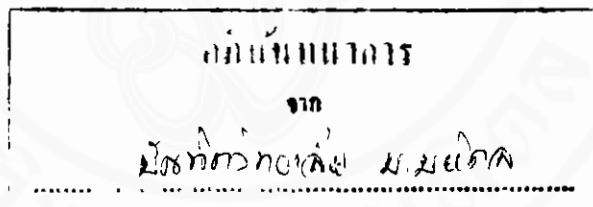


**PRODUCTION OF POTENT POLYVALENT ANTIVENOM
AGAINST *NAJA KAOUTHIA*, *OPHIOPHAGUS HANNAH* AND
*BUNGARUS FASCIATUS***

CHAROONROJ CHOTWIWATTHANAKUN



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

2000

ISBN 974-664-137-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

4036433 SCMI/M : MAJOR: MICROBIOLOGY; M.Sc.(MICROBIOLOGY)

KEY WORDS : ANTIVENOM/ POLYVALENT/ SNAKE VENOM

CHAROONROJ CHOTWIWATTHANAKUN: PRODUCTION OF POTENT POLYVALENT ANTIVENOM AGAINST *NAJA KAOUTHIA*, *OPHIOPHAGUS HANNAH* AND *BUNGARUS FASCIATUS*. THESIS ADVISORS: KAVI RATANABANANGKON Ph.D., PRASIT PALITTAPONGARNPIM M.D., PORNCHAI MATANGKASOMBUT, Ph.D., M.D., 116 p. ISBN 974-664-137-9.

Three medically important elapid snakes in Thailand are the Thai cobra (*Naja kaouthia*, NK), the King cobra (*Ophiophagus hannah*, OH) and the banded krait (*Bungarus fasciatus*, BF). These snakes produce chemically and pharmacologically homologous postsynaptic neurotoxins that bind strongly with nicotinic acetylcholine receptors at the muscle end plate. Therefore they produce similar clinical features of envenomation i.e., muscle weakness and death by respiratory failure. Thus, in the absence of the culprit snake it is almost impossible to make species diagnosis based on the victim's sign and symptoms. This is important since only monovalent specific antivenoms are available. Polyvalent antivenoms against these snakes, if available, would be very useful in saving lives under these circumstances.

Two groups of horses were immunized, one group of 5 horses (Group 1) with a mixture of postsynaptic neurotoxins while another group of 4 horses (Group 2) with a mixture of crude venoms of the 3 elapids. The immunogens were emulsified in Complete Freund's adjuvant and injected by the low dose, low volume multi-site immunization protocol established in this laboratory (Vaccine 1997; 15 (14): 1523-1528). The second and third immunizations were made with the immunogens in Incomplete Freund's adjuvant and in aluminum phosphate, respectively. Blood was drawn to assay the antibody titer by ELISA. Sera at the peak of ELISA titers were pooled and assayed for the median effective dose (ED_{50}). The ED_{50} 's of antivenom from Group 1 horses against *N. kaouthia*, *O. hannah* and *B. fasciatus* venoms were 0.72, 0.24 and 0.41 ml serum/mg venom, respectively. The corresponding ED_{50} 's from Group 2 horse sera were 0.82, 0.22 and 0.33 ml serum/mg venom, respectively. The potencies of sera from both groups against BF venom were significantly higher than that of monovalent antivenom produced under the same protocols while the potencies against NK and OH venoms were comparable to that of the corresponding monovalent antivenoms. This potent, truly polyvalent antivenom should be useful in saving lives of victims envenomed by unidentified elapids.

4036433 SCMI/M สาขาวิชา จุลชีววิทยา , วทม (จุลชีววิทยา)

จรูญโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล การผลิตเซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิด (polyvalent antivenom) ที่มีประสิทธิภาพสูง ต่อพิษงูเห่า, พิษงูจงอาง และพิษงูสามเหลี่ยม (PRODUCTION OF POTENT POLYVALENT ANTIVENOM AGAINST *NAJA KAOUTHIA*, *OPHIOPHAGUS HANNAH* AND *BUNGARUS FASCIATUS*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ กวี รัตนบรรณางกูร Ph.D, ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ M.D., พรชัย มาตังคสมบัติ Ph.D., M.D. 116 หน้า ISBN 974-664-137-9

งูพิษในวงศ์ Elapidae ที่มีความสำคัญทางแพทย์ของไทย คือ งูเห่า, งูจงอาง และงูสามเหลี่ยม งูทั้ง 3 ชนิดสร้างพิษประสาท (postsynaptic neurotoxins) ที่มีฤทธิ์เหมือนกัน คนที่ถูกงูชนิดใดชนิดหนึ่งใน สามชนิดนี้กัด จะแสดงอาการคล้ายคลึงกันคือ กล้ามเนื้อเป็นอัมพาต และตายโดยการหยุดหายใจ ฉะนั้นจึงไม่สามารถบอกชนิดของงูพิษจากอาการของผู้ถูกกัด การรู้ชนิดของงูที่กัดนี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการรักษา เพราะเซรุ่มแก้พิษที่ผลิตในปัจจุบันมีความจำเพาะต่อแต่ละชนิด (monovalent antivenoms) ดังนั้นหากมีการผลิตเซรุ่มที่สามารถต่อต้านพิษงูได้ทั้ง 3 ชนิด (polyvalent antivenoms) การทราบชนิดงูก็ไม่มี ความจำเป็น ทำให้การรักษาผู้ป่วยถูกต้องและได้ผลเสมอ

จากการกระตุ้นม้า 2 กลุ่มด้วยอิมมูโนเจน 2 ชนิด โดยม้ากลุ่ม 1 จำนวน 5 ม้า ถูกฉีดด้วยสารผสมของ สารพิษประสาทของ งูเห่าไทย, งูจงอาง และ งูสามเหลี่ยม ม้ากลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ม้า ถูกฉีดด้วยสารผสมของพิษ (Crude venom) ของงูทั้งสามชนิด อิมมูโนเจนที่ใช้ฉีดครั้งแรกผสมกับ Complete Freund's adjuvant โดยใช้ วิธีฉีดพิษปริมาณต่ำ ปริมาตรต่ำ ในจำนวน 10 จุด (low dose, low volume, multi-site immunization) ซึ่ง พัฒนาขึ้นโดยห้องวิจัยนี้ (Vaccine 1997; 15(14): 1523-1528) การฉีดกระตุ้นครั้งต่อไปกระทำโดยใช้พิษงู ทั้ง 3 ชนิดผสมกับ Incomplete Freund's adjuvant และอลูมินัม ฟอสเฟต, ตามลำดับ ทำการเจาะเลือดเพื่อแยก ซีรัมและวัดระดับภูมิคุ้มกันในซีรัมโดยวิธี ELISA นำซีรัมม้าในสัปดาห์ที่ให้ค่า ELISA titers เฉลี่ยสูงสุดมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านพิษงูแต่ละชนิด โดยหาค่า Median effective dose (ED_{50}) ต่อพิษงูแต่ละชนิด พบว่าม้ากลุ่มที่ 1 ใช้ปริมาณซีรัม 0.72, 0.24 หรือ 0.41 มล. ในการแก้พิษงู 1 มก ของงูเห่า, งูจงอาง หรือ งูสามเหลี่ยม ตามลำดับ ส่วนค่า ED_{50} ของเซรุ่มจากม้ากลุ่มที่ 2 เป็น 0.82, 0.22 และ 0.33 มล ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซรุ่มทั้งสองกลุ่มนี้ต่อเซรุ่มที่แก้พิษงูได้เพียงชนิดเดียว (monovalent antivenom) ที่ผลิตโดยใช้วิธีคล้ายคลึงกันต่อแต่ละชนิดพบว่า เซรุ่มต่อต้านพิษงูหลายชนิด (polyvalent antivenom) มีประสิทธิภาพสูงกว่าในการต่อต้านพิษงูสามเหลี่ยม ส่วนประสิทธิภาพในการต่อต้านพิษงูอีกสอง ชนิดนั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมาก ในการบำบัดผู้ป่วยที่ได้รับพิษงูที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทที่ไม่ทราบชนิดของงูที่กัด