos et al., 2013). آمار دقیقی از تعداد گزیده‌شدگان توسط زنبور در ایران وجود ندارد و متأسفانه اطلاعات در این زمینه بسیار کم است اما هر روز در سایت‌ها و روزنامه‌ها خبر مرگ توسط گزش حشرات و زنبور گزارش می‌شود.

در حال حاضر پادزهر (آنتی‌ونوم) مشخصی برای زنبور گزیدگی وجود ندارد و درمان تا حدودی توسط داروهای شیمیایی انجام می‌شود. در حال حاضر هیچ درمان خاص و ایمن در دسترس نیست برای درمان گزش زنبور عسل از اپی‌نفرین، کلروفنیرامین، آنتی‌هیستامین و غیره استفاده می‌شود. درمان‌های مورد استفاده برای درمان قربانیان حملات زنبور عسل، در بعضی مواقع فاقد اثربخشی هستند و منجر به فوت می‌شود.

با توجه به اینکه تا کنون برای نیش زنبور هیچ پادزهری اختصاصی تولید نشده است ضروری است نسبت به تولید پادزهر اقدام شود. در چندسال گذشته تولید پادزهر برای زنبورهای خطرناک مثل زنبور آفریقایی به میزبانی اسب و گوسفند و خرگوش تولید شده است (Barbosa et al. 2017; Jones et al., 1999; Santos et al., 2013; Schumacher et al., 1996). اما در ایران اقدامی جهت تولید آنتی‌ونوم برای نجات افراد حساس به نیش زنبور صورت نگرفته است. لذا هدف از این تحقیق تولید پادزهر سرم اسبی موثر و ایمن در مقابل زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) بود.

### مواد و روش‌ها جمع‌آوری زهر

زهر زنبور عسل به وسیله دستگاه زهرگیر زنبور عسل اورین (اصغرپور) ورژن ۷ از یکی از کندوهای زنبور عسل ایرانی واقع

محصولات کشاورزی از طریق گرده‌افشانی دارد. علاوه بر این، این جانور توانایی تولید محصولاتی نظیر عسل، ژل رویال، زهر، گرده گیاهان، موم و بره موم را دارد (Morammazi & Mirhosseini, 2020). زهر زنبور عسل در ادوار گذشته بخصوص در درمان سنتی همواره به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتريت روماتوئید و همچنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار گرفته است (Ghabili et al., 2009).

زهر زنبور عسل ترکیبی مایع، بیرنگ و اسیدی (pH 4.5-5.5) است که شامل ۱۸ ترکیب متفاوت مانند آنزیم‌ها، پپتیدها و آمینو‌های زیستی می‌باشد که برخی از آن‌ها دارای خواص ضدالتهابی و برخی از آن‌ها دارای خواص سمی و آلرژن می‌باشد (Pattabhiramaiah et al., 2020). زهر زنبور مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها است که در آن برخی آنزیم‌ها (کاتالیزور واکنش‌های خاص)، برخی پپتیدها (که از دو یا چند اسید آمینه تشکیل شده‌اند) و برخی دیگر از جمله انواع اجزای کم مولکولی مانند کربوهیدرات‌ها (۲ درصد وزن خشک زهر)، فسفولیپیدها (۵ درصد وزن خشک زهر)، اسیدهای آمینه (۱ درصد وزن خشک زهر)، مواد معدنی (۳-۴ درصد وزن خشک زهر)، و ترکیبات فرار (۵-۸ درصد وزن خشک زهر) مشاهده می‌شود. مهمترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل هستند (Alia et al., 2013; Lima & Brochetto-Braga, 2003). آنزیم‌های موجود در آن می‌توان هیالورونیداز و فسفولسپاز A2 را نام برد (Nazari et al., 2023).

تولید زهر بلافاصله پس از تولد زنبور کارگر آغاز می‌شود و به تدریج با افزایش سن زنبور مقدار آن بیشتر می‌شود. وقتی زنبور کارگر به سن حدود ۱۶ تا ۱۹ روزگی رسید کیسه زهر آن کاملاً پر شده و ترشح زهر متوقف می‌شود. زنبور کارگر در این سن وظیفه محافظت از کلنی را بر عهده دارد و دارای حداکثر تولید زهر است (Winston, 1991). کیسه زهر زنبورهای کارگر در بهار و تابستان حدود ۱۶ تا ۲۰ روز پس از تولد آنها پر می‌شود ولی برای زنبورهای کارگر پاییزه این عمل ۴ تا ۵ روز دیرتر انجام می‌شود. زنبورهای کارگر در زمستان نیز قادر به تولید و ذخیره زهر می‌باشند. مقدار زهر تولید شده توسط یک زنبور کارگر حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ میکروگرم می‌باشد که این مقدار به عواملی چون سن، نژاد، فصل و میزان مصرف گرده بستگی دارد. گزیدگی زنبورهای زرد، سرخ و زنبور عسل دردناک است، ولی در اکثر موارد خطرناک نیست. یک زنبور می‌تواند تا ۱/۸ میلی گرم زهر را در یک بار نیش زدن تزریق کند که شبیه سم گزنه دریایی (sea nettle) است (Czarnetzki et al., 1990). واکنش‌های آلرژی نسبت به نیش زنبور بسیار شایع است. به‌طور معمول در اولین گزش آلرژی مشاهده نمی‌گردد. زهر زنبورهای عسل حاوی هیستامین است که می‌تواند علائم موضعی یا عمومی ایجاد کند. علائم گزش بستگی به تعداد گزش در هجوم زنبورها، میزان سم، حساسیت بدن به زهر و تا حدی محل گزیدگی دارد و می‌تواند به‌صورت یک واکنش عادی و معمولی، مسمومیت، حساسیت‌های عمومی وسیع و حتی در موارد نادر به شکل واکنش‌های شدید روانی باشد. در

وریدی به آنها تزریق شد. به موش‌های شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی تزریق شد. مرگ و میر پس از ۲۴ ساعت ثبت شد و LD50 بر اساس آنالیز پروبیت (Finney, 1971) توسط نرم‌افزار SPSS محاسبه گردید.

LD50 یک سم به‌عنوان حداقل مقدار سمی که باعث مرگ در ۵۰ درصد از موش‌های تزریق شده تعریف می‌شود. برای یافتن میزان سم زنبور مورد نیاز برای تزریق به اسب همین عدد با در نظر گرفتن میزان وزن اسب مورد محاسبه قرار گرفت.

#### ایمن‌سازی اسب‌ها

در این پژوهش از ۳ اسب مادبان بالغ ۳ ساله (۴۰۰ تا ۴۵۰ کیلوگرم) استفاده گردید. برای ایمن‌سازی اسب‌ها زنبور به‌همراه ادجوانت فروند کامل و ناقص (تهیه شده از موسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی) تزریق گردید. در تلقیح اول و دوم از ادجوانت فروند کامل و در تلقیح‌های بعدی از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد. تلقیح سم به‌صورت افزایشی به‌ترتیب از ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در طی ۷ مرتبه با فواصل زمانی ۷ روز اجرا شد (جدول ۱). تزریق به‌صورت زیر پوستی (گردن) انجام شد.

خونگیری از هر اسب (۳ تا ۵ میلی‌لیتر) با استفاده از سوزن گیج ۱۸ و سرنگی با حجم ۵ میلی‌لیتر انجام شد. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده بلافاصله در لوله‌های فالتکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و جهت جداسازی سرم برای تست الایزا به آزمایشگاه منتقل شدند.

خونگیری نهایی دو هفته پس از تزریقات انجام شد. خونگیری سه بار با فواصل سه روزه انجام شد. در هر بار خونگیری ۵ لیتر خون از رگ وداج گردنی با استفاده از کیسه‌های یکبار مصرف ۵ لیتری مخصوص جمع‌آوری خون حاوی سیترات سدیم انجام شد.

در زنبورستانی در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شد. این دستگاه با ارسال شوک و پالس گردشی، باعث تحریک زنبورهای عسل می‌شود و زنبورها زهر خود را بر روی صفحه‌ای از جنس شیشه‌ای تخلیه می‌کنند. زهر در مجاورت هوا سریعاً خشک می‌شود. زهر خشک شده هر روز به‌کمک کاردک‌های مخصوص از روی صفحات شیشه‌ای جمع‌آوری و برای استفاده بعدی در شیشه‌های تیره رنگ در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. زهرگیری به‌مدت ۱۰ روز به طول انجامید. به‌هنگام استفاده برای حذف موکوس و مواد اضافه، سم به‌نسبت ۱ به ۱ با محلول سالین (سرم فیزیولوژی) حل شده و با دور بالا سانتریفیوژ می‌گردد. بعد از سانتریفیوژ محلول شفاف بالایی جدا و با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر شده و به لوله جدیدی منتقل می‌گردد.

#### پروتئین سنجی

مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به‌روش پروتئین سنجی برادفورد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول سرم آلبومین گاوی (BSA) تعیین شد (Bradford, 1976). جذب نوری تمام لوله‌ها پس از کالیبراسیون اسپکتروفتومتر با محلول شاهد در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و نمودار استاندارد تهیه گردید. در نهایت غلظت پروتئین مجهول با استفاده از جذبی که در محدوده جذب پروتئین استاندارد قرار دارد، طبق معادله خط نمودار محاسبه گردید (Greenfield, 2018).

#### تعیین متوسط دوز کشندگی<sup>۱</sup>

جهت تعیین متوسط دوز کشندگی (LD50) زهر خام از موش سوری نر با وزن  $20 \pm 2$  گرم استفاده شد. موش‌ها به گروه‌های ۴ تایی تقسیم شدند و ۰/۵ میلی‌لیتر از دوزهای مختلف زهر (۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) محلول در نرمال سالین استریل به‌صورت داخل

جدول ۱- برنامه ایمن‌سازی و دوز سم زنبور عسل

Table 1. Immunization schedule and honey bee venom doses

روز	روز	میزان زهر تزریقی (میکروگرم)	Adjuvant
0	0	50	فروند کامل (Complete Freund's adjuvant)
7	7	100	فروند کامل (Complete Freund's adjuvant)
14	14	250	فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)
21	21	500	فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)
28	28	1000	فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)
35	35	2000	فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)
42	42	4000	فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)

شد. پس از آماده‌سازی پلیت‌ها، سرم در رقت‌های بین ۱/۵۰ تا ۱/۲۵۰ برای مشخص شدن بهترین رقت به چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون و ۳ بار شستشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از HRP Conjugated protein A/G (رهازیست پادتن، ایران) با رقت ۱/۵۰۰ اضافه شده و به‌مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد و بعد ۱۰۰ میکرولیتر TMB اضافه شده و در جای تاریک نگهداری می‌کنیم و واکنش توسط اسید کلریدریک متوقف گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. برای اطمینان از اینکه در روش آمونوم سولفات اشباع شده به‌درستی آنتی‌بادی‌ها را جداسازی نموده است، ۵۰ میکرولیتر

#### جداسازی آنتی‌بادی اسب

جداسازی آنتی‌بادی اسب با پروتکل استاندارد روش آمونوم سولفات اشباع شده انجام شد (Grodzki & Berenstein, 2010).

#### ارزیابی پاسخ ایمنی

از نمونه‌های خون که هر هفته قبل از ایمن‌سازی اسب‌ها تهیه شده است سرم گرفته شد و میزان تیتراژ آنتی‌بادی با استفاده از تست الایزا اندازه‌گیری شد. در این روش ۵۰ میکرولیتر زهر زنبور با غلظت‌های مختلف (۲ تا ۱۶ میکروگرم در ۵۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (کربنات سدیم-بی کربنات سدیم)) در ته پلیت الایزا قرار گرفت و با کمک BSA عمل بلاکینگ انجام

### تعیین متوسط دوز موثر<sup>۲</sup> (ED50)

برای بررسی قدرت خنثی سازی زهر توسط آنتی سرم از ۱۵ موش سوری نر با وزن  $2 \pm 16$  گرم استفاده شد. ابتدا جهت فعال سازی سم، ۱۰ میلی گرم سم در یک میلی لیتر محلول سالین (سرم فیزیولوژی) حل شده و با دور بالا سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول شفاف بالایی جدا و با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر شده و به لوله جدیدی منتقل گردید. سپس مقادیر ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکرو لیتر از محلول بالا را که حاوی ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم سم که در واقع ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ برابر LD50 است را برداشته و حجم آن به ۱ سی سی رسانده شد. به همه رقت‌های بالا ۱ سی سی آنتی‌ونوم (پادزهر) اضافه کرده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید. در نهایت از هر رقت ۰/۵ سی سی به هر موش در گروه‌های ۵ تایی به صورت داخل وریدی تزریق شد و تا یک هفته از نظر علائم و مرگ و میر بررسی شدند. در نهایت میزان متوسط دوز موثر بر اساس آنالیز پروبیت (Finney, 1971) توسط نرم افزار SPSS محاسبه گردید.

### نتایج و بحث

#### پروتئین زهر خام

با ترسیم مقادیر استاندارد علیه عدد جذب آنها منحنی استاندارد به صورت شکل ۱ به دست آمد. بعد از ترسیم نمودار، برازش خطی (Trendline)، معادله خط و ضریب رگرسیون را نیز بر روی نمودار به دست آمد. برای محاسبه غلظت محلول پروتئینی مجهول به کمک منحنی استاندارد، عدد جذب نمونه پروتئینی را به جای  $y$  قرار داده و مقدار  $x$  را مشخص کردیم. مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام ۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. محققین مقدار پروتئین زهر خام زنبور عسل *Apis mellifera lamarckii* مصری را ۴۷/۲ میلی گرم گزارش نمودند (Darwish et al., 2021). البته محققین دیگر مقدار پروتئین زهر خام در همین زنبور ۲۷/۲ میلی گرم گزارش کردند (Abdel-Monsef et al., 2020). زهر خام خشک شده زنبور عسل شامل ۵۵ درصد پپتیدها، ۱۷ درصد آنزیم، ۳ درصد آمین‌های بیوژنیک و ۲۵ درصد ترکیبات غیر پروتئینی است (El Mehdi et al., 2022). هر مقدار که عدد میزان پروتئین بزرگتر باشد نشان دهنده کیفیت بالای زهر می باشد. گراف و همکاران متوسط پروتئین زهر خام را ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کرده است (De Graaf et al., 2020). بنابراین میزان پروتئین ۵۶ میلی گرم زهر خام زنبور عسل نشان دهنده تازه بودن و با کیفیت بودن زهر خام استفاده شده در این تحقیق است.

زهر زنبور با غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر کوتینگ (کربنات سدیم-بی کربنات سدیم)) در ته پلیت الیزا قرار گرفت و با کمک BSA عمل بلاکینگ انجام شد. پس از آماده سازی پلیت‌ها، پادزهر در رقت‌های بین ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۵۰۰ و ۱/۱۰۰۰ برای مشخص شدن بهترین رقت به چاهک مقدار ۵۰ میکرو لیتر اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون و ۳ بار شستشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از HRP Conjugated protein (رهازست پادتن، ایران) با رقت ۱/۵۰۰ اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد و بعد ۱۰۰ میکرو لیتر TMB<sup>۱</sup> اضافه شده و در جای تاریک نگهداری می کنیم و واکنش توسط اسید کلریدریک متوقف گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

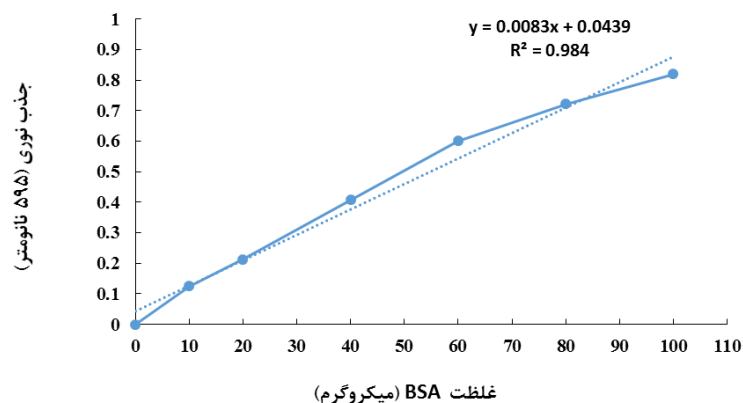
#### اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 و خنثی سازی آن با پادزهر

از روش مارینتی و همکاران جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 زهر خام استفاده شد (Marinetti, 1965). برای تهیه سوسپانسیون ذخیره، یک زرده تخم مرغ در سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد سدیم کلراید) حل شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسید. زرده تخم مرغ به عنوان منبع لیسیتین استفاده می شود. سوسپانسیون کار برای اندازه گیری فعالیت فسفولیپاز با رقیق سازی (تهیه رقت ۱۰) این سوسپانسیون در سدیم کلراید ۰/۹ درصد فراهم می شود. به ۰/۱ میلی لیتر از زهر با غلظت ۱۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر ۲ میلی لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ اضافه کرده (در لوله شاهد فقط ۲ میلی لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ می ریزیم) و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دهیم. سپس میزان جذب نوری در طول موج ۹۲۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر مدل M501 Single Beam Scanning UV/VIS Spectrophotometre خوانده شد (Nazari et al., 2023).

اختلاف جذب لوله شاهد با نمونه‌ها عبارت است از مقادیر فسفولیپاز زهر. هر ۱ درصد اختلاف جذب مربوط به یک واحد در هر میلی گرم می باشد.

(جذب نمونه - جذب = فسفولیپاز (برحسب واحد در میلی گرم) \* ۱۰۰۰ شاهد)

هر واحد (U) عبارت است از مقدیری از آنزیم که بتواند ۱ درصد کاهش در جذب سوسپانسیون زرده تخم مرغ بوجود آورد. برای بررسی توانایی پادزهر در خنثی کردن این فعالیت، روش انکوباسیون سم و پادزهر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قبل از آزمایش تکرار شد. زهر (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) با پادزهر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قبل از افزودن سوبسترا مخلوط شد و میزان جذب نوری در ۹۲۵ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه اندازه گیری شد.



شکل ۱- منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول استاندارد BSA  
Figure 1. The standard curve obtained from measuring different concentrations of BSA standard solution

نتایج ذوالفقاریان و همکاران تفاوت اندکی دارد (Zolfagharian *et al.*, 2016). آنها میزان LD50 برای زنبور عسل ایرانی را ۱۷۷/۸ میکروگرم (برای موش ۲۰ گرمی) گزارش نمودند. با تبدیل آن برای هر گرم موش ۸/۸ میلی‌گرم می‌شود. احتمالاً علت این امر پایین بودن کیفیت سم می‌باشد. این محققین میزان پروتئین زهر خام را ۳/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نموده بودند که نشان از کیفیت پایین سم دارد. سانتوز و همکاران میزان LD50 زهر زنبور آفریقایی را ۴/۲ میکروگرم برای هر گرم موش بدست آوردند (Santos *et al.*, 2013). جونز و همکاران میزان LD50 را برای زهر زنبور آفریقایی ۳/۱ میکروگرم برای هر گرم موش گزارش کردند (Jones *et al.*, 1999).

### میزان متوسط دوز کشندگی

برای تعیین متوسط دوز کشندگی (LD50) زهر خام زنبور عسل ایرانی ابتدا بر اساس اطلاعات گذشته و محاسبات صورت گرفته دوزهای ۱۲۰ و ۱۳۰ و ۱۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفتند که سبب مرگ همه موش‌ها شد. در مرحله بعد دوزهای پایین‌تر یعنی ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد توجه قرار گرفتند. نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. براساس داده‌های ارائه شده در جدول ۲ میزان LD50 به ازای موش ۹۶/۸۷ میکروگرم به دست آمد. چون وزن موش‌ها تقریباً ۲۰ گرمی بود پس LD50 برای هر گرم موش تقریباً ۴/۸۴ میکروگرم محاسبه شد. مقدار LD50 محاسبه شده برای هر سم در هر تحقیقی متفاوت است که بستگی به نوع سم و میزبان تزریق شده متفاوت است. نتایج این تحقیق با

جدول ۲- کشندگی زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) در موش سوری و تعیین LD50 با تجزیه و تحلیل پروبیت

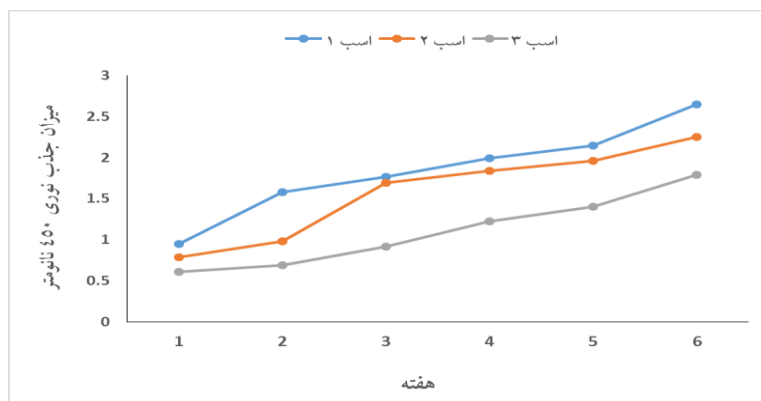
Table 2. Lethality of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) venom in mice and determining LD50 by Probit analysis

تعداد موش تلف شده Deaths in groups of mice	تعداد موش‌ها Total number of mice	Log Dose	دوز (میکروگرم) Dose (µg)	گروه Group
0	4	1.778	60	1
0	4	1.845	70	2
0	4	1.903	80	3
1	4	1.954	90	4
2	4	2.000	100	5
4	4	2.041	110	6

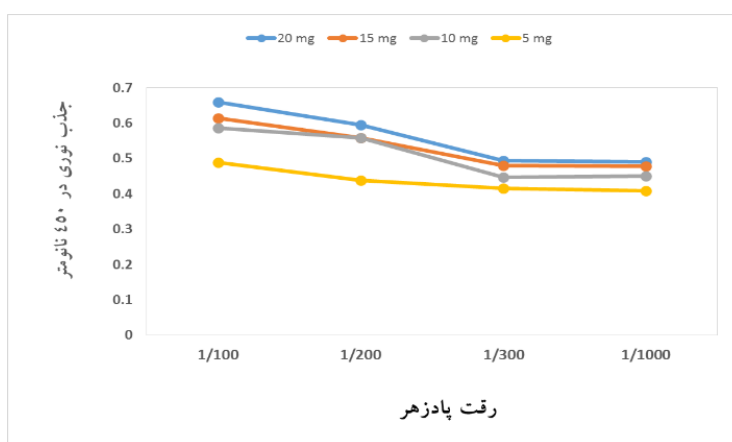
مشاهده شده است (Behdani *et al.*, 2010; Ismael *et al.*, 2018). برای اطمینان از اینکه در روش آمونوم سولفات اشباع شده به درستی آنتی‌بادی‌ها را جداسازی نموده است واکنش پادزهر و زهر به روش تست الایزا مورد بررسی قرار گرفت. خنثی‌سازی غلظت‌های مختلف زهر توسط رقت‌های مختلف پادزهر در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است با کاهش رقت پادزهر جذب نوری کاهش می‌یابد. نتایج خوانش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر نشان دادند که میزان تولید آنتی‌بادی با افزایش رقت زهر کاهش یافته است. نتایج نشان‌دهنده حضور آنتی‌بادی است که با رقیق شدن واکنش آن‌ها با آنتی‌ژن (سم زنبور) کمتر می‌شود.

### تیتراسیون آنتی‌بادی

پیش از هر بار تزریق زهر زنبور عسل از ورید و داج گردنی اسب‌ها خون‌گیری شد و سرم آنها جدا گردیده و سرم‌ها تا زمان انجام تست الایزا در فریزر ۷۰- نگه‌داری شدند. پس از آخرین تزریق، سرم‌ها از فریزر خارج شده و میزان تیتراسیون آنتی‌بادی آن‌ها با تست الایزا انجام گرفت. غلظت‌های مختلف زهر و رقت‌های مختلف سرم مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که غلظت زهر زنبور ۱۵ میکروگرم و سرم با رقت ۱/۵۰ مناسب‌ترین است. روند پاسخ اسب‌ها نسبت به زهر افزایشی بوده و به خوبی با آنتی‌ژن ایمن شده‌اند (شکل ۲). نتایج نشان‌دهنده این است که با گذشت زمان اسب‌ها نسبت به زهر ایمن شده و آنتی‌بادی بیشتری تولید می‌کنند. چنین روندی در گزارشات بسیاری



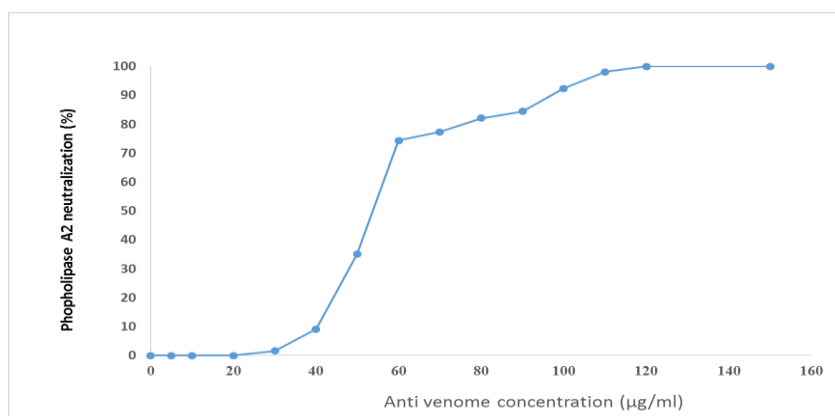
شکل ۲- پاسخ آنتی‌بادی در ۳ اسب در طول برنامه ایمن‌سازی با تست الایزا  
Figure 2. Antibody response in three horses during immunization schedule by ELISA test.



شکل ۳- خنثی‌سازی غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم) توسط رقت‌های مختلف پادزهر با تست الایزا  
Figure 3. Neutralization of different concentrations (5, 10, 15, and 20 mg) of honey bee venom with different dilutions of antivenom by ELISA test.

فسفولیپاز A2 در ۱۰۰ میکروگرم زهر مورد نیاز است. جونز و همکاران با تولید پادزهر علیه زهر آفریقایی نشان دادند که برای خنثی‌سازی ۵۰ درصدی فعالیت فسفولیپاز A2 زهر زنبور آفریقایی حدود ۱۶ میلی‌گرم از این پادزهر مورد نیاز است (Jones et al., 1999). این نتایج نشان‌دهنده این است که پادزهر تولید شده در این تحقیق در مقدار کمتری می‌تواند زهر را خنثی کند و از قدرت بالایی برخوردار است.

**خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز زهر توسط پادزهر**  
خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از غلظت‌های مختلف پادزهر (شکل ۴) نشان داد که ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این پادزهر قادر به خنثی‌کردن کامل فعالیت سم فسفولیپاز A2 است. از این داده‌ها مشخص است که اولاً سم زنبور عسل ایرانی دارای فعالیت فسفولیپازی است و دوماً ۵۵ میکروگرم پادزهر برای خنثی‌کردن ۵۰ درصدی فعالیت



شکل ۴- خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز زهر زنبور عسل در غلظت‌های مختلف پادزهر  
Figure 4. Neutralization of bee venom phospholipase activity in different antivenom concentrations

**متوسط دوز موثر (ED50)**

شده در این تحقیق می‌تواند این فرد را از مرگ نجات دهد. این نتایج نشان از کیفیت بالای پادزهر تهیه شده داشت. جونز و همکاران میزان ED50 برای پادزهر تولید شده در برابر زهر زنبور افریقایی را ۲۵۸ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم تقریباً ۵ برابر LD50 گزارش نمود (Jones et al., 1999). تقریباً ۲۰ میلی‌گرم آنتی‌ونوم برای خنثی‌سازی هر میلی‌گرم زهر مورد نیاز بود. سانتوز و همکاران میزان ED50 برای پادزهر تولید شده در برابر زهر زنبور افریقایی را ۱/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند (Santos et al., 2013). این بدین معنی بود که مقدار لازم پادزهر برای خنثی‌سازی ۱۰۰۰ تا نیش زنبور افریقایی (حاوی ۱۰۰ میکروگرم سم در هر نیش) که منجر به مرگ یک مرد ۷۰ کیلوگرمی می‌شود برابر با ۹۰ میلی‌لیتر خواهد بود. با این حال، دوز مورد استفاده در موارد بالینی انسانی باید در یک کارآزمایی بالینی تعیین دوز تعیین شود.

برای تعیین کارایی پادزهر اسبی تهیه شده، زهر زنبور به‌صورت دوز افزایشی با مقدار ثابت پادزهر مخلوط و به موش تزریق شد. نتایج در جدول ۳ ارائه شده است. مقدار ED50 تقریباً ۵۴ برابر LD50 خواهد شد. این بدان معنی است که پادزهر تا ۵۴ برابر LD50 را می‌تواند خنثی کند. بنابراین مرگ ایجاد شده بوسیله ۴ میلی‌گرم سم زنبور با ۱ میلی‌لیتر پادزهر خنثی می‌شود به‌همین دلیل میزان متوسط دوز موثر ED50 برابر با ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خواهد بود. اگر در هر بار نیش زنبور مقدار ۱۰۰ میکروگرم زهر وارد بدن شود پس ۱ میلی‌لیتر از این پادزهر می‌تواند ۴۰ نیش زنبور را خنثی کند. اگر میزان متوسط کشندگی زهر زنبور برای انسان ۲/۸ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم باشد برای فرد ۶۰ کیلوگرمی حدود ۱۶۸ میلی‌گرم می‌شود (Marinho & Soto-Blanco, 2020) که با ۱۶۸۰ بار گزش زنبور ایجاد می‌شود. تقریباً ۴۲ میلی‌لیتر از پادزهر تولید

جدول ۳- ظرفیت خنثی‌سازی پادزهر تهیه شده علیه سم زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) در موش سوری و تعیین ED50 با آنالیز پروبیت

Table 3. Neutralization capacity of prepared antivenom against Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) venom in mice and determining ED50 by Probit analysis

تعداد تلفات Deaths in groups of mice	تعداد کل موش‌ها Total number of mice	Log Dose Log Dose	دوز (میلی‌گرم) Dose (mg)	گروه Group
0	3	0.301	2	1
0	3	0.477	3	2
1	3	0.602	4	3
2	3	0.699	5	4
3	3	0.778	6	5

آنتی سرم را ایجاد نماید. در این تحقیق از روش آمونوم سولفات اشباع که یک روش متداول در جداسازی آنتی‌بادی‌ها می‌باشد، و به‌عنوان یکی از روش‌های مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی برای جداسازی آنتی‌بادی‌ها برای مصارف درمانی می‌باشد، آنتی‌بادی‌های مورد نظر جدا شدند و در آزمایش خنثی‌سازی از تلف‌شدن موش‌ها جلوگیری نمود.

**نتیجه‌گیری کلی**

نتایج تحقیق ما نشان داد که آنتی‌ونوم اسبی که بر علیه سم زنبور عسل ایرانی به‌دست آمد، در مدل حیوانی قادر به خنثی‌سازی سم بوده و از مرگ موش‌هایی که با سم تلقیح شده بودند جلوگیری می‌نماید.

نتایج نشان‌دهنده کارایی بالای پادزهر تولید شده است. در دهه‌های گذشته چندین پادزهر برای زنبور گزیدگی گزارش شده است (Barbosa et al., 2017; Jones et al., 1999; Santos et al., 2013; Schumacher et al., 1996). اما در حال حاضر پادزهر (آنتی‌ونوم) مشخصی برای زنبور گزیدگی در ایران و افراد حساس به نیش زنبور (که با نیش زنبور دچار آنافیلاکسی شدید می‌شوند) وجود ندارد و درمان تا حدودی توسط داروهای شیمیایی انجام می‌شود. ما در این پژوهش برای اولین بار در ایران آنتی‌ونوم ضد سم زنبور با منشأ اسبی تولید نمودیم و نشان دادیم که این آنتی‌ونوم قادر است زهر زنبور عسل را خنثی نماید. در این پژوهش نشان داده شد که اسب توسط سم زنبور ایمن می‌شود و قادر است تیتراهای بالایی از

**References**

- Abdel-Monsef, M. M., Zidan, H. Darwish, D. A. Masoud, H. M. Helmy, M. S. & Ibrahim, M. A. (2020). Biochemical Isolation and Characterization of Hyaluronidase Enzyme from Venom of Egyptian Honey Bee *Apis Mellifera Lamarckii*. *Journal of Apicultural Science*, 64(1), 153-164.
- Alia, O., Laila, M. & Antonios, A. (2013). Antimicrobial effect of melittin isolated from Syrian honeybee (*Apis mellifera*) venom and its wound healing potential. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21, 318-324.
- Barbosa, A.N., Boyer, L., Chippaux, J.P., Medolago, N. B., Caramori, C. A., Paixão, A. G., Vasconcelos Poli, J. P., Mendes, L. B., Santos, L. D., Ferreira, R. S., Barraviera, B. (2017). A clinical trial protocol to treat massive Africanized honeybee (*Apis mellifera*) attack with a new apilic antivenom. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 23, 14.
- Behdani, M., Hosseininejad chafi, M., Zeinali, S., Karimipour, M., Khanahmad, S. H., Ghasemi, P., Asadzadeh, N., Ghamnak, A., Pooshang Bagheri, K., Ahari, H., & Shahbazzadeh, D. (2010). Antiserum production in immunized camel by the venom of *Hemiscorpius lepturus* scorpion: evaluation of neutralizing test in vivo. *Tehran University Medical Journal*, 68(5), 268-273 (In Persian).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-54.

- Czarnetzki, B. M., Thiele, T. & Rosenbach, T. (1990). Evidence for leukotrienes in animal venoms. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 85(2), 505–509.
- De Graaf, D. C., Brochetto Braga, M. R., de Abreu, R. M. M., Blank, S., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., Devreese, B., Ebo, D. G., Ferris, T. J., Hagendorens, M. M., & Justo Jacomini, D. L. (2020). Standard methods for *Apis mellifera* venom research. *Journal of Apicultural Research*, 60(4), 1-31.
- Darwish, D.A., Masoud, H.M.M., Abdel-Monsef, M.M., Helmy, M.S., Zidan, H.A., & Ibrahim, M.A. (2021). Phospholipase A2 enzyme from the venom of Egyptian honey bee *Apis mellifera lamarckii* with anti-platelet aggregation and anti-coagulation activities. *J Genet Eng Biotechnol*, 19(1), 10.
- El Mehdi, I., Falcão, S.I., Boujraf, S., Mustapha, H., Campos, M.G., & Vilas-Boas, M. (2022). Analytical methods for honeybee venom characterization. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 13, 154-60.
- Finney, D. J. (1971). Probit analysis. 3d Ed. Cambridge University Press.
- Ghabili, K., Shoja, M.M., & Parvizi, M. (2009). Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. *Med Hypotheses*, 73(3), 459-60.
- Greenfield, E.A. (2018). Protein Quantitation. Cold Spring Harbor Protocols. pdb. prot098202.
- Grodzki, A.C., & Berenstein, E. (2010). Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods in Molecular Biology*, 588, 15-26.
- Hall, J. E. (2010). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (Guyton Physiology). Saunders Publisher. 12th edition.
- Ismael, B.N., Abass, K.S., Khalil, K.A., & Salih K.A. (2018). Preparation of F (ab')<sub>2</sub> antivenom in Iraq against scorpion (*Hottentotta saulcyi*) venom. *Biologicals*, 56, 19-23.
- Jones, R.G., Corteling, R.L., Bhogal, G., & Landon, J. (1999). A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(3), 361-6.
- Lima, P.R. & Brochetto-Braga, M.R. (2003). Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 9, 149-162.
- Marinetti, G. V. (1965). The action of phospholipase A2 on lipoproteins. *Biochem Biophys Acta*, 98, 554-6.
- Marinho, J.B.R., & Soto-Blanco, B. (2020). Toxicological Risk Assessment of the Accidental Ingestion of a Honeybee (*Apis mellifera* L.) Present in Food. *Front in Veterinary Science*, 7, 583286.
- Mohamadi ahvazi, Gh., Nazari, M., Mohamadabadi, M.R., & Heidari, R. (2019). Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial HVR1 region in three breeds of Iranian sheep. *Mod Genet J*, 14(3), 211-219 (In Persian).
- Morammazi, S., & Mirhosseini, M.A. (2020). Expression of HSP90 Gene and its Relationship with Ambient Temperature and Foraging Rate in *Apis Mellifera* Meda. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12 (4), 185-205 (In Persian).
- Nazari, M., Roshanfekar, H. & Salabi, F. (2023). Isolation, characterization, and biological activity of Phospholipase A2 (PLA2) and Hyaluronidase from Iranian honey bee venom (*Apis Mellifera* meda). *Agricultural Biotechnology Journal*, 15 (2), 1-22 (In Persian).
- Norooz Valashedi, R., & Bahrami Pichaghchi, H. (2022). Investigating the Effect of Climate Indices on the Number of Beehives in the Last Six Climatic Decades. *Research on animal production*, 13 (37), 187-195 (In Persian).
- Pattabhiramaiah, M., Ramesh, K., Vishwanath, K.V., & Reddy, S. (2020). Computational analysis of PhospholipaseA2 in the honey bee venom. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 706-721.
- Rohipoor, M., Nazari, M., & Beigi Nassiri, M.T. (2019). Genetic and Phylogenetic Analysis of Adani Goat Population Based on Cytochrome B Gene. *Research on animal production*, 10 (26), 84-89 (In Persian).
- Rohipoor, M., Nazari, M., & Beigi nassiri, M.T. (2021) Population structure, Genetic diversity and phylogenetic analysis of control region of mtDNA in Adani goat breed. *Mod Genet J*, 15(4), 297-304 (In Persian).
- Santos, K. S., Stephano, M. A., Marcelino, J. R., Resende Ferreira, V. M., Rocha, T., Caricati, C., Higashi, H. G., Moro, A. M., Kalil, J. E., Malaspina, O., Morato Castro, F. F., & Palma, M. S. (2013) Production of the First Effective Hyper Immune Equine Serum Anti venom against Africanized Bees. *PLoS ONE*, 8(11), e79971.
- Schumacher, M.J., Egen, N.B., & Tanner, D. (1996). Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 197- 201.
- Winston, M. L. (1991). The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press; Cambridge. London. 4th Edition
- Zolfagharian, H., Mohajeri, M., Babaie, M., Mosavari, N., & Javadi, I. (2016). Investigation of the Antibacterial Effect of Crude Venom of Honey Bee (*Apis mellifera*) and its Fractions by Disk Diffusion Method. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 114, 117-126 (In Persian).