



## اندوتوکسین در واکسن: مکانیسم اثر، کنترل کیفیت و مدیریت بالینی

زهرا برادران سید<sup>۱</sup>، لیلا پیشرفت ثابت<sup>\*۱</sup>

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

\*نویسنده مسئول: لیلا پیشرفت ثابت l.sabet@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳-۱۰-۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴-۰۲-۳۰

### چکیده

اندوتوکسین (Endotoxin) ها، بخشی از دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و با لیپوپلی ساکارید دیواره این باکتری‌ها مرتبط هستند. این ترکیبات به خودی خود سمی نیستند، ولی بعد از لیز باکتری و آزاد شدن آن خاصیت سمی داشته که منجر به بروز عوارض جانبی شامل واکنش‌های التهابی، شوک و حتی مرگ در دام‌ها می‌شوند. مدیریت نادرست واکسن‌ها، انجماد، یا استفاده هم‌زمان از چند واکسن حاوی آنتی‌ژن‌های باکتریایی گرم منفی می‌تواند منجر به انباشتگی اندوتوکسین (Endotoxin stacking) و افزایش خطرات ناشی از آن شود. از جمله عوارض انباشت اندوتوکسین، بروز اندوتوکسمی (Endotoxemia) و شوک اندوتوکسیک (Endotoxic shock) است که تهدیدکننده حیات حیوان هستند. در این مقاله ترویجی پس از شرح مسئله، استانداردهای کنترل کیفیت، مقادیر مجاز و روش‌های سنجش و حذف اندوتوکسین تبیین شده‌اند. همچنین، اثرات بالینی از جمله پدیده انباشتگی اندوتوکسین، اندوتوکسمی، شوک اندوتوکسیک و نحوه مدیریت بالینی و تشخیص افتراقی تشریح شده‌اند. در نهایت، توصیه‌های کاربردی برای دامپزشکان و تولیدکنندگان به منظور کاهش عوارض و بهبود ایمنی واکسن‌های دامی بیان شده است.

### واژگان کلیدی

واکسن، اندوتوکسین، عوارض جانبی، شوک، باکتری گرم منفی

## بیان مساله و اهمیت موضوع

اندوتوکسین‌ها مواد سمی هستند که اولین بار در سال ۱۸۹۲، به عنوان عوامل پایدار در برابر گرما معرفی شدند. این مواد در اثر مرگ یا لیز سلول باکتریایی آزاد می‌شوند و بخش اصلی دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی را تشکیل می‌دهند. تا زمانی که در غشای سلولی هستند، مضر نیستند؛ اما پس از آزاد شدن، به عنوان محرک قوی سیستم ایمنی عمل کرده و نقش مهمی در بروز علائم عفونت باکتریایی گرم منفی ایفا می‌کنند. در طی رشد باکتری‌ها، اندوتوکسین‌ها به مقدار کم آزاد می‌شوند، اما با مرگ یا تخریب باکتری‌ها، میزان آزادسازی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱). اندوتوکسین به شدت در برابر حرارت مقاوم بوده و پس از استریلیزاسیون معمولی با بخار و خشکی عادی هم‌چنان فعال باقی می‌ماند. این ماده به راحتی از فیلترهایی که برای حذف باکتری‌های کامل طراحی شده‌اند، عبور می‌کند. اثر اندوتوکسین تنها در دماهای خشک بالاتر از ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت حداکثر یک ساعت کاهش می‌یابد. ماهیت دوگانه دوستی/آمنی فلیک لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharide, LPS) که اندوتوکسین بخشی از آن است، باعث می‌شود که در محلول به عنوان یک ساختار مقاوم عمل کند، به طوری که انتهای آب‌گریز/هیدروفوبیک آن به شدت به سطوح هیدروفوبیک مانند شیشه، پلاستیک و زغال (و هم‌چنین به یکدیگر) می‌چسبد (۲).

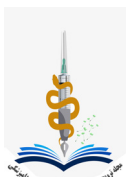
بیشتر واکسن‌های تهیه شده از باکتریایی گرم منفی از نوع باکترین هستند. باکترین‌ها واکسن‌های سلول کامل (Bacterial whole-cell vaccines) باکتریایی کشته‌اند که حاوی مقادیر نسبتاً کمی اندوتوکسین آزاد می‌باشند. این مقادیر معمولاً از نظر ایجاد عوارض جانبی پس از واکسیناسیون مشکل ساز نبوده و سمیت قابل توجهی برای میزبان ایجاد نمی‌کنند. با این حال، مدیریت نادرست واکسن‌ها می‌تواند موجب آزادسازی مقادیر بیشتری اندوتوکسین از دیواره سلولی به دلیل کشته یا لیز شدن باکتری‌ها شود (۱). در سال‌های اخیر اصطلاحی تحت عنوان انباشتگی اندوتوکسین (Endotoxin stacking) در گروه عوارض واکسن به خصوص در دام‌های مزرعه تعریف شده است. این مشکل در شرایطی بروز می‌کند که به علت استفاده از بیش از دو واکسن حاوی باکتری‌های گرم منفی و یا مدیریت اشتباه حمل‌نقل، نگهداری و تجویز این گروه از واکسن‌ها، اندوتوکسین در بدن حیوان تجمع یابد و تبعات آن از جمله اندوتوکسمی و شوک اندوتوکسیک به وقوع بپیوندد. اندوتوکسین‌ها برای اغلب سلول‌های حیوانی (به ویژه سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژ و پلاکت‌ها)، بافت‌ها و اعضای بدن سمی هستند. حتی مقادیر نانو گرم اندوتوکسین به ازای هر کیلوگرم از بدن پستانداران، توانایی فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی میزبان را دارد. اگر مقادیر زیادی از این ترکیبات آزاد شده و به جریان خون وارد شود، اندوتوکسمی

رخ می‌دهد و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی و اکسید نیتریک (NO) توسط ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال تحریک می‌شود. این فرایند منجر به فعال‌سازی آبشارهای انعقادی و کمپلمان شده و می‌تواند شوک اندوتوکسیک را ایجاد کند (۱، ۳، ۴). شوک اندوتوکسیک با علایمی چون تب، هیپوگلیسمی (کاهش قند خون)، افت شدید فشار خون مشخص می‌شود و می‌تواند همراه با سندرم نارسایی چند عضوی (Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)، سندرم پاسخ التهابی سیستمیک (Systemic inflammatory response syndrome, SIRS) و انعقاد درون‌رگی منتشر (Disseminated intravascular coagulation, DIC) به مرگ حیوان بیانجامد (۵، ۶).

## دستاوردها

اندوتوکسین‌ها معمولاً با لیپوپلی ساکارید دیواره خارجی سلول باکتری‌های گرم منفی مرتبط‌اند و برای پایداری و عملکرد آن‌ها حیاتی هستند. لیپوپلی ساکاریدها مولکول‌های بزرگی هستند که از سه قسمت آنتی ژن O / زنجیره O پلی ساکارید، الیگوساکارید مرکزی (Core oligosaccharide) و لیپید A تشکیل شده‌اند که همگی به صورت کووالانسی به هم مرتبط هستند (تصویر شماره ۱). آنتی ژن O یک زنجیره پلی ساکارید متغیر است که بیرونی‌ترین ناحیه LPS با ساختاری بسیار متغیر را تشکیل می‌دهد. آنتی ژن O هدف اصلی آنتی‌بادی میزبان است و ترکیب آن می‌تواند به طور قابل توجهی بین سویه‌های مختلف باکتری متفاوت باشد. این ترکیب در تعیین تایپ سرولوژیکی جدایه‌های باکتری‌های گرم منفی کاربرد دارد. اولیگوساکارید مرکزی، شامل دو هسته داخلی و خارجی است که لیپید A را به آنتی ژن O متصل می‌کند و برای یکپارچگی ساختاری LPS مهم است. لیپید A داخلی‌ترین بخش LPS است که موجب اتصال LPS به غشای داخلی باکتری می‌شود. همچنین، لیپید A جزء سمی اندوتوکسین و مسئول فعالیت بیولوژیکی آن است که توسط سیستم ایمنی شناسایی می‌شود (۳، ۵).

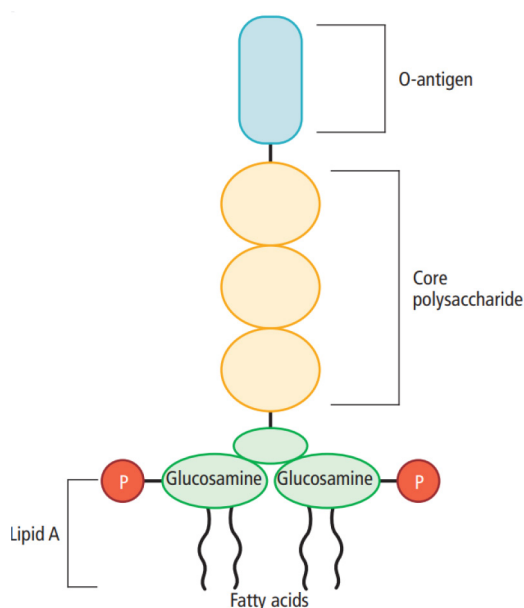
باکتری‌های گرم منفی، LPS را به عنوان بخشی از وزیکول‌های غشای خارجی (Outer membrane vesicles, OMV) نیز آزاد می‌کنند. این وزیکول‌ها عملکردهای متنوعی از جمله ترشح پروتئین‌های مهم در کلونیزاسیون میزبان، تحویل اتولیزین‌ها در محیط‌های رقابتی، بقای باکتری‌ها برای کشتن سایر رقبا و کسب مواد مغذی دارند (۳، ۵). اندوتوکسین‌ها از نظر سمیت و آنتی‌ژنیسیته در سطح متوسط قرار دارند. با این حال، برخی حیوانات مانند گاوها، حساسیت بالایی نسبت به این ترکیبات نشان می‌دهند و تفاوت‌هایی در واکنش به اندوتوکسین، یا اندوتوکسین‌زایی، میان آنتی ژن‌های مختلف باکتریایی مشاهده می‌شود (جدول



نوزادان، پلوروپنومونی، پریتونیت، کولیت مرتبط با سالمونلا یا متریت باشد. لیپوپلی ساکاریدهای باکتری‌های گرم منفی از قوی‌ترین محرک‌های تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی محسوب می‌شوند. پس از ورود اندوتوکسین به گردش خون عمومی، فعال‌سازی شدید سیستم دفاعی ایمنی ذاتی آغاز می‌شود. با توجه به خاصیت آمفی‌فیلیک اندوتوکسین، بخش لیپید A (هیدروفوبیک و سمی) آن در خون در مرکز ساختار شبه میسل قرار می‌گیرد. پروتئین متصل‌شونده به

شماره ۱). این مسئله به‌خصوص در فرمولاسیون واکسن‌های چندگانه حائز اهمیت است تا انواعی که خاصیت اندوتوکسین‌زایی بالایی دارند، به‌طور هم‌زمان استفاده نشوند (۱).

اندوتوکسین به‌طور خودبه‌خود در مرحله رشد لگاریتمی باکتریایی با لیز شدن باکتری آزاد می‌شود. از این‌رو، اندوتوکسمی می‌تواند پیامد هرگونه تهاجم موضعی گسترده یا سیستمیک باکتری‌های گرم منفی مانند سپتی‌سمی در



تصویر شماره ۱- ساختار عمومی لیپوپلی ساکارید باکتریایی گرم منفی (۵).

جدول شماره ۱- اندوتوکسین‌زایی آنتی‌ژن‌های رایج باکتریایی استفاده شده در واکسن‌های دامی (۱).

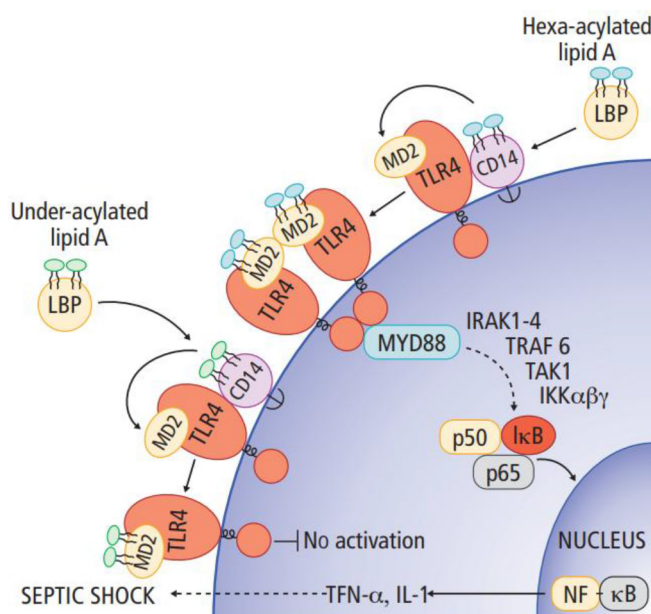
| آنتی‌ژن (بیماری اولیه در گاو)      | اندوتوکسین‌زایی آنتی‌ژن |
|------------------------------------|-------------------------|
| اشریشیا کولی (ورم پستان)           | زیاد                    |
| موراکسلا بویس (چشم صورتی)          | زیاد                    |
| هیستوفیلوس سومنی (برونکوپنومونی)   | زیاد                    |
| گونه‌های سالمونلا (سالمونلوزیس)    | متوسط                   |
| اشریشیا کولی (اسهال)               | متوسط                   |
| منهمیا همولیتیکا (برونکوپنومونی)   | متوسط                   |
| پاستورلا مولتوسیدا (برونکوپنومونی) | متوسط                   |
| گونه‌های لپتوسپیرا (لپتوسپیروزیس)  | کم                      |

قابل توجه است که برخی از اجزای باکتریایی (جدول شماره ۲) از جمله اسید لیپوتیکوئیک (Lipoteichoic acids, LTA) باکتری‌های گرم مثبت و اگزوتوکسین‌هایی مانند لکوتوکسین که در فاز لگاریتمی باکتری‌های گرم مثبت آزاد می‌شوند، مشابه اندوتوکسین باکتری‌های گرم منفی عمل نموده و برای سلول‌های حیوانی سمی هستند. به این خاطر، در سبب‌شناسی نشانگان شوک اندوتوکسیک و افتراق آن از سایر عوامل ایجادکننده شوک سپتیک نقش سایر اجزای القاکننده سایتوکاین‌های پیش التهابی باید مدنظر باشد (۱، ۷).

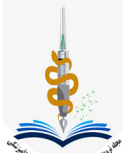
تمام واکسن‌های سلول کامل تهیه شده از باکتری‌های گرم منفی، حاوی اندوتوکسین هستند که از فرایند تولید ناشی می‌شوند. در واکسن‌هایی که به‌درستی تولید و استفاده می‌شوند، قسمت عمده اندوتوکسین به‌صورت متصل بوده و به شکل آزاد وجود ندارند. واکسن‌هایی که حاوی سلول کامل باکتریایی از اشیرشیا کولی، سالمونلا، هیستوفیلوس، موراکسلا، کمپیلوباکتر، پاستورلا و منهپیا هستند، احتمالاً حاوی مقادیری اندوتوکسین هستند. واکسن‌های زیرواحد که حاوی پروتئین‌های غشای بیرونی تخلیص شده مانند پیلی یا فیمبریه باکتری‌های گرم منفی در ترکیب خود هستند، حاوی مقادیر بسیار کمتری اندوتوکسین هستند و استفاده از آنها احتمالاً به انباشتگی اندوتوکسین منجر نمی‌شود (۸). تجویز هم زمان چند واکسن کشته باکتریایی (باکترین‌ها)

لیپوپلی ساکارید (LBP) گلیکوپروتئینی است که غلظت آن در پاسخ فاز حاد افزایش می‌یابد و به‌عنوان یک مولکول حامل عمل کرده و به طور مؤثر مولکول‌های اندوتوکسین را از تجمعات در حال گردش جدا می‌کند. سپس، کمپلکس اندوتوکسین - LBP به سطح سلول‌های دفاعی میزبان (عمدتاً مونوسیت‌ها و ماکروفاژها) منتقل می‌شود و در آنجا گیرنده‌های غشایی اندوتوکسین شامل CD14, TLR4, MD2 قرار دارند. فعال‌سازی کمپلکس CD14/Toll4/MD2 نقش محوری در اندوتوکسمی ایفا می‌کند، چرا که آبشارهای پیچیده سیگنالینگ داخل سلولی را آغاز نموده که در نهایت منجر به رونویسی از ژن‌های کدکننده مولکول‌های التهابی از جمله سایتوکاین‌هایی مانند IL-1, IL-6, و TNF- $\alpha$  می‌شود (تصویر شماره ۲) (۵).

این سایتوکاین‌ها با فعالیت زیستی قوی خود مسئول عوارض جانبی ناشی از مواجهه با اندوتوکسین هستند که طیف وسیعی از تظاهرات بالینی شامل التهاب موضعی، تب، ضعف، تحریک سنتز و ترشح پروتئین‌های فاز حاد توسط کبد، کاهش راندمان خوراک و در غلظت‌های بالا منجر به کاهش قند خون، کاهش برون‌ده قلبی، شوک و انعقاد داخل عروقی منتشر می‌شود. علاوه بر لیپوپلی ساکاریدها، سایر اجزای باکتریایی فهرست شده در جدول شماره ۲ نیز قادر به تحریک تولید این سایتوکاین‌ها به‌ویژه در هنگام آزادسازی از سلول‌های باکتریایی تخریب شده، هستند (۷).



تصویر شماره ۲- بر همکنش اندوتوکسین با پروتئین متصل شونده به لیپوپلی ساکارید (LBP) و مولکول‌های سطح سلول MD2, CD14 و گیرنده شبه TLR4 (TLR4) (۵).



پوند (معادل ۶۸۰ کیلوگرم) EU 3400 خواهد بود (۱۱). تولیدکنندگان واکسن‌های انسانی معمولاً میزان اندوتوکسین موجود در محصول نهایی خود را در مشخصات هر سری از واکسن‌ها منتشر نمی‌کنند. اما برخی از آزمایشگاه‌های مستقل، مطالعاتی را در این زمینه انجام داده و گزارش‌هایی از تجزیه و تحلیل سطح اندوتوکسین در انواع واکسن‌ها ارائه می‌کنند. این مقادیر نباید به عنوان محدودیت‌های تعیین شده از سوی شرکت‌های تولیدکننده تلقی شوند، بلکه صرفاً نشان‌دهنده سطوح اندوتوکسین اندازه‌گیری شده مجموعه‌ای از واکسن‌ها طی سال‌های مختلف است (۱۲).

مطابق با استاندارد USP، محدودیت‌های اندوتوکسین بر اساس EU/kg وزن بدن تعیین می‌شود. با در نظر گرفتن حجم متوسط نیم میلی‌لیتر برای هر دوز واکسن انسانی، می‌توان مقادیر اندوتوکسین را محاسبه و با حد مجاز USP مقایسه کرد. از آنجایی که واکسن‌ها مشمول محدودیت‌های اندوتوکسین تعیین شده در USP نیستند، سطوح پیشنهادی اندوتوکسین برای انواع مختلف واکسن، بر اساس یافته‌های مطالعات مختلف، در جدول شماره ۳ خلاصه شده است (۱۲).

### سنجش اندوتوکسین در واکسن

وجود اندوتوکسین در واکسن‌های مشتق از باکتری‌های گرم منفی اجتناب‌ناپذیر است و مقدار آن به مراحل تخلیص واکسن بستگی دارد. در تولید واکسن‌های کشته/غیرفعال، غیرفعال‌سازی شیمیایی و استفاده از معرف‌ها و بافرها به کاهش بار میکروبی کمک می‌کند. فیلتراسیون حین تولید به

حاوی این اجزاء، به‌ویژه در فرمولاسیون‌های حاوی اجوانت، می‌تواند منجر به آزادسازی و افزایش قابل توجه سایتوکاین‌های پیش التهابی شود. اگرچه مقادیر کم این سایتوکاین‌ها برای القای پاسخ ایمنی مفید است، تولید بیش از حد آن‌ها می‌تواند منجر به عوارض جانبی از خفیف تا شدید شود (۳، ۱).

لیپوپلی‌ساکاریدهای باکتریایی و مشتقات آن‌ها اگرچه می‌توانند به عنوان ادجوانت عمل کنند، اما به دلیل سمیت بالا کاربرد محدودی دارند. این ترکیبات می‌توانند موجب افزایش تولید آنتی‌بادی شوند، اما بر ایمنی سلولی تأثیر مستقیمی ندارند. مونوفسفوریل لیپید MPLA (A)، یک مشتق سم‌زدایی شده از لیپوپلی‌ساکارید باکتری سالمونلا است که کمتر از ۱٪ سمیت اندوتوکسین اصلی را دارد. اجوانت سیستم ۴ (Adjuvant system 4, AS04, GSK, Biologicals)، ترکیب MPLA با هیدروکسید آلومینیوم است و در واکسن‌های هیپاتیت B و ویروس پاپیلوما‌ی انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹).

### مقدار مجاز اندوتوکسین در واکسن

در حال حاضر، در واکسن‌های دامپزشکی هیچ استاندارد نظارتی برای حد مجاز اندوتوکسین وجود ندارد. با این حال، فارماکوپه ایالت متحده (USP) مقدار 5 EU/kg وزن بدن حیوان را به عنوان حد مجاز برای ارزیابی‌های پیش‌بالینی توصیه می‌کند. بر این اساس، حداکثر مقدار اندوتوکسین مجاز در ایمن‌سازی یک گاو شیریه هلشتاین با وزن ۱۵۰۰

جدول شماره ۲- اجزای باکتریایی القاکننده سایتوکاین‌های پیش التهابی (۷).

|                                          |
|------------------------------------------|
| لیپوپلی‌ساکارید                          |
| لیپید A                                  |
| پورین‌ها                                 |
| پپتیدهای مورامیل (Muramyl peptides)      |
| پپتیدوگلیگان                             |
| لیپوپروتئین‌های مایکوپلازما              |
| اسید تیکوئیک                             |
| اسیدهای لیپو تیکوئیک                     |
| لیپوآرابینومانان‌ها (Lipoarabinomannans) |
| پروتئین A                                |
| سوپر آنتی‌ژن‌ها                          |

مشتق از آمبوسیت‌های خرچنگ نعل‌اسبی (*Limulus polyphemus*) در حضور LPS طراحی شده است و برای سنجش اندوتوکسین در محصولات بیولوژیکی تحت نظارت FDA ضروری است (۹).

استفاده از معرف نو ترکیب فاکتور C (Recombinant Factor C, rFC) به عنوان جایگزینی برای LAL توسط فارماکوپه‌های اروپا، آمریکا، ژاپن و چین پیشنهاد شده است (۱۰).

### روش‌های حذف اندوتوکسین در واکسن

حذف اندوتوکسین از فرآورده‌های بیولوژیک، یک چالش مهم در صنایع دارویی و زیست‌فناوری است. مطمئن‌ترین روش برای جلوگیری از آلودگی میکروبی و به دنبال آن نشت اندوتوکسین، حفظ استریلیتی کامل در سراسر فرایند تولید است. اما در صورت لزوم حذف اندوتوکسین، باید روشی انتخاب کرد که بخش مهمی از محصول هدف بازیابی شود (۱۳). در زیر روش‌های متداول برای حذف یا کاهش اندوتوکسین از فرآورده‌های بیولوژیک آورده شده است:

کروماتوگرافی:

الف) کروماتوگرافی تبادل یونی (Ion Exchange Chromatography): اندوتوکسین‌ها معمولاً بار منفی دارند و از رزین‌های با بار مثبت مانند DEAE یا Q-Sepharose

حذف عوامل میکروبی، کمک می‌کند، اما اندوتوکسین‌های تولید شده قبلی معمولاً از بین نمی‌روند (۹). سنجش میزان اندوتوکسین در طول فرایند تولید و برای ترخیص نهایی محصول انجام می‌شود و برای این منظور از تست اندوتوکسین باکتریایی (Bacterial Endotoxin Test, BET) استفاده می‌شود که بسته به نوع محصول می‌تواند همراه با آزمایش پایروژن یا تب‌زایی (Pyrogen test) انجام شود (۹). این سنجش‌ها برای چهار هدف اصلی استفاده می‌شوند:

۱- آزمایش نظارت بر فرایند تولید،

۲- آزمایش کنترل حین فرایند،

۳- آزمایش بالک نهایی، ترخیص محصول و مواد خام

۴- آزمایش آب محیطی.

آزمایش اندوتوکسین تضمین می‌کند که مقدار اندوتوکسین در محصولات بیولوژیکی پایین‌تر از آستانه بالینی باشد. آزمایش اندوتوکسین آب برای اطمینان از بهره‌مندی از کیفیت بالای آب مصرفی در تمام مراحل تولید انجام می‌شود (۱۰).

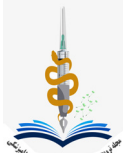
در حال حاضر از دو آزمایش برای تشخیص LPS در واکسن‌ها استفاده می‌شود:

۱- آزمایش پایروژن خرگوش (Rabbit pyrogen test) که برای ردیابی همه اجزای تب‌زا به کار می‌رود؛

۲- آزمایش لیمولوس آمبوسیت لیزات (*Limulus amebocyte lysate, LAL*) که بر اساس لخته شدن لیزات

جدول شماره ۳- مقادیر اندوتوکسین گزارش شده برای انواع واکسن‌ها (۱۲).

| نوع واکسن                        | بیشترین میزان اندوتوکسین توصیه شده (EU/mL) | علت                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| مبتنی بر ناقل‌های ژنتیکی         | <۱۰                                        | این نوع واکسن‌ها به فرایندهای خالص‌سازی گسترده نیاز دارند.                                                                                                            |
| زیر واحد نو ترکیب و پلی‌ساکاریدی | <۲۰                                        | به دلیل خلوص بالای محصول نهایی و فرایند تولید بسیار کنترل شده                                                                                                         |
| زنده تخفیف حدت یافته             | <۲۰۰                                       | به دلیل ماهیت پیچیده آن‌ها و حضور آنتی‌ژن‌های متعدد                                                                                                                   |
| غیرفعال شده                      | <۵۰۰                                       | باتوجه به ترکیبات موجود و ماهیت فرایند تولید                                                                                                                          |
| توکسوئیدی                        | <۲۰۰۰۰                                     | به دلیل پیچیدگی و روش تهیه این واکسن‌ها که عمدتاً از باکتری‌هایی با حداقل فرایند خالص‌سازی مشتق شده‌اند، بالاترین مقدار توصیه شده برای این گروه در نظر گرفته شده است. |



این روش جذب و حذف آنها استفاده می‌شود. با این حال، ممکن است پروتئین‌های هدف با بار منفی نیز حذف شوند یا پروتئین‌های با بار مثبت با اندوتوکسین کمپلکس تشکیل داده و کارایی حذف را کاهش دهند. بهینه‌سازی این روش با تنظیم pH امکان‌پذیر است (۱۴، ۱۳). در رزین‌های تجاری Thermo Scientific Pierce High Capacity Endotoxin Removal از پلیمرهای طبیعی مانند سلولز و پلی (ε-لیزین) استفاده شده است. این رزین‌ها قادر به حذف بیش از ۹۰٪ اندوتوکسین از نمونه‌های پروتئینی می‌باشند.

ب) کروماتوگرافی تمایلی با پلی میکسین B (Polymyxin B affinity chromatography): این روش از ستون‌های حاوی پلی میکسین B که به لیپید A اندوتوکسین متصل می‌شود، برای حذف انتخابی اندوتوکسین استفاده می‌کند. سایر لیگاندها مانند هیستیدین نیز قادر به جذب اندوتوکسین هستند. شستشو با دترجنت‌ها یا اتانول برای آزادسازی LPS انجام می‌شود (۱۴، ۱۳). در کیت‌های EtEraser از لیگاندهای اختصاصی مانند پلی میکسین B اصلاح شده، استفاده شده است و می‌تواند بیش از ۹۹٪ اندوتوکسین را در کمتر از دو ساعت حذف کند. این کیت‌ها برای نمونه‌های مختلف بیولوژیکی از جمله داروهای پروتئینی و واکسن‌ها مناسب هستند.

ج) هیدرولیز اسید و باز: هیدرولیز اسیدی یا قلیایی باعث کاهش یا حذف فعالیت بیولوژیکی LPS با کتریایی از طریق غیرفعال کردن لیپید A می‌شود. حذف اندوتوکسین با استفاده از ۰/۵ HCl N به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد یا اسید استیک ۱٪ به مدت دو تا سه ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. هیدرولیز قلیایی LPS با استفاده از ۰/۱ NaOH N در ۹۵٪ اتانول یا ۸۰٪ دی متیل سولفو کسید باعث بهبود فرایند حذف می‌شود (۱۳، ۱۴).

د) اکسیداسیون: به نظر می‌رسد آب اکسیژنه ( $H_2O_2$ ) از طریق اکسیداسیون اسیدهای چرب موجود در بخش لیپید A LPS عمل می‌کند. جوشاندن به مدت ۲ ساعت در حضور ۰/۱٪  $H_2O_2$  برای سم‌زدایی پیروژن‌ها در محلول‌های تزریقی مانند آب استریل، نرمال سالین و دکستروز - سالین مؤثر است.  $H_2O_2$  غیرسمی است، به راحتی از محلول‌ها حذف می‌شود (۱۳، ۱۴).

روش‌های فیزیکی:

الف) حرارت‌دهی: اندوتوکسین‌ها به حرارت مقاوم هستند، اما حرارت بالا در مدت زمان طولانی می‌تواند مؤثر واقع شود. حرارت خشک ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه یا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت، سطح اندوتوکسین را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. حرارت مرطوب با اتوکلاو در ۲۰ psi به مدت ۵ ساعت در pH=۸/۲ یا ۲ ساعت در pH=۳/۸، به خوبی عمل می‌کند. این روش برای مواد مقاوم به حرارت (مثل برخی پلیمرها و نیز ظروف شیشه‌ای) قابل استفاده است (۱۳، ۱۴).

ب) پرتودهی (تابش گاما یا UV): در برخی موارد از پرتودهی برای غیرفعال کردن LPS استفاده می‌شود. تابش UV-C می‌تواند حلقه‌های آروماتیک در ساختار LPS را تخریب کند، اما ممکن است به پروتئین‌ها نیز آسیب بزند (۱۳، ۱۴).

### انباشتگی اندوتوکسین در واکسن

انباشتگی اندوتوکسین عارضه‌ای است که معمولاً زمانی رخ می‌دهد که چندین واکسن حاوی اندوتوکسین (باکتری‌های گرم منفی) به طور هم‌زمان به دام تزریق شوند. این پدیده به دلیل آزادسازی اندوتوکسین‌ها، پاسخ ایمنی شدیدی را از طریق آبشار سایتوکاینی ایجاد می‌کند که می‌تواند به سطح سمی کشنده برسد. شدت این واکنش به مقدار و نوع

برای جذب و حذف آنها استفاده می‌شود. با این حال، ممکن است پروتئین‌های هدف با بار منفی نیز حذف شوند یا پروتئین‌های با بار مثبت با اندوتوکسین کمپلکس تشکیل داده و کارایی حذف را کاهش دهند. بهینه‌سازی این روش با تنظیم pH امکان‌پذیر است (۱۴، ۱۳). در رزین‌های تجاری Thermo Scientific Pierce High Capacity Endotoxin Removal از پلیمرهای طبیعی مانند سلولز و پلی (ε-لیزین) استفاده شده است. این رزین‌ها قادر به حذف بیش از ۹۰٪ اندوتوکسین از نمونه‌های پروتئینی می‌باشند.

ب) کروماتوگرافی تمایلی با پلی میکسین B (Polymyxin B affinity chromatography): این روش از ستون‌های حاوی پلی میکسین B که به لیپید A اندوتوکسین متصل می‌شود، برای حذف انتخابی اندوتوکسین استفاده می‌کند. سایر لیگاندها مانند هیستیدین نیز قادر به جذب اندوتوکسین هستند. شستشو با دترجنت‌ها یا اتانول برای آزادسازی LPS انجام می‌شود (۱۴، ۱۳). در کیت‌های EtEraser از لیگاندهای اختصاصی مانند پلی میکسین B اصلاح شده، استفاده شده است و می‌تواند بیش از ۹۹٪ اندوتوکسین را در کمتر از دو ساعت حذف کند. این کیت‌ها برای نمونه‌های مختلف بیولوژیکی از جمله داروهای پروتئینی و واکسن‌ها مناسب هستند.

اولترافیلتراسیون:

این روش با استفاده از فیلتراسیون غشایی، اندوتوکسین را از پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین جدا می‌کند. اندوتوکسین‌های منومر (۲۰-۱۰ کیلودالتون) با فیلترهای ۱۰ کیلودالتونی حذف می‌شوند، هرچند اندوتوکسین‌ها می‌توانند تجمعات بزرگی تا ۱۰۰۰ کیلودالتون تشکیل دهند. این روش برای نمونه‌های حجیم مانند فرآورده‌های تخمیر باکتریایی مناسب است، اما ممکن است به پروتئین‌ها آسیب برساند و کارایی را کاهش دهد (۱۳، ۱۴).

سیستم‌های دوفازی میسل:

در این سیستم، محلول سورفکتانت به دوفاز غیرقابل امتزاج تقسیم می‌شود که یکی غنی از میسل و دیگری عاری از میسل است. این تفاوت فیزیکی شیمیایی، منجر به جداسازی مؤثر مواد بیولوژیکی می‌شود. اندوتوکسین‌ها در میسل‌ها جای گرفته و از فاز آبی جدا می‌شوند. جداسازی فازها با سانتریفیوژ یا افزایش دما انجام می‌شود. این روش برای پروتئین‌های آب‌دوست و DNA کاربرد دارد، اما به دلیل نیاز به تکرارهای متعدد، زمان‌بر بوده و در مقیاس بزرگ دشوار است، همچنین ممکن است ۱۰ تا ۲۰ درصد محصول از بین برود (۱۳، ۱۴).

روش‌های شیمیایی:

الف) پلی میکسین B در محلول: این آنتی‌بیوتیک به لیپید A اندوتوکسین متصل شده و باعث تشکیل کمپلکس‌هایی می‌شود که با سانتریفیوژ یا فیلتراسیون جدا می‌شود. مشکل

در فاز هایپر دینامیک، علائم شامل خمیازه کشیدن مداوم، رنگ پریدگی غشاهای مخاطی (تصویر ۳ راست)، بی حالی، بی اشتها، افزایش ضربان قلب و تنفس، بی قراری، لرزش عضلانی، کولیک و مدفوع شل است. این مرحله با افزایش فشار شریان ریوی و بروز ایلئوس همراه است. با پیشرفت به فاز هیپودینامیک، تب، افت فشارخون، و پر خونی غشاهای مخاطی ظاهر می شود. کاهش پرفیوژن بافتی به بروز خط سمی (خط قرمز تا بنفش در لثه) به ویژه در بالای دندان های ثنایای فوقانی دام بالغ (تصویر ۳ وسط)، سردی اندام ها و طولانی شدن زمان پر شدن مویرگ ها منجر می شود. در مراحل پیشرفته، غشاهای مخاطی سینانوتیک (آبی - بنفش) شده و در مراحل پیشرفته به بنفش کم رنگ و مایل به خاکستری تغییر می کند (تصویر ۳ چپ).

نبض ضعیف می شود و افسردگی شدید و کاهش هوشیاری رخ می دهد. هنگامی که پاسخ التهابی به اندوتوکسین کنترل نشده و بدخیم باشد، سندرم پاسخ التهابی سیستمیک ایجاد می شود. در این مرحله، هر یک از علائم بالینی مورد بحث در بالا ممکن است وجود داشته باشد و به صورت پویا تشدید شوند. علاوه بر این، با ازدست دادن هموستاز ایمنولوژیک، تغییرات بعدی در همودینامیک، تولید واسطه های پیش التهابی و انعقاد تنظیم نشده، باعث می شود علائم بالینی شوک سپتیک، سندرم نارسایی چند عضوی و انعقاد درون رگی منتشر ایجاد شود (۵).

### تشخیص افتراقی شوک اندوتوکسیک

تشخیص شوک اندوتوکسیک از سایر انواع شوک، به ویژه شوک آنافیلاکتیک، دشوار است، زیرا هر دو از طریق سایتوکاین ها عمل می کنند. تفاوت ها عبارت اند از (۱۵):  
- شوک اندوتوکسیک: به کندی (طی ساعات) ظاهر

اندوتوکسین (متصل یا آزاد) و وضعیت فیزیولوژیک دام بستگی دارد. گزارش ها نشان می دهند که اندوتوکسین های حاصل از منابع باکتریایی متعدد، نسبت به یک منبع واحد، پاسخ های شدیدتری ایجاد می کنند (۱، ۳، ۸).

توصیه های واکسیناسیون در دام های بزرگ اغلب فاقد پشتوانه علمی بوده و بر سنت ها متکی است. کمبود مطالعات میدانی تصادفی شده، ارزیابی کارایی واکسن ها را دشوار کرده است. عدم رعایت دستورالعمل های برچسب واکسن، به ویژه در شرایط پر استرس دامداری ها، شایع است و خطر انباشتگی اندوتوکسین را افزایش می دهد، به خصوص هنگامی که دو یا چند باکترین گرم منفی هم زمان تجویز شوند (۱).

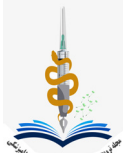
پاتوفیزیولوژی برهم کنش باکترین های چند گانه، به ویژه در دام های تحت استرس، نیازمند تحقیقات بیشتری است. تخمین انباشتگی اندوتوکسین و اثرات آن بر سلامت دام به دلیل تنوع پروتکل های واکسیناسیون چالش برانگیز است. در محیط های تولیدی، استفاده هم زمان از چندین واکسن، گاهی همراه با محصولات بیولوژیکی یا دارویی مثل آنتی بیوتیک ها، رایج است که می تواند تداخلات منفی ایجاد کند. این برهم کنش ها هنوز به خوبی شناخته نشده و نیاز به مطالعه دارد (۱).

### شوک اندوتوکسیک

شوک اندوتوکسیک یک وضعیت تهدید کننده حیات است که با آزادسازی اندوتوکسین به جریان خون (اندوتوکسمی) ایجاد می شود. این حالت می تواند پس از نابودی باکتری های گرم منفی یا انباشتگی اندوتوکسین در اثر واکسیناسیون رخ دهد و به سندرم هایی مانند سندرم نارسایی چند عضوی (MODS)، سندرم پاسخ التهابی سیستمیک (SIRS) و انعقاد درون رگی منتشر (DIC) منجر شود (۵).



تصویر شماره ۳- راست) کم خونی مخاط دهان. وسط) خط سمی کلاسیک. یک خط قرمز تا آبی - بنفش در حاشیه لثه، به ویژه در بالای دندان های ثنایای فوقانی (نشانگر سفید) قابل توجه است. چپ) غشاهای مخاطی سینانوتیک آبی تا بنفش ناحیه دهان (۵).



### توصیه ترویجی

برای جلوگیری از اثرات نامطلوب احتمالی اندوتوکسین در واکسن‌های دامی، رعایت توصیه‌های زیر ضروری است:

- تهیه راهنماهای مبتنی بر شواهد: وجود راهنماهای واکسیناسیون مبتنی بر شواهد برای سیستم‌های پرورش گاو شیری و گاوگوشتی، با توجه ویژه به غلظت اندوتوکسین و شرایط حمل و نقل باکترین‌های گرم منفی، الزامی است.
- محدودیت آنتی‌ژن‌ها: تعداد آنتی‌ژن‌ها در هر بار واکسیناسیون باید محدود شود. شرکت‌های سازنده باید واکسن‌های با اندوتوکسین‌زایی بالا را به تنهایی یا همراه با واکسن‌های ویروسی فرموله کنند تا خطر انباشتگی اندوتوکسین کاهش یابد.

- استریلیتی کامل: حفظ استریلیتی در تمام مراحل تولید فراورده‌های بیولوژیکی برای جلوگیری از آلودگی میکروبی و نشأت اندوتوکسین ضروری است. در صورت نیاز، از روش‌های حذف اندوتوکسین استفاده شود.
- استفاده صحیح از واکسن: واکسن‌ها باید مطابق دستور سازنده استفاده شوند و از تزریق واکسن‌های تاریخ گذشته خودداری گردد.

- نگهداری مناسب واکسن: از تکان دادن شدید و انجماد واکسن‌ها اجتناب شود. واکسن‌ها در دمای توصیه شده نگهداری شوند و از قرار گرفتن در معرض نور مستقیم آفتاب جلوگیری گردد.

- اجتناب از تزریق هم‌زمان: از تزریق هم‌زمان بیش از یک واکسن حاوی آنتی‌ژن گرم منفی پرهیز شود و حداقل یک هفته فاصله رعایت گردد یا در بخش‌های مختلف بدن تزریق شوند.

- بررسی وضعیت حیوان: قبل از واکسیناسیون، وضعیت فیزیولوژیک و ایمنولوژیک حیوان بررسی شود. از واکسیناسیون حیوانات بیمار یا تحت استرس خودداری شود.
- انتخاب سرسوزن مناسب: از سرسوزن‌هایی با گیج و طول متناسب با ویسکوزیته واکسن استفاده شود و پس از هر ۱۰ حیوان یا در صورت آلودگی تعویض شوند.

### فهرست منابع

1. Richeson JT, Hughes HD, Broadway PR, Carroll JA. Vaccination management of beef cattle: delayed vaccination and endotoxin stacking. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2019;35(3):575-92.
2. Williams KL. Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation: CRC Press; 2007.
3. Eckel EF, Ametaj BN. Bacterial endotoxins and their role in periparturient diseases of dairy cows: mucosal vaccine perspectives. Dairy. 2020;1(1):61-90.

می‌شود، جمعیت زیادی را درگیر می‌کند و با علائم سیستمیک همراه است.

- شوک آنافیلاکتیک: سریع (طی دقائق) رخ می‌دهد، تعداد محدودی دام درگیر می‌شوند و با علائم آلرژی همراه است.

شوک سپتیک نیز مشابه اندوتوکسین است؛ اما ممکن است عوامل متعددی فراتر از اندوتوکسین (مثل اجزای باکتریایی گرم مثبت و قارچ‌ها) در آن نقش داشته باشند. از جمله سایر تشخیص‌های تفریقی می‌توان شوک هیپوولمیک و هموراژیک را نام برد، مانند شرایطی که در خونریزی، اسهال و یا سوختگی رخ می‌دهد. همین‌طور شوک قلبی که به علت نارسایی قلبی بروز می‌کند، ایسکمی روده، پریتونیت سپتیک یا جفت ماندگی نیز باید مدنظر باشند.

### مدیریت بالینی

اثر بخشی درمان در دام‌های مزرعه محدود بوده و پیشگیری اولویت دارد. درمان شوک اندوتوکسمی باید در کنار سایر نشانگان SIRS و MODS مانند نارسایی کلیوی و لیمینیت و DIC مدنظر باشد. مدیریت اندوتوکسمی بر سه محور است (۵، ۶):

۱. جلوگیری از انتشار اندوتوکسین:  
در صورت ارتباط عارضه با واکسن، استفاده از آن باید متوقف شود. عوامل زمینه‌ای شناسایی و به شرکت سازنده و سازمان دامپزشکی گزارش شود.

۲. خنثی‌سازی اندوتوکسین:  
استفاده از پلی‌میکسین B (دوز 1000 IU/kg IV - 6000 هر ۱۲-۸ ساعت) یا سرم‌های حاوی آنتی‌بادی ضد اندوتوکسین توصیه می‌شود. پس از شروع سیگنال‌دهی سلولی، موفقیت درمان کاهش می‌یابد.

۳. کنترل پاسخ التهابی:  
- مایع درمانی: سالین هایپرتونیک (۵٪) با حجم کم برای بهبود پرفیوژن ترجیح دارد. در صورت استفاده از کریستالوئیدها، سرعت کمتر از 20 mL/kg/h توصیه می‌شود.

- داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs): فلونکسین مگلو مین (1/1-0/25 mg/kg IV هر ۱۲-۸ ساعت) برای کاهش التهاب مؤثر است.

- گلوکز و انسولین: انفوزیون گلوکز (3۷mg/kg/h) و انسولین (0/07 U/kg/h) از هیپوگلیسمی جلوگیری می‌کند. آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به علت لیز باکتری‌ها اندوتوکسین را افزایش دهند، اما مصرف توأمان آمینوگلیکوزیدها با بتالاکتام‌ها همراه با NSAID رهیافت منطقی است.



4. Derksen B. Gram-negative vaccines need caution 2021 [Available from: <https://www.producer.com/livestock/gram-negative-vaccines-need-caution/>].
5. Wilkins P-S. Equine Emergency and Critical Care Medicine: CRC Press; 2015.
6. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats: Elsevier Health Sciences; 2016.
7. Roth JA. Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. Advances in veterinary medicine. 1999;41:681-700.
8. AAEP vaccination guidelines 2021 [Available from: <http://www.aabp.org/committees/resources/VaccGuidelines2021.pdf>].
9. Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, Plotkin SA. Plotkin's Vaccines, E-Book: Elsevier Health Sciences; 2024.
10. Marius M, Vacher F, Bonnevey T. Comparison of LAL and recombinant Factor C endotoxin testing assays in human vaccines with complex matrices. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2020.
11. Bovilis j5 Tech Bulletin, Merck Animal Health, USA [Available from: <https://www.merck-animal-health-usa.com/offload-downloads/bovilis-j-5-tech-bulletin>].
12. Brito LA, Singh M. Commentary: acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. Journal of pharmaceutical sciences. 2011;100(1):34-7.
13. 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.
14. Batista PdOMD, Lopes AM, Mazzola PG, Yagui CdOR, Penna TCV, Pessoa Júnior A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. 2007.
15. Baradaran-Seyed Z, Pishraft-Sabet L. Hypersensitivity following vaccination: Types, mechanism of action, and clinical management (in Persian). Promotional journal of vaccines and disease prevention in veterinary medicine. 2025;4(1).

