การศึกษาจลนศาสตร์ของพิษงูเห่า และผลของเซรุ่มในกระต่าย

นางอรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-407-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013074

i10295203

THE KINETIC STUDY OF COBRA VENOM

AND

THE EFFECT OF ANTIVENINE IN RABBIT

Mrs. Orrawadee Hanvivatvong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-407-4

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	The Kinetic Study of Cobra Venom and the Effect of Antivenine in Rabbit
By	Mrs. Orrawadee Hanvivatvong
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Reutai Sakulramrung,M.D.,Ph.D
Co-Advisor	Associate Professor Praphan Phanuphak,M.D.,Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya .....Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis committee :

Dilok Yenbutra .....Chairman

(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

Reutai Sakulramrung ...Thesis Advisor

(Assistant Professor Reutai Sakulramrung,M.D.,Ph.D.)

Praphan Phanuphak, M.D. .....Co-Advisor

(Associate Professor Praphan Phanuphak,M.D.,Ph.D)

Visith Sitprija .....Member

(Professor Visith Sitprija, M.D., Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์ : การศึกษาจลนศาสตร์ของพิษงูเห่าและผลของเซรุ่มในกระต่าย (THE KINETIC STUDY OF COBRA VENOM AND THE EFFECT OF ANTIVENINE IN RABBIT) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.พญ.ฤทัย สกุลแรมรุ่ง, 102 หน้า.

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจหาพิษงูเห่าไทย (Naja naja kaouthia) ในน้ำเหลือง โดยวิธี micro-ELISA (double-antibody sandwich technique) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง โดยสามารถตรวจพิษงูเห่าในระดับต่ำถึง 1-5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่ทำปฏิกริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) กับพิษงูที่อาศัยบนบกอีก 4 ชนิด ซึ่งพบบ่อยในประเทศไทย

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของพิษงูเห่าเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ผู้วิจัยได้ฉีดพิษงูเห่าขนาดต่างๆ (80,125,150,160,190 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) เข้าไปในกระต่ายกลุ่มละ 2 ตัว ทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) พร้อมกับเจาะเลือดเป็นระยะเพื่อตรวจหาระดับพิษงู พบว่าสามารถตรวจพบพิษงูเห่าได้ภายใน 15 นาทีหลังได้รับพิษ ปริมาณของพิษจะขึ้นสูงสุดในเวลาประมาณ 15 ถึง 60 นาที และหายไปจากกระแสเลือดภายใน 12-24 ชั่วโมงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของพิษงูเห่าที่ได้รับเข้าไป

ในกระต่ายที่ได้รับพิษงูเข้าไปจำนวนมาก (160 หรือ 190 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) เกือบทุกตัวจะแสดงอาการทางประสาท (neurotoxic signs) เช่น ซึม,อ่อนแรง ตั้งแต่ 60 นาทีหลังได้รับพิษงู อาการเหล่านี้จะทวีรุนแรงโดยกระต่ายจะมีอาการอัมพาตของกล้ามเนื้อต่าง ๆ และตายภายใน 90-370 นาทีหลังได้รับพิษ หากไม่ได้รับการรักษาด้วยเซรุ่มแก้พิษหรือวิธีการอื่น

ในการศึกษาผลของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในกระต่าย 11 ตัว กระต่ายทุกตัวได้รับพิษงูเห่าในปริมาณ 190 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งได้ทดสอบในกลุ่มแรกแล้วว่าสามารถทำให้กระต่ายตายทุกตัว ตามด้วยเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในระยะเวลาต่างๆกันหลังได้รับพิษงู คือให้ทันที(3 ตัว), หรือหลังฉีดพิษงู 15 นาที (4 ตัว) หรือ 2 ชั่วโมง(4 ตัว) พบว่ามีกระต่ายเพียงตัวเดียวจาก 11 ตัวเท่านั้นที่ตาย (อัตรารอดชีวิต 90.90%) กระต่ายตัวนี้ได้รับเซรุ่มเมื่อ 2 ชั่วโมงหลังได้รับพิษ ซึ่งเป็นเวลาซึ่งกระต่ายได้แสดงอาการอัมพาตอย่างรุนแรงแล้วและตายหลังจากได้รับเซรุ่ม 5 นาที นอกจากดูผลของเซรุ่มต่ออาการแล้ว ยังได้ศึกษาผลของเซรุ่มต่อระดับของพิษงูในกระแสเลือดด้วย พบว่าเซรุ่มแก้พิษงูเห่าสามารถ neutralize พิษของงูเห่าในน้ำเหลืองจนหมดภายใน 15 นาที ทำให้ไม่สามารถตรวจพบในน้ำเหลืองได้อีกต่อไป

ผลของการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซรุ่มแก้พิษงูเห่า ยังคงมีประโยชน์ในการรักษาผู้ที่ถูกงูเห่ากัด หากสามารถให้ในเวลาอันรวดเร็วหลังถูกกัด ก่อนที่จะมีอาการรุนแรงเกิดขึ้น ซึ่งทั้งนี้เนื่องจากการ neutralize พิษที่อยู่ในกระแสเลือดจะทำได้ง่ายกว่าเมื่อพิษได้ไปจับที่ acetylcholine receptor แล้ว การทราบจลนศาสตร์ของพิษงูเห่าเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ประกอบการการพัฒนาวิธีการตรวจหาระดับของพิษงูที่มีความไว และความจำเพาะสูงนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการจัดการดูแลรักษาผู้ที่ถูกงูเห่ากัดต่อไป วิธีการนี้ยังอาจนำไปดัดแปลงใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพิษงูอื่น ๆ ได้ด้วยในอนาคต

ภาควิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สรีรวิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ๒๕๓๐

ORRAWADEE HANVIVATVONG : THE KINETIC STUDY OF COBRA VENOM AND THE EFFECT OF ANTIVENINE IN RABBIT. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. REUTAI SAKULRAMRUNG,M.D.,Ph.D. 102 PP.

A micro-ELISA (double-antibody sandwich technique) has been developed for the detection and quantitation of Thai cobra (Naja naja kaouthia) venom in serum. The technique was highly sensitive and specific; it can detect venom levels as low as 1-5 ng/ml and no cross-reaction could be demonstrated against 4 other common terrestrial snake venoms in Thailand.

To study the kinetics of Thai cobra venom, various concentrations of cobra venom (80,125,150,160,190 µg/kg) were injected subcutaneously into each group of two rabbits. Blood samples were collected at various intervals and serum cobra venom levels were determined. Cobra venom was detected in serum within 15 minutes of injection, peaking at 15-60 minutes and disappearing from the circulation in 12-24 hours, depending on the dose of venom injected.

In rabbits injected with high doses of cobra venom (160 or 190 µg/kg), signs of neurotoxicity usually developed at about 60 minutes after venom injection. Without specific antivenine or other supportive measures, the symptoms progressed to severe paralysis and all four rabbits died at 90-370 minutes after venom injection.

To study the efficacy of antivenine in neutralizing the cobra venom in vivo, specific cobra antivenine was administered at 0, 15 minutes or 2 hours following a lethal dose of 190 µg/kg cobra venom. The neutralizing effect of antivenine was assessed by survival rate and the ultimate levels of venom in the serum. Ten out of 11 rabbits survived after giving antivenine (overall survival rate 90.90%). In the deceased animal, antivenine was given late at 2 hours after venom injection when the rabbit had already exhibited severe respiratory failure with cyanosis and expired 5 minutes after antivenine administration. With regard to the serum venom level, the venom was neutralized by specific antivenine to undetectable level as shown by ELISA within 15 minutes of antivenine infusion.

The results indicate the effectiveness of specific antivenine in preventing and reversing the effect of cobra venom in envenomed animals. The efficiency was shown to be related to the timeliness of antivenine administration and the dose of venom injected. This is attributable to the fact that neutralization of toxin in the circulation is much more effective than that in the toxin-receptor complexes level.

Moreover, the cognizance of the kinetics of cobra venom and the development of a sensitive and specific ELISA test for the detection of venom in biological fluids are valuable for the immunodiagnosis of cobra bite and management of the patients. The ELISA method can also be extended and applied to researches on other snake venoms in the future.

ภาควิชา ศัลยศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลศัลยศาสตร์ทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2530

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

The present investigator wishes to express her deep gratitude to the following, who had helped in making this thesis possible.

Dr. Reutai Sakulramrung, Assistant Professor of the Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for her invaluable advice and indispensable help in supervising this thesis.

Dr. Praphan Phanuphak, Associate Professor of Medicine and Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor, for his invaluable advice and constructive criticisms.

Dr. Kamjorn Tatiyakavee, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University is gratefully acknowledged, for the investigator's use of his computer expertise.

Science Division, Thai Red Cross Society, Queen Saovabha Memorial Institute, for the supply of snake venoms.

Dr.Kawee Pupaibul, Associate Professor and head of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for giving the opportunity to undertake this thesis.

Miss Busarawan Sriwanthana, Science Division, Thai Red Cross Society, Queen Saovabha Memorial Institute, for her guidance and provision of sheep red blood cells for passive hemagglutination test.

Dr. Bruce L. Reynolds, Science Division, Queen Saovabha Memorial Institute, for the English manuscripts.

Sincere thanks are also given to all her colleagues in the Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their help, encouragement and understanding; and to the staff and personnel of the Audiovisual Service Centre for their valuable aid in art work and photography.

Finally, the investigator is deeply indebted to her husband for his help, encouragement and understanding.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

LIST OF TABLES..... xi

LIST OF FIGURES..... xii

ABBREVIATIONS..... xiv

OBJECTIVES..... xvi

CHAPTER

I. INTRODUCTION..... 1

II. LITERATURE REVIEW..... 4

COBRA VENOM AND ITS MODE OF ACTION..... 5

Neurotoxin..... 5

Membrane Toxins..... 7

Enzymes..... 8

Nonproteins..... 9

PHARMACOKINETICS OF COBRA VENOM..... 9

Absorption..... 9

Distribution..... 10

Fate and Excretion..... 11

TOXICITY..... 12

SYMPTOMS AND SIGNS PRODUCED BY COBRA VENOM..... 12

THE MANAGEMENT OF COBRA BITE..... 14

First Aid and Prehospital Treatment..... 14

Antivenine Treatment..... 14

Other Modes of Treatment..... 16

IMMUNODIAGNOSIS OF SNAKE BITES..... 17

Immunodiffusion..... 18

Immunoelectrophoresis (IEP)..... 19

Immunofluorescence..... 19

Hemagglutination..... 20

Radioimmunoassay (RIA)..... 21

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).... 23

III. MATERIALS AND METHODS..... 29

1. Experimental Animals..... 29

2. Source of Venoms..... 29

3. Administration of Venom..... 30

4. Antivenines..... 30

5. Study Design..... 31

6. Preparation of Monospecific Anticobra Venom in Rabbits..... 31

7. Passive Hemagglutination Test for Cobra Venom Antibody..... 33

8. Rabbit Anticobra Venom Immunoglobulin G Preparation..... 33

9. Preparation of Enzyme-Labeled Rabbit Anticobra Venom IgG..... 34

10. Determination of Factors Affecting the ELISA System..... 35

11. Standardization of the ELISA Test..... 38

12. Detection and Quantitation of Cobra Venom..... 39

IV. RESULTS..... 41

1. Development of ELISA Method for the Detection of Cobra Venom in Serum..... 41

2. Kinetics of Cobra Venom (Naja naja kaouthia) in Rabbit Serum and Envenomation..... 44

3. The Effects of Antivenine Treatment in Envenomed Rabbits..... 45

V. DISCUSSION..... 48

Conclusions..... 55

REFERENCES..... 74

APPENDIX I..... 89

APPENDIX II..... 92

APPENDIX III..... 97

CURRICULUM VITAE..... 102

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1. Passive hemagglutination titer of rabbit anticobra venom..... 57
2. Checkerboard titration to determine the optimal concentration of reagents in ELISA test..... 58
3. Optimal conditions of ELISA test for the detection of cobra venom..... 59
4. Precision of ELISA test for cobra venom detection....60
5. Mean serum concentrations of cobra venom detected after subcutaneous injection with various doses of venom..... 61
6. Efficacy of antivenine treatment in envenomed rabbits..... 62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. The covalent structure of a long postsynaptic neurotoxin, the siamensis toxin of Naja naja siamensis..... 63
2. Immunodiffusion reaction of rabbit antiserum to cobra venom against venoms from cobra, Russell's viper, green pit viper, banded krait and king cobra.....64
3. Immunodiffussion reaction of rabbit antiserum to cobra venom against goat antiserum to rabbit IgG and swine anti-rabbit serum..... 65
4. Specificity of ELISA test for the detection of cobra venom..... 66
5. Levels of cobra venom in rabbit serum following a subcutaneous injection of 80 µg/kg cobra venom..... 67
6. Levels of cobra venom in rabbit serum following a subcutaneous injection of 125 µg/kg cobra venom..... 68
7. Levels of cobra venom in rabbit serum following a subcutaneous injection of 150 µg/kg cobra venom..... 69
8. Levels of cobra venom in rabbit serum following a subcutaneous injection of 160 µg/kg cobra venom..... 70
9. Levels of cobra venom in rabbit serum following a subcutaneous injection of 190 µg/kg cobra venom..... 71

10. Mean serum concentrations of cobra venom in rabbit serum after subcutaneous injected with various doses of cobra venom.....72

11. Mean serum concentrations of cobra venom after injection with cobra venom and anticobra venom....73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

°c	=	celsius (centrigrade)
CIE	=	Counter Current Immunoelectrophoresis
CV	=	Coefficient of Variation
ed.	=	editor
e.g.	=	exempli gratia
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	=	et alii
etc.	=	et cetera
Fig.	=	Figure
gm	=	gramme
HA	=	Hemagglutination
hr	=	hour
HRPO	=	Horseradish peroxidase
i.e.	=	id est
IEP	=	Immunoelectrophoresis
IgE	=	Immunoglobulin E
IgG	=	Immunoglobulin G
IV	=	Intravenous
kg	=	kilogramme
l	=	litre
mg	=	milligramme
µg	=	microgramme
min.	=	minutes
ml	=	milliliter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

µl	=	microlitre
mol	=	molar
MW	=	Molecular Weight
N	=	Normal
ng	=	nanogramme
nm	=	nanometre
no.	=	number
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
PHA	=	Passive Hemagglutination
QC	=	Quality Control
RIA	=	Radioimmunoassay
rpm	=	round per minute
Sc.	=	Subcutaneous
2nd ed.	=	Second edition
SD	=	Standard Deviation
Vol.	=	Volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBJECTIVES

1. To develop an ELISA method for the detection of cobra venom in serum.
2. To study the kinetics of cobra venom (Naja naja kaouthia) levels in rabbit serum after injection of various doses of cobra venom subcutaneously.
3. To study the effects of antivenine on envenomed rabbits as measured by serum venom levels and survival rate.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย