ว กรมวิทย พ 2566; 65 (1): 23-33

การพัฒนา Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay เพื่อวิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่า

ไพศาล พังจุนันท์ และ วิภาวี วงศ์ชนะ

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วิธีมาตรฐานสำหรับการหาค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในตำรายา กำหนดให้ใช้วิธีทดสอบในสัตว์ทดลองโดยวิธี mouse neutralizing test แต่ปัจจุบันเหตุผลทางจริยธรรมด้านการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ได้มีแนวทางลดการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3Rs คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าโดยวิธี indirect ELISA เพื่อทดแทนวิธีการใช้สัตว์ทดลอง ผลการวิจัยพบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะกับเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามีความแม่นโดยมีค่า %Recovery เท่ากับ 93.54 วิธีมีความเป็นเส้นตรงเมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับค่าความเจือจางตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า 1/7,500 ถึง 1/120,000 เท่า โดยมีค่า $R^2 \geq 0.99$ ซึ่งทำให้ช่วงความแรงของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับการทดสอบด้วยวิธีนี้ คือ 0.2-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีมีความเที่ยงจากการทดสอบในวันเดียวกันและต่างวันโดยมีค่า %CV เท่ากับ 7.65 และ 5.13 ตามลำดับ การศึกษาความทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ ชนิดของเพลท และระยะเวลาการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีทั้งหมด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าโดยวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้อง สามารถนำมาใช้ในการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในห้องปฏิบัติการ และนำมาใช้ต่อยอดในการศึกษาความสัมพันธ์ค่าความแรงจากวิธี direct ELISA กับค่าความแรงจากวิธีมาตรฐานต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ค่าความแรง, เซรุ่มแก้พิษงูเห่า, Indirect ELISA

Corresponding author E-mail: paisan.p@dmsc.mail.go.th

Received: 24 November 2022 *Revised: 16 March 2023* *Accepted: 21 March 2023*

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิศาสตร์เขตร้อนจึงมีงูอาศัยอยู่ชุกชุม หลายชนิดเป็นงูที่มีพิษร้ายแรงที่ทำให้เสียชีวิตได้ ปัจจุบันวิธีในการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูกัดทำโดยการให้เซรุ่มแก้พิษงูที่ตรงกับชนิดของงู และเซรุ่มแก้พิษงูต้องมีประสิทธิภาพตามที่ระบุไว้ในฉลากจึงจะเชื่อมั่นได้ว่าสามารถใช้รักษาผู้ป่วยได้ เซรุ่มแก้พิษงูเป็นยาชีววัตถุที่ใช้ในการรักษาแบบ passive immunity ผลิตโดยการนำพิษงูไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ขนาดใหญ่ เช่น ม้า เป็นต้น เพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันชนิดอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ที่จำเพาะต่อพิษงูชนิดนั้น ๆ จากนั้นเจาะเก็บเลือดเพื่อนำพลาสมาไปตกตะกอนด้วยเกลือให้ได้อิมมูโนโกลบูลินที่มีความบริสุทธิ์ นำไปกรองและปรับสูตรให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

เนื่องจากเซรุ่มแก้พิษงูนั้นจัดเป็นยาชีววัตถุ ซึ่งมีแนวทางการควบคุมคุณภาพตามองค์การอนามัยโลก[1] ประเทศไทยจึงมีกฎหมายกำหนดให้ผู้ผลิตต้องมีการรับรองรุ่นการผลิตก่อนจำหน่าย สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการกลางที่ได้รับมอบอำนาจดังกล่าวจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนดให้ผู้ผลิตต้องมีการนำส่งตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ พร้อมส่งเอกสารสรุปกระบวนการผลิตเพื่อพิจารณาร่วมกับผลการทดสอบและยืนยันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ว่าเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดตามที่ได้ยื่นขึ้นทะเบียนไว้ โดยหนึ่งในการทดสอบคุณภาพที่สำคัญ คือ การทดสอบความแรง (potency) ซึ่งวิธีทดสอบตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกและตำรายาสากลต่าง ๆ[1-3] กำหนดให้ใช้วิธีวิเคราะห์ในสัตว์ทดลอง โดยวิธี mouse neutralizing test (MNT) เป็นวิธีทดสอบมาตรฐาน

ปัจจุบันการจัดหาสัตว์ทดลองทำได้ยากและมีราคาแพง รวมถึงการผลิตสัตว์ทดลองต้องอยู่ภายใต้พระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์[4] นอกจากนี้การทดสอบในสัตว์ทดลองมีความแปรปรวนของผลการทดสอบ นักวิจัยได้พยายามคิดค้นวิธีการทดสอบแทนวิธีการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3Rs (reduction, replacement and refinement) โดยหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือ วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี วิธีนี้มีการพัฒนามานาน จนเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐานทางชีวเคมีและเป็นวิธีที่นักวิจัยหลายรายเลือกใช้ เพื่อเป็นวิธีทดแทนการทดสอบหาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูในสัตว์ทดลอง[5-7] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเซรุ่มแก้พิษงูมีความจำเพาะต่อชนิดของงูตามภูมิศาสตร์ ดังนั้นแต่ละประเทศจึงมีปัญหางูพิษที่แตกต่างกัน ผลการวิจัยในพื้นที่หนึ่งอาจไม่สามารถนำมาใช้ในอีกพื้นที่หนึ่งได้ คณะผู้วิจัยจึงเริ่มพัฒนาวิธี indirect ELISA เพื่อวิเคราะห์การหาค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่ผลิตในประเทศ และทดสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าวว่าสามารถนำมาใช้ทดสอบหาค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในห้องปฏิบัติการได้จริง และนำมาใช้ต่อยอดในการศึกษาเปรียบเทียบกับค่าความแรงที่ได้จากวิธี MNT ซึ่งเป็นวิธีมาตราฐานต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านผล ELISA แบบไมโครเพลทรุ่น ELx808 (BioTek, USA) เครื่องล้างไมโครเพลท (Biorad, USA) ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (BioTek, USA) ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (BioTek, USA) ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (BioTek, USA) 96-well plate cat. no. 3590 (Costar, USA) และ cat. no. 439454 (Thermo Scientific, USA)

การเตรียมสารละลาย

coating buffer ประกอบด้วย 50 mM carbonate buffer pH 9.6 สารละลาย 10xPBS ประกอบด้วย 0.15M phosphate buffer saline pH 7.2 สารละลาย PBST ประกอบด้วย 0.05% Tween 20 (sigma) ใน 1xPBS washing buffer ประกอบด้วย 0.05% Tween 20 ใน 0.9% sodium chlorine (normal saline) blocking buffer

ประกอบด้วย 2% BSA (sigma) ใน PBST diluting buffer ประกอบด้วย 0.5% BSA ใน PBST Alkaline phosphate substrate solution (Pierce™) PNPP-Phosphatase substrate kit (Thermo Fisher Scientific, USA) และ 2N NaOH

แอนติบอดี

goat anti-equine IgG (H+L)-alkaline phosphatase (Southern Biotech, USA)

สารมาตรฐาน

เซรุ่มแก้พิษงูเห่าชนิดผงแห้ง รุ่นการผลิต NK00217 (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย) และพิษงูเห่าชนิดผงแห้ง รุ่นการผลิต CV170211 (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย)

ตัวอย่าง

เซรุ่มแก้พิษงูเห่า รุ่นการผลิต NK00117 (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย) ตัวอย่างสำหรับทดสอบหัวข้อความจำเพาะ ได้แก่ เซรุ่มแก้พิษงูทับสมิงคลา รุ่นการผลิต BC00118 (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย) และเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ รุ่นการผลิต TA00118 (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย)

ตัวอย่างทุกรุ่นการผลิตมีคุณลักษณะเป็นไปตามข้อกำหนดของผลิตที่มีการขึ้นทะเบียนไว้และผ่านการรับรองรุ่นการผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ

การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง

เจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่า รุ่นการผลิต NK00217 (ระบุโดยผู้ผลิต: เมื่อละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะมีความแรงเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความแรงเริ่มต้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นเกณฑ์ขั้นต่ำที่ยอมรับสำหรับการตรวจผ่านในกระบวนการควบคุมคุณภาพ เพื่อใช้เป็นตัวแทนสารมาตรฐานสำหรับคำนวณค่าความแรงตัวอย่าง และเป็นความแรงเริ่มต้นสำหรับการทดสอบความเป็นเส้นตรง

เจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่า รุ่นการผลิต NK00217 ด้วยน้ำกลั่น 10.66 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความแรงเริ่มต้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลอง จำนวน 4 หลอด ๆ ละ 1, 0.75, 0.5 และ 0.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 4 ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเซรุ่มแก้พิษงูเห่าความแรง 0.6, 0.4 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับทดสอบความถูกต้องช่วงของวิธี

เจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่า รุ่นการผลิต NK00217 ให้ได้ความเข้มข้น 5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยนำเซรุ่มแก้พิษงูเห่า รุ่นการผลิต NK00217 จำนวน 2 ขวด (ระบุโดยผู้ผลิต: เมื่อละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะมีความแรงเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขวดแรกละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ได้ความแรง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขวดที่ 2 ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ได้ความแรง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการศึกษาความถูกต้องในความแม่นยำของวิธี

เจือจางตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูทับสมิงคลาและเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ได้ความแรง 0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการศึกษาความถูกต้องความจำเพาะของวิธี

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2) ใช้ในการอธิบายความแปรปรวนที่ตัวแปรอิสระ สามารถอธิบายตัวแปรตามใน linear regression model ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) และค่าสัมประสิทธิ์การแปรผัน (coefficient of variance: CV) ใช้ในการพิจารณาการหาความเที่ยงของการวิเคราะห์ค่าความแรง สถิติวิเคราะห์ t-test และ one-way ANOVA ถูกใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสภาวะ

การศึกษาความถูกต้องของวิธีการ[8]

ELISA เป็นการใช้หลักการความจำเพาะระหว่างแอนติบอดี (antibody) และแอนติเจน (antigen) โดยใช้เอนไซม์ (enzyme) เพื่อช่วยทำให้สังเกตเห็นสีที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ปรากฏในตัวอย่าง ซึ่งในกรณีนี้แอนติเจนเป็นพิษงูและแอนติบอดีเป็นเซรุ่มแก้พิษงู

ชั่งพิษงูเห่าชนิดผงแห้งให้มีน้ำหนัก 5-10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย coating buffer ให้มีปริมาณของพิษงูเห่า 0.5 ไมโครกรัมต่อหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำเพลทบ่มที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 300 ไมโครลิตรต่อหลุม 4 ครั้ง เติมเซรุ่มแก้พิษงูเห่าตัวอย่างและเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐานเจือจางโดยใช้ diluting buffer แบบ 2-fold dilution จำนวน 7 ค่าการเจือจาง จาก 1/3,750 ถึง 1/240,000 ลงในเพลท 50 ไมโครลิตร ทำซ้ำค่าการเจือจางละ 2 หลุม จากนั้นบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 300 ไมโครลิตร 4 ครั้ง เติม goat anti-horse alkaline phosphatase conjugate ที่เจือจางด้วย diluting buffer อัตราส่วน 1 ต่อ 2,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 300 ไมโครลิตร 4 ครั้ง เติม alkaline phosphate substrate solution ตามวิธีที่ระบุในฉลากลงในหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 2N NaOH เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านผล ELISA

การคำนวณค่าความแรง

นำค่า OD ที่วัดได้มาคำนวณหาค่าความแรงของตัวอย่างเปรียบเทียบกับเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน โดยใช้สถิติแบบ parallel line assay[8] ด้วยโปรแกรม Bioassay Assist (National Institute of Infectious Diseases) ทั้งนี้กำหนดให้ใช้ค่า OD อย่างน้อย 4 ค่าระดับการเจือจางที่มีความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาค่า F value ที่แสดงใน parallelism และ linearity ว่าข้อมูลทั้งหมดไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เป็นเกณฑ์ที่ยอมรับได้จากการคำนวณทางสถิติ โดยผลการทดสอบจะแสดงค่า invalid เมื่อมี parallelism หรือ linearity ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบความถูกต้องของวิธี[9]

ความเป็นเส้นตรง (linearity) และการหาช่วงของวิธี (range)

ทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยการเจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐานที่ความแรงเริ่มต้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 7 ระดับการเจือจาง ได้แก่ 1/3,750, 1/7,500, 1/15,000, 1/30,000, 1/60,000, 1/120,000 และ 1/240,000 สร้างกราฟระหว่างค่า OD และ log ค่าความเจือจาง โดยมีเกณฑ์ว่าต้องมีอย่างน้อย 4 ค่าความเจือจางที่มีความเป็นเส้นตรง (ค่า $R^2 \geq 0.95$)

การทดสอบช่วงของวิธี โดยการเจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน จำนวน 4 ความแรง ได้แก่ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละตัวอย่างหาค่าความแรงตามวิธีที่ระบุ คำนวณค่าความแรงโดยใช้โปรแกรม Bioassay Assist หัวข้อ parallel line assay พิจารณา linear relationship ระหว่างค่าความแรงที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับค่าความแรงที่วัดได้จริง โดยช่วงความแรงที่เหมาะสมของวิธีจะต้องมีค่า $R^2 \geq 0.95$

ความจำเพาะของวิธี (specificity)

หาค่าความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า เซรุ่มแก้พิษงูทับสมิงคลา และเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ เปรียบเทียบกับเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน ผลการทดสอบของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูชนิดอื่นต้องให้ผลลบ (non-reaction) หรือไม่สามารถหาค่าได้ (invalid)

ความแม่นของวิธี (accuracy)

เตรียมตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า ความแรง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด เติมเซรุ่มแก้พิษงูเห่า ความแรง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร แทนเซรุ่มแก้พิษงูเห่าความแรง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 นำตัวอย่างทั้งสองหลอดไปหาค่าความแรงเปรียบเทียบกับเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน แล้วคำนวณหาค่า %Recovery การเปรียบเทียบค่าความแรงที่เพิ่มขึ้นจากการเติมเซรุ่มแก้พิษงูเห่าเข้มข้นลงไปเทียบกับหลอดที่เติมน้ำกลั่น โดยมีเกณฑ์ยอมรับอยู่ระหว่าง 80–120% ของความแรงที่คาดไว้ จากสูตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ความแรงที่วัดได้} \times 100}{\text{ความแรงที่คาดไว้}}$$

ความเที่ยงของวิธี (precision)

หาค่าความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าจำนวน 1 รุ่นการผลิต จำนวน 6 ครั้ง ในวันเดียวกัน เพื่อหาค่า repeatability และหาค่าความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าจำนวน 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง แบบต่างวันกัน เพื่อหาค่า intermediate precision นำผลการทดสอบมาคำนวณเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (%CV) โดยมีเกณฑ์การยอมรับค่า %CV ต้องน้อยกว่า 10%

ความทนของวิธี (robustness)

การเปลี่ยนผู้วิเคราะห์

ทดสอบตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าขวดเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ๆ ละ 3 ครั้ง จากนั้นเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์

การเปลี่ยนยี่ห้อเพลท

ทดสอบตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าขวดเดียวกัน โดยใช้เพลทยี่ห้อ Costar และ Thermo Scientific ยี่ห้อละ 3 ครั้ง

การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการทำปฏิกิริยาระหว่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าและพิษงูเห่า

ทดสอบช่วงเวลาในการบ่มตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับพิษงูเห่าในหลุมที่ระยะเวลา 30 90 และ 120 นาที เปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับการบ่มที่ระยะเวลา 60 นาที

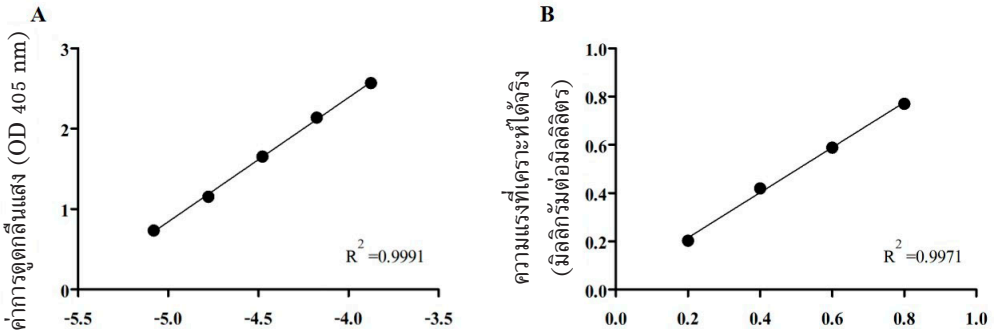
อุณหภูมิในขั้นตอนการเคลือบเพลท

ทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการเคลือบเพลท 3 สภาวะ ได้แก่ บ่มที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบค่าความแรงที่ได้กับที่สภาวะ 2–8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เกณฑ์กำหนดของการทดสอบความทนของวิธีทั้งหมด คือ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบโดยวิธี Independent t-test หรือ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

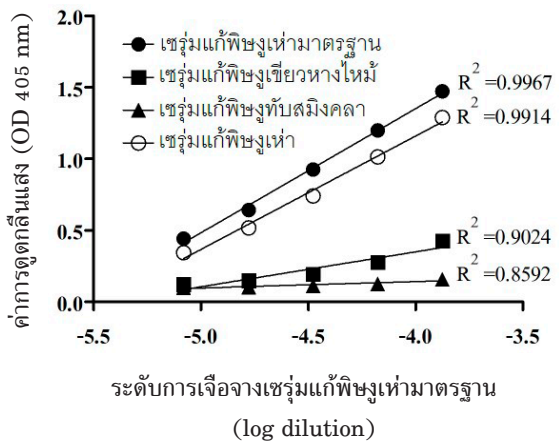
ผล

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงความแรงที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ พบว่าที่ระดับความแรงตั้งต้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการเจือจาง 5 ระดับ ตั้งแต่ 1/7,500, 1/15,000, 1/30,000, 1/60,000 และ 1/120,000 สามารถสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD กับค่า log ของระดับการเจือจางที่ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9991 ดังแสดงในภาพที่ 1A และพบว่าเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่มีค่าความแรงเริ่มต้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางเป็น 0.6, 0.4 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นช่วงที่สามารถนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ได้ จากการคำนวณความแรงได้เท่ากับ 0.77, 0.59, 0.42 และ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9971 ในกราฟ linear relationship ดังแสดงในภาพที่ 1B แต่ที่ความแรง 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการเจือจางที่เหมาะสมลดลงเหลือเพียงช่วง 4 ระดับ คือ 1/7,500 ถึง 1/60,000



ภาพที่ 1 ความเป็นเส้นตรงและช่วงความแรงของวิธีต่อเซรุ่มแก้พิษงูเห่า (A) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD 405 nm) กับระดับการเจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน (log dilution) 5 ระดับการเจือจาง โดยเริ่มจากเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่มีค่าความแรงเริ่มต้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ (B) linear relationship ของค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน ระหว่างค่าความแรงที่วัดได้จริงกับค่าความแรงที่ได้จากการคำนวณ โดยค่า R^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model

การทดสอบหาความจำเพาะของวิธี พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะต่อเซรุ่มแก้พิษงูเห่า แต่ไม่จำเพาะต่อเซรุ่มแก้พิษงูทับสมิงคลา และเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ แสดงจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD และ log dilution ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อวิเคราะห์ค่าความแรงโดยใช้ parallel line assay พบว่าตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าแสดงค่า F value ในหัวข้อ parallelism และ linearity ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถหาค่าความแรงได้ เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไม่สามารถคำนวณหาค่าความแรงในตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูทับสมิงคลาและเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้เนื่องจากให้ผล invalid ในการทดสอบทางสถิติ โดยใช้ parallel line assay



ภาพที่ 2 ความจำเพาะของวิธีต่อเซรุ่มแก้พิษงูเห่า เซรุ่มแก้พิษงูทับสมิงคลา และเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง (OD 405 nm) กับระดับการเจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน (log dilution) 5 ระดับการเจือจาง ของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับเซรุ่มพิษงูเห่ามาตรฐาน ค่า R^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model

การทดสอบความแม่นของวิธี พบว่าเมื่อหาค่าความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่ถูกเติมด้วยเซรุ่มแก้พิษงูเห่าเข้มข้น จำนวน 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปคำนวณค่าความแรงที่เพิ่มขึ้นโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เติมด้วยน้ำกลั่น ได้ค่า %Recovery อยู่ระหว่าง 80–120% ดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบความเที่ยงของวิธี พบว่าวิธีมีความเที่ยงเมื่อทำการทดสอบค่าความแรงในวันเดียวกัน และต่างวันกันมีค่า %CV เท่ากับ 7.65% และ 5.13% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

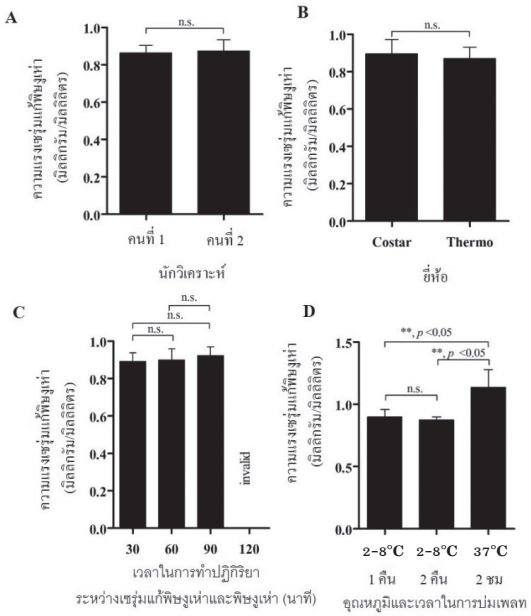
ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่นในการหาความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า

ครั้งที่	ความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		%Recovery
	ความแรงที่ต้องการ	ผลที่ได้จาก Spike	
1	0.06	0.59	98.21
2	0.60	0.58	96.32
3	0.60	0.52	86.09
	%Recovery		93.54

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงของวิธีในการหาค่าความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า

ความเที่ยงของวิธี	ความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)						ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	1	2	3	4	5	6			
Repeatability (6 ซ้ำใน 1 วัน)	0.89	0.81	0.76	0.77	0.75	0.72	0.78	0.06	7.65
Intermediate precision (3 วัน)	0.78	0.74	0.82	–	–	–	0.78	0.04	5.13

การทดสอบความทนของวิธี โดยการเปรียบเทียบผลระหว่างผู้วิเคราะห์สองคน และการทดสอบความทนของวิธีโดยการใช้เพลทต่างยี่ห้อกัน พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 3A และ 3B การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าและพิษงูเห่าที่ 30, 90 และ 120 นาที เปรียบเทียบกับเวลา 60 นาที พบว่าที่เวลา 30 และ 90 นาที ให้ผลไม่แตกต่างกันกับที่เวลา 60 นาที ซึ่งไม่สามารถคำนวณค่าความแรงได้จากการทดสอบที่ 120 นาที ดังแสดงในภาพที่ 3C การทดสอบความทนของวิธีต่อระยะเวลาในการบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความแรงที่ได้ระหว่าง 1 และ 2 คืนไม่แตกต่างกัน ยกเว้นที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่ได้สูงกว่าจากสภาวะอื่น ดังแสดงในภาพที่ 3D



ภาพที่ 3 ความทนของวิธีในการหาค่าความแรงในสภาวะที่แตกต่างกัน (A) นักวิเคราะห์ต่างคน (B) ชนิดของเพลท (C) ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่ากับพิษงูเห่าในเพลทที่ 30, 60 และ 90 นาที และ (D) การเปลี่ยนอุณหภูมิในการบ่มเพลทในขั้นตอนการเคลือบเพลทด้วยพิษงูเห่า (**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, n.s. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

วิจารณ์

การพัฒนาวิธี indirect ELISA เพื่อวิเคราะห์หาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่า พบว่า วิธีมีความจำเพาะต่อเซรุ่มแก้พิษงูเห่าและมีช่วงความเป็นเส้นตรง อย่างไรก็ตาม เมื่อกำหนดให้ความแรงตั้งต้น เท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบเพียง 4 ค่าความเจือจางที่ยังคงความเป็นเส้นตรง คือ 1/7,500, 1/15,000, 1/30,000, และ 1/60,000 ซึ่งยังเพียงพอต่อการนำมาคำนวณค่าทางสถิติ ทั้งนี้ อาจเกิดจากตัวอย่างถูกเจือจางจนปริมาณแอนติบอดีไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับแอนติเจนได้ จากข้อมูลผู้ผลิตที่ผ่านมาเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่ส่งตรวจวิเคราะห์มีความแรงระหว่าง 0.6 – 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ดังนั้นช่วงของวิธีจึงครอบคลุมการวิเคราะห์ค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้จากการทดสอบความทนของวิธีต่อปัจจัยด้านอุณหภูมิและเวลาในการบ่มมีผลต่อการวิเคราะห์ค่าความแรงเซรุ่มแก้พิษงูเห่า ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยความคงตัวและปฏิกิริยาจับกันของโปรตีนในสภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมกับวิธี

การพัฒนาวิธีการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) เริ่มตั้งแต่ ค.ศ. 1991 โดย Rungsiwongse J. และ Ratanabangkoon K.[10] ได้พัฒนาวิธี ELISA ในการประเมินค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าไทยที่ผลิตจากม้า กำหนดให้เซรุ่มแก้พิษงูเห่ารุ่นการผลิตหนึ่งเป็นค่าผลบวก (positive control) และศึกษาเปรียบเทียบการเคลือบเพลทด้วย crude venom, toxin fraction และ purified neurotoxin ที่ได้จากพิษงูเห่าไทย พบว่าการใช้ purified neurotoxin เคลือบเพลท ให้ค่า correlation coefficients (r) ที่ดีที่สุด คือ 0.95 ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามการเตรียม purified neurotoxin มีกระบวนการที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ในขณะที่ crude venom ที่เก็บจากงูสามารถนำมาเก็บในรูปผงแห้ง มีความเป็นพิษที่น้อยกว่า และมีความคงตัวสูง ทั้งนี้ผลจากการศึกษาความถูกต้องของวิธีซึ่งใช้ crude venom พิษงูเห่าผงแห้งในการเคลือบเพลท แสดงให้เห็นว่าวิธีสามารถวิเคราะห์ค่าความแรงเซรุ่มแก้พิษงูเห่าได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ในปี ค.ศ. 2014 Kumar S และคณะ[11] ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าอินเดีย (*Naja naja*) ด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้หาค่าความแรงผลิตภัณฑ์เบื้องต้น (screening test)ในกระบวนการผลิต โดยใช้เซรุ่มแก้พิษงูเห่าอินเดีย ความแรง 0.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน เพื่อกำหนดค่า inverse antibody titre แล้วทดสอบตัวอย่างเซรุ่มจากกระบวนการผลิตโดยวิธี ELISA และวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับค่าของสารมาตรฐานเพื่อหาค่า inverse antibody titre สำหรับคำนวณค่าความแรง หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะเดียวกันนำตัวอย่างดังกล่าวไปทดสอบหาค่าความแรงโดยวิธี MNT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานโดยตรง เมื่อเปรียบเทียบค่าความแรงที่ได้จากทั้งสองวิธี พบว่ามีความสัมพันธ์กัน จากการศึกษาของ Kumar S และคณะ[11] แสดงให้เห็นว่าวิธี ELISA และ MNT เป็นวิธีที่ใช้แทนกันได้ ทั้งนี้วิธีELISAที่ KumarS และคณะ พัฒนาขึ้นมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ระหว่างการผลิตซึ่งยังไม่เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป และใช้เซรุ่มแก้พิษงูเห่าอินเดียสารมาตรฐานในการหาค่าความแรง โดยไม่มีการแสดงผลเปรียบเทียบค่าความแรงที่ผลิตได้กับเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน ขณะที่การศึกษาในรายงานฉบับนี้พัฒนาหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเพื่อการปล่อยผ่านและใช้โปรแกรมทางสถิติ parallel line assay ในการหาค่าความแรงเปรียบเทียบกับความแรงเซรุ่มแก้พิษงูมาตรฐานที่ทราบค่า ซึ่งวิธีทางสถิติดังกล่าวมีระบุในตำรายามาตราฐานสากล

ในปี ค.ศ. 2018 Khaing EM และคณะ[12] ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธี วิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูแมวเซา (*Daboia siamensis*) ซึ่งเป็นงูพิษที่พบในประเทศไทย ด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่างที่เป็นเลือดม้าที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ก่อนจะนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป โดยใช้วิธีการคำนวณค่าความแรงของตัวอย่างจากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารมาตรฐานเช่นเดียวกันกับ Kumar S และคณะ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การพัฒนาวิธีการตรวจหาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูโดยวิธี ELISA สามารถขยายขอบข่ายการนำไปใช้ในเซรุ่มแก้พิษงูอื่น ๆ ได้นอกเหนือจากเซรุ่มแก้พิษงูเห่า

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงทิศทางที่นักวิจัยมุ่งเน้นหาวิธีที่สามารถทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง สำหรับทดสอบเซรุ่มแก้พิษงูที่อยู่ในขั้นตอนระหว่างการผลิตเป็นหลัก เนื่องจากปัจจุบันคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกและตำรายาสากล กำหนดให้วิธีการทดสอบความแรงโดยวิธี MNT เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบเพื่อปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์และเพื่อการวางจำหน่าย

จากวิธีการใช้สัตว์ทดลอง หรือ MNT เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากวัดประสิทธิภาพจากความสามารถของเซรุ่มแก้พิษงูในการป้องกันชีวิตของสัตว์ทดลองให้รอดชีวิตจากพิษงู อย่างไรก็ตามแนวโน้มของจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองทั่วโลกที่มีความเข้มงวดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลักดันการลดการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3Rs หากมีข้อมูลการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้สัตว์ทดลองและ ELISA ว่าทั้งสองวิธีสามารถใช้ทดแทนกันได้ สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการนำวิธี ELISA มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการให้ผลิตภัณฑ์วางจำหน่ายได้ เช่นเดียวกับการทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ human tetanus immunoglobulin ที่มีระบุในตำรายาสากล[13] อย่างไรก็ตามการจัดเตรียมสารมาตรฐานเซรุ่มแก้พิษงูเห่าระดับประเทศมีความสำคัญเพื่อให้เกิดมาตรฐานร่วมกันในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ระหว่างหน่วยงานกำกับภาครัฐและผู้ผลิต รวมถึงการนำสารมาตรฐานมาใช้ในการศึกษาค่าความแรงเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองวิธี นอกจากนี้คาดหวังว่าจะสามารถถ่ายทอดวิธี Indirect ELISA ให้กับผู้ผลิตในประเทศ สำหรับนำไปใช้คัดกรองความแรงพลาสมาของม้าที่ถูกเจาะเก็บเลือด หรือการตรวจวิเคราะห์ระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งไม่ได้มีข้อกำหนดว่าต้องใช้วิธีมาตรฐานในการทดสอบ เป็นการลดการใช้สัตว์ทดลองของผู้ผลิตลง และเป็นข้อมูลสนับสนุนทางวิชาการในด้านที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ตามหลักการ 3Rs ต่อไป

สรุป

วิธี indirect ELISA ในการวิเคราะห์ความแรงเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะและผ่านเกณฑ์ตรวจสอบความถูกต้องในทุกหัวข้อที่กำหนดไว้ ทั้งนี้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความแรงเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในห้องปฏิบัติการได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่อนุเคราะห์พิษงูและเซรุ่มแก้พิษงูเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ ที่ให้ความสำคัญกับการพัฒนาวิธี เพื่อลดการใช้สัตว์ทดลองและสนับสนุนให้มีการเผยแพร่ผลการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report (WHO technical report series no. 1004). Geneva: World Health Organization; 2017. p. 197-388.
2. Department of Medical Sciences. Thai Pharmacopoeia II 2011 volume I part 1. Nonthaburi: Department of Medical Sciences Ministry of Public Health; 2011. p. 707-708.
3. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2023. p. 1238.
4. พระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนที่ 18 ก (วันที่ 13 มีนาคม 2558). หน้า 1-16.
5. Rial A, Morais V, Rossi S, Massaldi H. A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms. Toxicon 2006; 48(4): 462-6.
6. Ibrahim NM, Farid NM. Comparison between two in vitro ELISA-based assays in the determination of antivenom potency. J Appl Sci Res 2009; 5(9): 1223-9.
7. Pornmuttakun D, Ratanabanangkoon K. Development of an in vitro potency assay for antivenom against Malayan pit viper (Calloselasma rhodostoma). Toxicon 2014; 77: 1-5.
8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
9. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2023. p. 723-726.
10. Rungsiwongse J, Ratanabanangkoon K. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against Thai cobra venom. J Immunol Methods 1991; 136(1): 37-43.
11. Kumar S, Kumar S, Behl Y, Gupta RK. Development and standardization of ELISA as pre-screen test for the potency estimation during commercial production of antisnake venom serum (ASVS). Am J Biomed Sci 2014; 6: 20-31.
12. Khaing EM, Hurtado PR, Hurtado E, Zaw A, White J, Warrell DA, et al. Development of an ELISA assay to determine neutralising capacity of horse serum following immunisation with Daboia siamensis venom in Myanmar. Toxicon 2018; 151: 163-8.
13. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2023. p. 3011-3013.

Development of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Potency Testing of Cobra Antivenin

Paisan Pangjunan and Wipawee Wongchana

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The potency test of cobra antivenin using a mouse neutralizing test is a standard method that is recommended in Thai Pharmacopoeia while the 3Rs principle is recently mentioned according to animal ethics. For that reason, indirect ELISA was developed and validated to replace the use of animals. The results showed that the method was specific to cobra antivenin. The percentage of recovery showed the accuracy of the method at 93.54%. The linearity was acceptable ($R^2 \geq 0.99$) when the relationship between the cobra antivenin serum sample serial dilution from 1/7,500 to 1/120,000 and the OD was plotted. The method was suitable for testing the sample at concentrations ranging between 0.2 and 0.8 mg/ml. The repeatability and intermediate precision showed percentages of coefficient of variation (%CV) were 7.65% and 5.13% respectively. The robustness was acceptable by varying the analysts, assay plates, and reaction times between antigen and antibody which did not show a significant difference. Taken together, the indirect ELISA method proposed to test the potency of cobra antivenin was reliable. It could be applied to study the correlation between the potency value obtained from indirect ELISA and the standard method in the future.

Keywords: Potency test, Cobra antivenin, Indirect ELISA