DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* POTENCY ASSAY FOR ANTIVENOM AGAINST THE MALAYAN PIT VIPER (*CALLOSELASMA RHODOSTOMA*)

DUANGPORN PORNMUTTAKUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003

ISBN 974-04-4076-2
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพัฒนาวิธีการหาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูกะปะโดยวิธีทางหลอดทดลอง (*in vitro*)
(DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* POTENCY ASSAY FOR ANTIVENOM AGAINST THE MALAYAN PIT VIPER [*CALLOSELASMA RHODOSTOMA*])

ดวงพร พรมุทธกุล 4237001 SCMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D., ชโลบล อยู่สุข, Ph.D., สุเทพ ไวยครุฑธา, Ph.D.

บทคัดย่อ

การให้เซรุ่มแก้พิษงูเป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดที่มีประสิทธิภาพที่สุด ประสิทธิภาพในการรักษาจะขึ้นกับความแรง (potency) ของเซรุ่มที่ใช้ ในการวัดหาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูมักจะกระทำโดยการวัดผลการทำลายพิษงูในหนูทดลอง (*in vivo* neutralization assay) ซึ่งเป็นวิธีที่ ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน ให้ผลที่ไม่คงที่ และใช้สัตว์ทดลองจำนวนมาก ยังผลให้สัตว์ได้รับความทรมานและเป็นทุกข์แก่ผู้ทดลอง ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีทางหลอดทดลองเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว

ในการศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธีทางหลอดทดลองโดยอาศัยคุณสมบัติของเซรุ่มแก้พิษงูกะปะในการต้านเอนไซม์ในพิษงูกะปะที่ทำให้พลาสมาแข็งตัวเป็นเกณฑ์ในการหาความแรงของเซรุ่ม ได้ทำการหาความแรงของเซรุ่มโดยใช้วิธีทางหลอดทดลอง ซึ่งความแรงของเซรุ่มจากวิธีทางหลอดทดลองคืออัตราส่วนของปริมาณเซรุ่มต่อปริมาณพิษงูซึ่งสามารถชะลอเวลาที่ทำให้พลาสมาแข็งตัวซึ่งเกิดจากพิษงูปริมาณสองเท่าของ minimum coagulant dose ได้เป็นสามเท่า เมื่อทำการหาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูกะปะจำนวน 11 รุ่น โดยวิธีทางหลอดทดลองและวิธีใช้สัตว์ทดลอง พบว่าความแรงของเซรุ่มที่ได้จากทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์แปรผันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.95 (p value < 0.001)

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการหาความแรงโดยวิธีทางหลอดทดลองโดยอาศัยคุณสมบัติของเซรุ่มในการต้านเอนไซม์ในพิษงูกะปะที่ทำให้พลาสมาแข็งตัว เป็นทางเลือกหนึ่งซึ่งสามารถนำไปใช้หาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูกะปะได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความสัมพันธ์กับการหาความแรงโดยการใช้สัตว์ทดลองโดยไม่ต้องอาศัยสัตว์ทดลอง

75 หน้า. ISBN 974-04-4076-2

DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* POTENCY ASSAY FOR ANTIVENOM AGAINST THE MALAYAN PIT VIPER (*CALLOSELASMA RHODOSTOMA*)

DUANGPORN PORNMUTTAKUN 4237001 SCMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS : KAVI RATANABANANGKOON, Ph.D., CHALOBON YOOSOOK, Ph.D., SUTHEP WIYAKRUTTA, Ph.D.

ABSTRACT

Snake antivenoms are considered to be the most effective and specific antidotes for snake envenomation. The potency of antivenom is usually determined by *in vivo* neutralization of venom lethality using mice. This method is laborious, expensive, time consuming and gives variable results. In each antivenom potency assay, dozens of animals are used with the accompanied pain and suffering of both the animals and the experimenter. Therefore, *in vitro* assay should be developed to avoid these problems.

In this study, *in vitro* assay of antivenom potency against the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) was investigated. The *in vitro* assay is based on the neutralization activity of the antivenom against the coagulant activity of the venom. The antivenom potency was determined by the *in vitro* assay in terms of the ratio at which it would delay coagulation three times longer than two minimum coagulant doses (each defined as the dose of venom necessary to coagulate the plasma). Eleven batches of antivenom were assayed for their neutralizing activity (ED_{50}) by the *in vivo* assay using mice as well as by the *in vitro* assay. The correlation coefficient (r) between the *in vitro* neutralizing activities and *in vivo* neutralizing activities (ED_{50}) was 0.957, (p value < 0.001).

From this study, it could be concluded that this *in vitro* assay of *C. rhodostoma* antivenom should be a good alternative method for assessment of the antivenom potency. The method is simple, rapid and gives results that correlate highly with those of the *in vivo* assay.

KEY WORDS : *IN VITRO* ASSAY/ANTIVENOM POTENCY

75 P. ISBN 974-04-4076-2