

การจัดเตรียมพิษงูเห่ามาตรฐานในระดับประเทศ

ไพศาล พังจันทน์* อัครชัย อาเมน* จิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์* ชลยุทธ นามบุตร**

และกนกวรรณ เทียมมาลา***

* กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

** สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

*** องค์การเภสัชกรรม ถนนพระราม 6 ราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

บทคัดย่อ ประเทศไทยมีผู้ผลิตผลิตภัณฑ์เซรุ่มแก้พิษงูจำนวนสองราย คือ องค์การเภสัชกรรม และสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งต่างก็ใช้พิษงูมาตรฐานที่ผลิตขึ้นเองในการควบคุมคุณภาพ เนื่องจากยังไม่มีพิษงูมาตรฐานที่จะใช้ในระดับประเทศ ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลค่าความแรงระหว่างกันได้ สถาบันชีววัตถุในฐานะหน่วยงานที่ทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ชีววัตถุที่ผลิตและจำหน่ายในประเทศ จึงได้ประสานความร่วมมือกับผู้ผลิตทั้งสองรายในการจัดทำพิษงูเห่ามาตรฐานในระดับประเทศ ผลที่ได้พบว่าพิษงูเห่าที่จะนำมาใช้นั้นเป็นสารมาตรฐานนั้นมีค่า LD_{50} เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 10.57-15.67 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 70.8 เมื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วยวิธี Immunodiffusion พบว่าทำปฏิกิริยาเฉพาะ กับเซรุ่มแก้พิษงูเห่า การแยกส่วนประกอบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าไม่มีความแตกต่างจากพิษงูเห่ารุ่นการผลิต ก่อนหน้าที่สถาบันชีววัตถุใช้ในการควบคุมคุณภาพ พิษงูเห่ารุ่นการผลิตที่ CV 0142-S ที่จัดเตรียมขึ้นนี้ได้รับการประกาศ ให้เป็นสารมาตรฐานในระดับประเทศ ผลจากความร่วมมือในครั้งนี้จะช่วยให้การควบคุมคุณภาพเซรุ่มแก้พิษงูของประเทศไทย ได้รับความน่าเชื่อถือในระดับสากล

บทนำ

ประเทศไทยมีที่ตั้งอยู่ในภูมิศาสตร์ประเภทเขตร้อน ดังนั้น จึงมีงูอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก งูหลายชนิดมีพิษที่รุนแรงทำให้เสียชีวิตได้ โดยพบอัตราการถูกงูพิษกัด 12-14 คนต่อประชากรแสนคน และมีอัตราการเสียชีวิต 0.02⁽¹⁾ การให้เซรุ่มแก้พิษงูยังคงเป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยที่ตรงวัตถุประสงค์มากที่สุด เซรุ่มแก้พิษงูผลิตจากการฉีดพิษงูจำนวนน้อยแก่ม้าเพื่อกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกัน จากนั้นจึงเจาะเก็บพลาสมาแล้วนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ได้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

ประเทศไทยมีผู้ผลิตเซรุ่มแก้พิษงูจำนวนสองรายคือ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย และองค์การเภสัชกรรม โดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ผลิตเซรุ่มแก้พิษงูชนิดผงแห้งจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ เซรุ่มแก้พิษงูเห่า เซรุ่มแก้พิษงูแมวเซา เซรุ่มแก้พิษงูกะปะ เซรุ่มแก้พิษงูจงอาง เซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ เซรุ่มแก้พิษงูสามเหลี่ยม เซรุ่มแก้พิษงูทับสมิงคลา เซรุ่มแก้พิษงูระบบประสาท และเซรุ่มแก้พิษงูระบบโลหิต ส่วนองค์การเภสัชกรรมผลิตเซรุ่มแก้พิษงูชนิดน้ำจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซรุ่มแก้พิษงูเห่า เซรุ่มแก้พิษงูแมวเซา และเซรุ่มแก้พิษงูกะปะ โดยผู้ผลิตทั้งสองรายต่างใช้พิษงูมาตรฐานที่เตรียมขึ้นเองในการวิเคราะห์หาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลการวิเคราะห์ความแรงของผลิตภัณฑ์เซรุ่มแก้พิษงูชนิดเดียวกันไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ นอกจากนี้พิษในแต่ละประเทศนั้นมีชนิดและสายพันธุ์ที่แตกต่างกันตามการกระจายตัวเขตภูมิศาสตร์ จึงไม่สามารถที่จะจัดหาพิษงูมาตรฐานในระดับสากลเพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงระหว่างหน่วยงานได้ องค์การอนามัยโลก จึงมีข้อเสนอแนะให้แต่ละประเทศหรือแต่ละภูมิภาคจัดเตรียมพิษงูมาตรฐานเพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพเซรุ่มแก้พิษงูในประเทศหรือระดับภูมิภาค⁽²⁾

ในการเตรียมพิษงูมาตรฐานจะต้องทดสอบหาค่า Lethal Dose 50 (LD₅₀) ของพิษงู⁽³⁾ โดยใช้สัตว์ทดลองชนิดหนูถีบจักร (mice) ซึ่งเป็นการทดสอบหาประสิทธิภาพของพิษงูโดยตรง แสดงในหน่วยน้ำหนักของพิษงูที่ทำให้สัตว์ทดลองที่นำมาทดสอบตายครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด ซึ่งทุกหน่วยงานจะทำการทดสอบทุกครั้ง เมื่อมีการนำพิษงูรุ่นการผลิตใหม่มาใช้ทดแทนของเดิมที่หมดลง หรือทำการทดสอบค่าเป็นระยะเมื่อเวลาผ่านไปตามระยะเวลาที่กำหนด ซึ่งเกณฑ์การยอมรับนั้นแต่ละหน่วยงานกำหนดขึ้นเอง เพื่อใช้สำหรับการเฝ้าระวัง (monitoring) ว่าพิษงูที่เก็บรักษาไว้นั้นยังไม่เสื่อมประสิทธิภาพลง

ดังนั้น เพื่อให้ประเทศไทยมีพิษงูมาตรฐานของประเทศ สถาบันชีววัตถุในฐานะห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมคุณภาพชีววัตถุที่ผลิตและนำเข้ามาใช้ในประเทศไทย จึงได้จัดทำโครงการกำหนดค่าพิษงูเห่ามาตรฐานในระดับประเทศ โดยความร่วมมือจากผู้ผลิตทั้งสองแห่งสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ทำหน้าที่รวบรวมพิษงูเห่าชนิดผงแห้งเพื่อจัดทำเป็นสารมาตรฐาน และร่วมทดสอบหาค่า LD₅₀ ร่วมกับสถาบันชีววัตถุและองค์การเภสัชกรรม เพื่อเปรียบเทียบค่าระหว่างหน่วยงาน และมีการตกลงร่วมกันเพื่อจะประกาศใช้พิษงูเห่ารุ่นการผลิตดังกล่าวในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่ผลิตขึ้นภายในประเทศร่วมกันต่อไป

วัสดุและวิธีการ

พิษงูเห่า

พิษงูเห่าตัวอย่าง รุ่นการผลิต CV 0142-S ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย จัดเตรียมขึ้นสำหรับใช้เป็นสารมาตรฐานในระดับประเทศ

พิษงูเห่ามาตรฐาน รุ่นการผลิต TC 01 ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นพิษงูเห่าที่สถาบันชีววัตถุใช้ในการควบคุมคุณภาพเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่สถานเสาวภา สภากาชาดไทยผลิตขึ้น

พิษงูเห่ามาตรฐาน รุ่นการผลิต GC 01 ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม เป็นพิษงูเห่าที่สถาบันชีววัตถุใช้ในการควบคุมคุณภาพเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่องค์การเภสัชกรรมผลิตขึ้น

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR ขนาด 18-20 กรัม สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และกองมาตรฐานชีววัตถุ องค์การเภสัชกรรม ได้รับจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ได้รับจากสถานีเพาะพันธุ์ม้าและสัตว์ทดลอง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

การทดสอบค่า LD₅₀

ซึ่งนำหนักพิษงูเห่าตัวอย่าง 5-10 มิลลิกรัม ละลายด้วย normal saline ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อให้มีความเข้มข้น 0.08, 0.012, 0.016, 0.20 และ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายแต่ละหลอดไปฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่หางของหนูถีบจักรตัวละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 ตัวต่อกลุ่ม นับจำนวนหนูที่มีชีวิตรอดในเวลา 2 วัน คำนวณค่า LD₅₀ จากจำนวนหนูที่รอดชีวิตโดยใช้โปรแกรม Probit Analysis (F.R. Marsman, RIVM, Bilthoven, The Netherlands, version 97-1)⁽⁴⁾ ทำซ้ำไม่น้อยกว่า 6 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

การทดสอบปริมาณโปรตีน

ดำเนินการตามวิธีของ Bradford⁽⁵⁾ เตรียมโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (Quick Start TM Bradford, BIO-RAD) ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อให้มีความเข้มข้น 5, 2.5 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 1 หลอดตามลำดับ ซึ่งนำหนักพิษงูเห่าตัวอย่าง 5-10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นและสารละลายพิษงูเห่าตัวอย่างที่เตรียมไว้มาเติมลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ปริมาตรหลอดละ 800 ไมโครลิตร เติม dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารละลายพิษงูเห่าตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับค่าที่สร้างจากกราฟของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

การทดสอบเอกลักษณ์

ดำเนินการโดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)⁽⁶⁾ เตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 12% โดยใช้ Vertical electrophoresis system, VE (BIO-RAD) ซึ่งนำหนักพิษงูเห่าตัวอย่าง และพิษงูเห่ามาตรฐาน 5-10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วย sample buffer solution ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปหยอดลงในเจลหลุมละ 10 ไมโครลิตร หยอดโปรตีนมาตรฐาน molecular weight marker (Amersham) เพื่อใช้เป็นแถบนำหนักมาตรฐานปริมาตร 5 ไมโครลิตรที่หลุมด้านข้าง แยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 160 โวลต์ นาน 90 นาที ด้วย EPS 601 Power supply ย้อมสีเจลด้วย colloidal coomassie blue G-250 และล้างสีด้วยน้ำกลั่น อ่านแถบโปรตีนที่ปรากฏด้วย gel documentation system (SYNGENE)

การทดสอบเอกลักษณ์

ดำเนินการโดยวิธี Immunodiffusion⁽⁶⁾ เตรียมสารละลาย agarose ความเข้มข้น 1% ที่อุณหภูมิร้อนละลายเป็นเนื้อเดียวกันลงบนแผ่น GelBond® ที่ตัดพอดีกับกระจกสไลด์ ทิ้งไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลาข้ามคืน เจาะบริเวณตรงกลาง 1 หลุม และบริเวณรอบๆ อีก 6 หลุม ซึ่งนำหนักพิษงูเห่าตัวอย่าง 5-10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงในหลุมกลางปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่วนหลุมโดยรอบเติม

เซรุ่มแก้พิษงูเห่า เซรุ่มแก้พิษงูกะปะ เซรุ่มแก้พิษงูแมวเซา เซรุ่มแก้พิษงูจงอาง เซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ และเซรุ่มแก้พิษงูสามเหลี่ยม ปริมาตรหลุมละ 20 ไมโครลิตร วางแผ่นกระจกในแนวราบให้เกิดการทำปฏิกิริยากัน ปล่อยให้แห้งเป็นเวลาข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเกิดปฏิกิริยาจากเส้นตะกอนที่เกิดขึ้น

ผล

การทดสอบหาค่า LD_{50} ของพิษงูเห่าตัวอย่าง โดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีค่าเท่ากับ 15.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม กองมาตรฐานชีววัตถุ องค์การเภสัชกรรมมีค่าเท่ากับ 10.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และสถานเสาวภา สภากาชาดไทยมีค่าเท่ากับ 12.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ค่าเฉลี่ยทั้งสามหน่วยงานเท่ากับ 12.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งผลการทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย ANOVA ที่ $p < 0.05$ (ตารางที่ 1)

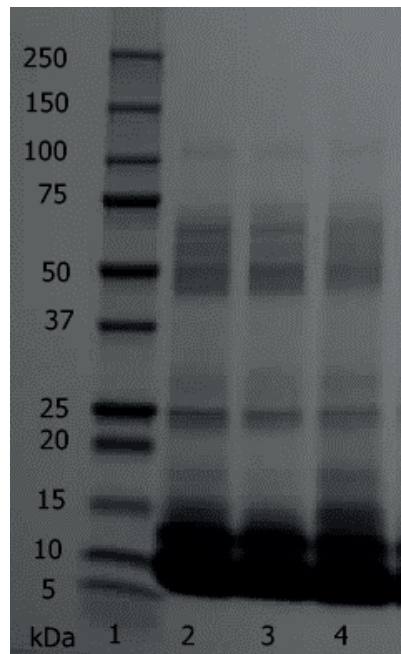
ตารางที่ 1 ค่า LD_{50} ที่สอบเทียบได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ

หน่วยงาน	N	95% CI (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)	LD50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	6	15.66–15.69	15.67
กองมาตรฐานชีววัตถุ องค์การเภสัชกรรม	7	10.54–10.59	10.57
สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	6	12.44–12.50	12.47
ค่าเฉลี่ย			12.90

* Sig. (ANNOVA) $p < 0.05$

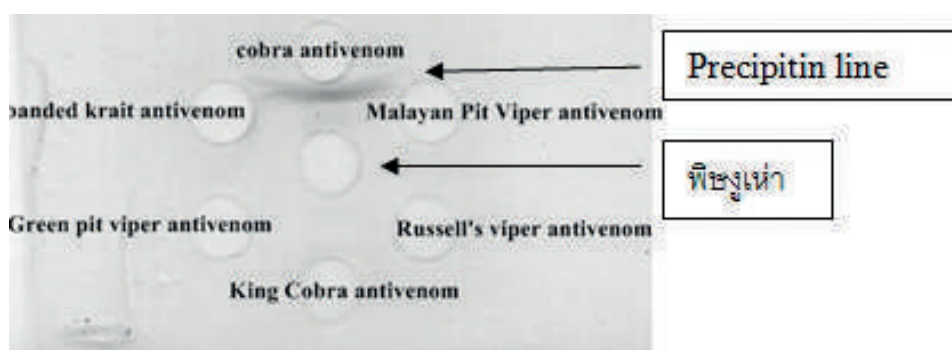
การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford นั้น โปรตีนจะทำปฏิกิริยากับ Coomassie Brilliant Blue G-250 เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับสารละลาย โปรตีนมาตรฐาน ปริมาณโปรตีนของพิษงูเห่ามีค่าเท่ากับ 708.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งได้จากการเตรียมสารละลายพิษงูเห่าเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม ดังนั้น พิษงูเห่าที่ใช้จัดเตรียมเป็นสารมาตรฐานจึงมีปริมาณโปรตีนคิดเป็นร้อยละ 70.8 ของน้ำหนัก

การทดสอบเอกลักษณ์ เมื่อนำสารละลายพิษงูเห่าตัวอย่างไปแยกส่วนประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักมากก็จะเคลื่อนตัวได้ช้า ในขณะที่โปรตีนขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า พบว่าส่วนประกอบโปรตีนของพิษงูเห่าที่จัดเตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานมีแถบองค์ประกอบของโปรตีนไม่แตกต่างจากพิษงูเห่ามาตรฐานที่สถาบันชีววัตถุใช้ในการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ของสถานเสาวภา และองค์การเภสัชกรรมในปัจจุบัน โดยมีขนาดโมเลกุลแบ่งออกได้เป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มแรกมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 14 kDa (a) กลุ่มที่สองมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28 kDa (b) และกลุ่มสุดท้ายมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 50 kDa ขึ้นไป (c) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แอโปรตีนของพิษงูเห่าตัวอย่าง (หมายเลข 2) พิษงูเห่ามาตรฐานจากองค์การเภสัชกรรม (หมายเลข 3) และพิษงูเห่ามาตรฐานจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย (หมายเลข 4) เปรียบเทียบกับแอโปรตีนน้ำหนักมาตรฐาน (หมายเลข 1)

ส่วนการทดสอบเอกลักษณ์โดยวิธี Immunodiffusion เมื่อนำพิษงูเห่าตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาระหว่างเซรุ่มแก่พิษงูชนิดต่าง ๆ คือ เซรุ่มแก่พิษงูเห่า เซรุ่มแก่พิษงูแมวเซา เซรุ่มแก่พิษงูกะปะ เซรุ่มแก่พิษงูจงอาง เซรุ่มแก่พิษงูเขียวหางไหม้ และเซรุ่มแก่พิษงูสามเหลี่ยม ในหลุมที่อยู่โดยรอบ พบว่าการทำปฏิกิริยาเกิดเป็นเส้นตะกอนสีขาวระหว่างพิษงูเห่ากับเซรุ่มแก่พิษงูเห่าเพียงเส้นเดียว โดยไม่พบการทำปฏิกิริยากับเซรุ่มแก่พิษงูชนิดอื่น ๆ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะของพิษงูเห่ามาตรฐาน CV 0142-S

วิจารณ์

การทดสอบค่า $LD_{50}^{(3)}$, การทดสอบปริมาณโปรตีน⁽⁵⁾, และการทดสอบเอกลักษณ์⁽⁶⁾ ทั้งหมดได้รับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แล้ว การทดสอบที่สำคัญคือ การยืนยันเอกลักษณ์ว่าพิษงูที่สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ส่งมอบมาเพื่อนำมาจัดทำเป็นพิษงูเห่ามาตรฐานในครั้งนี้ว่าเป็นชนิดที่ถูกต้อง โดยพิจารณาจากการเกิดปฏิกิริยา immunodiffusion ที่มีความจำเพาะกับเซรุ่มแก่พิษงูเห่าเท่านั้น และจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าแอโปรตีนที่แยกได้ไม่มีความแตกต่างจากพิษงูเห่าของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย และพิษงูเห่า

ขององค์การเภสัชกรรมที่สถาบันชีววัตถุใช้ในการควบคุมคุณภาพก่อนหน้า ส่วนปริมาณโปรตีนจะถูกใช้เป็นข้อมูลพิจารณาในเรื่องความสม่ำเสมอ (consistency) ของพิษงูเห่ามาตรฐานที่จะจัดทำในครั้งถัดไป

เมื่อนำค่า LD_{50} ของพิษงูเห่าทั้งสามห้องปฏิบัติการไปหาค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เนื่องจากการทดสอบในสัตว์ทดลองจึงมีความผันแปรสูง แม้ว่าจะมีการควบคุมชนิด สายพันธุ์และช่วงน้ำหนักของหนูไมซ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบแล้ว อย่างไรก็ตามความแตกต่างของค่า LD_{50} นี้ไม่มีผลต่อการนำไปใช้ในการทดสอบหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์แต่อย่างใด เนื่องจากปัจจุบันการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่ารายงานผลเป็นน้ำหนักของพิษงูเห่าที่เซรุ่มแก้พิษงูเห่าสามารถทำลาย (neutralize) ได้ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยมีข้อกำหนดว่าต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร ที่ผ่านมาผลการทดสอบที่ได้จากผู้ผลิตแต่ละรายอาจมีความแตกต่างกัน เนื่องจากใช้พิษงูเห่ามาตรฐานที่จัดทำขึ้นเองภายในเพื่อการทดสอบ ซึ่งข้อมูลเรื่องความแตกต่างของค่า LD_{50} ที่ได้จากโครงการนี้จะเป็ข้อมูลสำคัญในการพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพด้านความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในอนาคต โดยอาจเป็นการจัดทำเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐานที่สามารถลดความแตกต่างระหว่างห้องปฏิบัติการลงได้⁽⁷⁾ แต่ต้องอาศัยงบประมาณที่มากกว่าในการจัดเตรียมผลิตภัณฑ์

ผลจากการดำเนินของโครงการ ทั้งสถานเสาวภา สภากาชาดไทย องค์การเภสัชกรรม และสถาบันชีววัตถุ ได้ยอมรับพิษงูเห่ารุ่นการผลิต CV 0142-S ให้เป็นสารมาตรฐานในระดับประเทศ ทำให้เซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่จะผลิตเพื่อจำหน่ายต่อไปในอนาคต สามารถลดปัจจัยความผันแปรของผลทดสอบที่อาจเกิดจากความแตกต่างของการใช้พิษงูเห่ามาตรฐานจากผู้ผลิตทั้งสองรายลงไปได้ และเป็นจุดเริ่มต้นของความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน ในการทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการ (proficiency test) ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังให้ประสบการณ์และข้อมูลสำคัญต่อการจัดทำสารมาตรฐานพิษงูชนิดอื่นๆ และการพัฒนาวิธีการทดสอบต่อไป

สรุป

จากการศึกษาพิษงูเห่าที่จัดเตรียมขึ้นทั้งหมด 3 รุ่นการผลิต พบว่าพิษงูเห่ารุ่นการผลิตที่ CV 0142-S ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีคุณสมบัติที่เหมาะสม และได้ตกลงร่วมกันระหว่างสถาบันชีววัตถุ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย และองค์การเภสัชกรรมประกาศให้เป็นสารมาตรฐาน ในระดับประเทศสำหรับใช้ในการตรวจสอบค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทย กองมาตรฐานชีววัตถุ องค์การเภสัชกรรม สำหรับความร่วมมือในการทดสอบค่า LD_{50} และขอขอบคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทยที่สนับสนุนพิษงูเห่าที่ใช้ในการจัดทำสารมาตรฐานในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ศุภฤกษ์ ไชยหนูวิวัฒน์. งูพิษกัด (Snake bite). สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 20 ก.พ. 2556]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://www.boe.moph.go.th/Annual/aesr2553/AESR53_Part1/B_Part1_53/4953_SnakeBite.pdf
2. World Health Organization. WHO guideline for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Geneva, Switzerland: WHO; 2010. p. 8.
3. Thai pharmacopoeia Vol. 1 Part 1. Cobra Antivenin. Bangkok: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 1987. p. 1606.

4. Calculations and statistical analysis of results. In: Manual of laboratory methods. Geneva: World Health Organization; 1997. p. 183-190.
 5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
 6. European Pharmacopoeia Volume 2. 7th ed. Strasbourg, France: European Department for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM), Council of Europe; 2010. p. 953-954, 201-202, 148, 46-51.
 7. Fukuda T, Iwaki M, Hong SH, Oh HJ, Wei Z, Morokuma K, et al. Standardization of regional reference for mamushi (*Gloydus blomhoffii*) antivenom in Japan, Korea, and China. Jpn J Infect Dis 2006; 59: 20-4.
-

Preparation of National Standard for Cobra Venom

Paisan Pangjunan* Assajan Amen* Titaporn Phutipinyowat*
Chanlayuth Nambhut** and Kanokwan Tiammala***

* *Division of Medical Sciences, Tiwanond Road Nonthaburi 11000*

** *Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross, Rama IV Road, Pathumwan, Bangkok 10330*

*** *Government Pharmaceutical Organization, Rama 6 Road, Rachathewi, Bangkok 10400, Thailand*

ABSTRACT The Thai Red Cross Society (TRCs) and the Government Pharmaceutical Organization (GPO) are snake antivenom manufacturers in Thailand. Both of them have used their own snake venoms for quality control of their products because there was no national standard venoms. Therefore, their potency results have been incomparable the Institute of Biological Products (IBP), which acting as the national control laboratory for the biologics in Thailand, has cooperated with these two manufacturers in preparation of a national cobra venom standard. The results showed that the average LD₅₀ values of cobra venom were between 10.57–15.67 micrograms per milliliter and protein content was 70.8 percent. Identity test by immunodiffusion showed the venom was specific to the cobra antivenom. From the protein profile by SDS-PAGE method, the venom did not differ from previous lot used for potency test in IBP's laboratory. Cobra venom lot number CV 0142-S used in this study was declared as the national reference material. The outcome of this cooperation is the quality control of snake antivenom in Thailand being internationally recognized.

Key word: Cobra venom, Malayan pit viper venom, Russell's viper venom, Standardization, Thailand