

計畫編號： DOH99-DC-2040

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

建立抗蛇毒血清之快速效價檢測系統

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：鄭雅芬

研究人員：楊素鈴

執行期間：99 年 4 月 15 日至 99 年 12 月 31 日

目 錄

	頁 碼
封面	(1)
目錄	(2)
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
前言	(5)
材料與方法	(7)
結果	(11)
討論與建議	(19)
參考文獻	(21)

中文摘要

目前本局製造之抗蛇毒血清是以減毒性的蛇毒免疫馬匹，經採血分離出血清，純化精製得之。目前抗蛇毒血清之效價檢測採用實驗動物中和抗體測定法，需要三天檢測才會知道結果，屆時力價可能已下降，無法掌握最佳的採血時機，將影響各種抗蛇毒血清之製備，若抗蛇毒血清製劑不足，將對人們生命安全構成嚴重威脅。許多研究結果顯示酵素連結免疫反應(ELISA)檢驗系統具有良好專一性及較高的靈敏度，且大幅縮短鑑定抗體效價所需的時間，達成即時採血得到最佳抗體的效益，該方法所得結果與利用小鼠進行中和抗體測定之結果相較，具有一致性。因此提出「建立抗蛇毒血清之快速效價檢測系統」計畫，強化提昇原料品質及開發快速效價檢測系統，將可做為本局穩定國內抗蛇毒血清供應之參考。

本計畫透過建立酵素連結免疫反應(ELISA)檢驗系統，鑑定抗飯匙倩蛇毒血清的效價，並依據法規需求建立該系統的分析方法確效：其準確度之回收率及精密度分別可達90-115%和90%以上；線性係數可達0.9以上；血漿(BC111)檢體的LOD和LOQ分別為0.113和0.339；血清(NC94-25B)的部分其LOD和LOQ分別為0.111和0.333，成品(FN9901)檢體的LOD和LOQ分別為0.138和0.414。從各項確效指標可以發現，利用酵素連結免疫反應(ELISA)檢驗系統來鑑定抗飯匙倩蛇毒血清的效價，檢驗數據具有相當的穩定性以及真實性。相信未來此檢驗系統建立之後，能夠取代實驗動物中和抗體測定法，有效減少實驗動物的使用量，縮短檢驗時間，透過快速檢驗、及時採血，提昇原料品質，強化本局穩定國內抗蛇毒血清供應，使本局的毒蛇血清製劑獲得最佳品質保證的效益。

未來將進行其他毒蛇血清效價鑑定，測試此系統對於不同蛇毒血清是否一樣具有相同的穩定性，並建立標準效價檢驗作業流程。

英文摘要

At present, the antivenom is purified by horse serum after animal immunized with inactivated snake toxin. Subsequently, the titer of antivenom is determined by subjects including a serial animal study combining with neutralizing antibodies; Three working days is needed. The time-consuming may affect the preparation of a variety of antivenom, especially in the potency of antivenom decreased. Many studies reported that enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can reduce the time-consuming as comparing to animal study and exhibit high specificity and sensitivity for detecting the potency of antivenom, and enhance the quality of antivenom. The aim of the present study is establishment of an ELISA for examining the potency of anti-cobra toxin antibody. In this study, the accuracy of recovery and precision of the newly established ELISA were 90-115% and 90%, respectively; the linear coefficient was up to 0.9. By using plasma (BC111) as specimen, ELISA results revealed the LOD and LOQ were 0.113 and 0.339, respectively. Using serum (NC94-25B) as specimen, data showed that LOD and LOQ were 0.111 and 0.333. Using anti-cobra toxin antibody (FN9901) as control, the values of LOD and LOQ were 0.138 and 0.414, respectively. Our study demonstrated that the ELISA can display a reliable data. It may be used to replace previous animal-based method and determinate the quality of raw horse serum. Our study also revealed that the ELISA-based methodology has developing potential for determination of the potency of other antivenoms.

前 言

龜殼花、赤尾鮎、雨傘節、百步蛇、鎖鏈蛇及俗稱「飯匙倩」的眼鏡蛇，是國內最常見的六種毒蛇。每年3到10月是台灣毒蛇出沒的主要季節，平均每年約有三百人遭毒蛇咬傷；毒蛇咬傷屬於急重症，最有效的臨床治療方式，以注射正確的抗蛇毒血清最為有效。目前世界各國抗蛇毒血清之製造多以減毒性蛇毒免疫馬匹，經採血分離出血清，純化精製得之。由於毒蛇具有地域性，以致不同地區毒蛇之蛇毒有不同的抗原性(antigenic variation)，因此抗蛇毒抗體通常由當地自行生產。目前本局利用各種減毒過的蛇毒免疫馬匹後，經採血及硫酸銨鹽沈澱精製等步驟，生產出四種抗蛇毒血清產品，分別為：(1)出血性抗蛇毒血清，可抗龜殼花及赤尾青竹絲，(2)神經性抗蛇毒血清，可抗雨傘節及飯匙倩，(3)抗百步蛇毒血清，(4)抗鎖鏈蛇毒血清，皆取得藥政處核發製造許可證明書。

對抗蛇毒血清的品質優劣，主要透過中和力價來判斷，目前抗蛇毒血清之效價檢測採用實驗動物中和抗體測定法。但是採用實驗動物中和抗體測定法，需要3天檢測才會知道結果，屆時力價恐已下降，無法掌握最佳的採血時機。此外實驗動物保護之議題也日益受到重視，依據 Purpose of Control and Supervision on Experiments on Animals (PCSEA) guidelines，必需確認符合3R原則，降低動物使用量、豐富

動物飼養環境(精緻化以降低動物在實驗過程中的疼痛)及使用 in vitro 非動物的取代試驗。除了上面這兩點之外，以不同的實驗方法去鑑定抗蛇毒血清之效價，實驗結果無一致性、耗時且不具有特異性 (specific) 。因此開發符合經濟性、安全性、有效性及即時性之新一代酵素連結免疫反應 (ELISA) 快速檢測抗蛇毒血清效價有其重要性與必要性。

材料與方法

一、蛇毒抗原之製備：

蛇毒抗原之製備：於免疫前一天以 0.1M pH 6.8 之 PBS 將飯匙倩蛇毒配製成 1% 溶液，慢慢滴入 2.5% 戊乙醛(glutaraldehyde ; GA)，使蛇毒含有 GA 之最終濃度為 0.25 % ，充分混合 1 小時後，使其呈現乳白色膠狀即可，並置於 4°C 中過夜。

二、馬匹進行蛇毒抗原免疫：

將蛇毒進行無毒化後與佐劑等體積充分完全混合，第一次免疫注射佐劑使用種類為佛氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) ，往後的每次免疫及追加免疫時則以佛氏不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 混合。將混合均勻乳劑狀之蛇毒，微量多處注射於馬匹之背脊兩側皮下，每匹馬約 3-5 mL 每二週免疫一次，逐次提高劑量，免疫開始 12 週後，每相隔二週採取少量血清測試其中和抗體力價，每毫升抗蛇毒血清均達 60 田中抗毒單位 (Tanaka Units, TU) 以上之馬匹即可部分採血，依照馬匹體重的 $1.75 \pm 0.25\%$ 比例，決定採血的重量。馬匹部分採血後休息 2~4 週，如中和抗體力價不足將依免疫時程第 12 週時之蛇毒劑量，約 15 mg 開始繼續免疫。二週後進行試血測其效價，直至抗蛇毒血清力價均達 60 TU 以上。

三、製備抗蛇毒血清：

製備抗蛇毒血清，分別為未純化的血漿、純化後的原液及市售的成品共三種。自馬匹採血所得血漿以 2000 rpm 離心 10 分鐘後，取得上清液作為未純化的血漿的檢品；將未純化的血漿以硫酸銨沉澱、胃蛋白酶作用及經濾膜過濾精製純化後得到純化後的原液；將純化後的原液進一步分裝及凍乾成為最終產品為市售成品。

四、蛇毒血清中和抗體效價測試：

以生理食鹽水稀釋為不同濃度後與 4 MLD 之蛇毒液混和均勻後，置於 37°C 恆溫箱內反應，靜置作用 1 小時，再以皮下注射體重 12~14 克之 ICR 小鼠，觀察 48 小時，並紀錄動物死亡數目，計算抗體效價。

公式為：效價(MLD/ml)(田中單位)(U)=4 MLD/0.2 ml x 抗體稀釋倍數

五、建立 ELISA 檢測系統

以飯匙倩蛇毒蛋白為黏覆之抗原，於 96 孔微量滴定盤上，黏覆經黏覆緩衝液適當稀釋純化的飯匙倩蛇毒蛋白，4 °C 隔夜反應後備用。實驗前使用 ELISA 清洗儀，以 PBST20 (0.05% Tween20 / PBS) 清除未黏覆之抗原 3 次，然後以 1% BSA/PBS 進行 block，37 °C 反應半小時，清洗 3 次後，加入以 PBST 20 適當稀釋之待測或對照組抗蛇毒抗體 IgY 樣品，放置於 37 °C 保溫箱中二小時。清洗 3 次，再加入兔子抗馬二次抗體馬山葵過氧化酵素複合體 (rabbit anti-horse IgG HRP) 於 37 °C

保溫箱中反應一小時，清洗 3 次。最後，在每孔中加入 100ml OPD(o-phenylenediamine dihydrochloride)酵素受質體，放置於室溫暗處，呈色反應 25 分鐘，以 ELISA 吸光儀讀取波長 450nm 吸收值。

六、建立 ELISA 檢測系統之分析方法確效

(1) 建立系統之準確度

準確度代表用該方法所得分析結果與真值接近之程度。依下式計算其回收率。

回收率(%)=[(2 倍混合液濃度)-檢品濃度]/標準品濃度*100%。

確效指標為其平均回收率(%)範圍應在 90-110%。

(2) 建立系統之精密度

對 IgY 重複多次進行分析所得結果的再現性，以標準差或相對標準差(relative standard deviation ;RSD)的方式表示。計算 RSD 值，不超過 5%。

(3) 建立系統之線性關係

測出分析方法的線性範圍，線性回歸係數(R^2)值必須在 0.95 以上。

(4) 建立系統之最低偵測極限 LOD(Limit of detection)

測出分析方法的最低偵測極限濃度，確效指標為 RSD 小於 5% 以下。

(5) 建立系統之低偵測量 LOQ(Limit of quantiation)

測出分析方法的最低定濃度。確效指標為線性回歸系數(R^2)值必須在 0.95 以上。

利用標準曲線之斜率及截距標準差帶入下列公式，即可得 LOQ。

結 果

一、抗蛇毒血清製備：

(1) 未純化的血漿：

自馬匹採血所得血漿以2000 rpm離心10分鐘後，取得上清液作為未純化的血漿的檢品，批號為: BC111。

(2) 純化的血漿：

將未純化的血漿以硫酸銨沉澱、胃蛋白酵素作用及經濾膜過濾精製純化後得之純化後的原液，批號為: NB94-25B。

(3) 成品：

將純化後的原液進一步分裝及凍乾成為最終產品為市售成品，批號為: FN9901。

二、抗蛇毒血清中和抗體效價測試：

分別將三種不同的蛇毒血清以生理食鹽水稀釋為不同濃度後，與4 MLD之蛇毒液混和均勻後，置於37°C恆溫箱內反應，靜置作用1小時，再以皮下注射體重12~14 克之ICR小鼠，觀察48小時，並紀錄動物死亡數目，計算抗體效價。

(1) 未純化的血漿(plasma)，批號為: BC111

Plasma 0.5 mL + saline 4.5 mL-----A (7X)

Plasma 0.5 mL + saline 5.0 mL-----B (8X)

Plasma 0.5 mL + saline 5.5 mL-----C (9X)

飯匙倩蛇毒批號：C920630 稀釋成 1mg/mL (as Ag stock)

Ag stock 1.0 mL + saline 3.44 mL----- 甲(0.225 mg/mL)

甲 0.6 mL + saline 1.00 mL----- 乙(0.0844 mg/mL)

甲 0.6 mL + saline 1.80 mL----- 丙(0.0563 mg/mL)

丙 0.6 mL + saline 3.44 mL----- 丁(0.0282 mg/mL)

動物 標識	注射劑種類 (mL)	注射量 (mL)	結 果	
			24 h	48 h
YH	甲 0.6 + A 0.6	0.2	---	---
YN	甲 0.6 + B 0.6	0.2	-DD	---
YB	甲 0.6 + C 0.6	0.2	DDD	---
YT	乙	0.2	DDD	DDD
YHB	丙	0.2	DDD	DDD
W	丁	0.2	---	---

效價測試= 血清稀釋倍數 x 4 u/mL x 1 mL/ 0.2 mL

$\geq 9 \times 4 \times 5 \geq 180$ u/mL

(2) 純化後的原液 (serum)，批號為: NC94-25B

Plasma 0.5 mL + saline 4.5 mL-----A (10X)

Plasma 0.5 mL + saline 5.0 mL-----B (11X)

Plasma 0.5 mL + saline 5.5 mL-----C (12X)

飯匙倩蛇毒批號：C920630 稀釋成 1mg/mL (as Ag stock)

Ag stock 1.0 mL + saline 3.44 mL----- 甲(0.225 mg/mL)

甲 0.6 mL + saline 1.00 mL----- 乙(0.0844 mg/mL)

甲 0.6 mL + saline 1.80 mL----- 丙(0.0563 mg/mL)

丙 0.6 mL + saline 3.44 mL----- 丁(0.0282 mg/mL)

動物標識	注射劑種類 (mL)	注射量 (mL)	結 果	
			24 h	48 h
YH	甲 0.6 + A 0.6	0.2	---	---
YN	甲 0.6 + B 0.6	0.2	-DD	-DD
YB	甲 0.6 + C 0.6	0.2	DDD	DDD
YT	乙	0.2	DDD	DDD
YHB	丙	0.2	DDD	DDD
W	丁	0.2	---	---

效價測試= 血清稀釋倍數 x 4 u/mL x 1 mL/ 0.2 mL
= 10 x 4 x 5 = 200 u/mL

(3) 市售成品 (product)，批號為： FN9901

Product 0.5 mL + saline 1.0 mL-----A (3X)

Product 0.5 mL + saline 1.5 mL-----B (4X)

Product 0.5 mL + saline 2.0 mL-----C (5X)

飯匙倩蛇毒批號： C920630 稀釋成 1mg/mL (as Ag stock)

Ag stock 1.0 mL + saline 3.44 mL----- 甲(0.225 mg/mL)

甲 0.6 mL + saline 1.00 mL----- 乙(0.0844 mg/mL)

甲 0.6 mL + saline 1.80 mL----- 丙(0.0563 mg/mL)

丙 0.6 mL + saline 3.44 mL----- 丁(0.0282 mg/mL)

動物標識	注射劑種類 (mL)	注射量 (mL)	結 果	
			24 h	48 h
YH	甲 0.6 + A 0.6	0.2	---	---
YN	甲 0.6 + B 0.6	0.2	-DD	-DD
YB	甲 0.6 + C 0.6	0.2	DDD	DDD
YT	乙	0.2	DDD	DDD
YHB	丙	0.2	DDD	DDD
W	丁	0.2	---	---

效價測試= 血清稀釋倍數 x 4 u/mL x 1 mL/ 0.2 mL
= 4 x 4 x 5 = 80 u/mL

三、建立ELISA分析方法確效系統：

ELISA檢驗系統分析方法之確效分為精密度測試、準確性測試、線性範圍測試、最低偵測極限LOD(Limit of detection) 、最低偵測定量LOQ (Limit of quantiation)。

(1) 系統之精密度測試：

重複多次進行分析所得結果的再現性，以標準差(standard deviation ;SD)的方式表示。結果如下：

Anti-cobra IgG concentration			
Assay	BC111 (10000 x)	NC94-25B(10000x)	FN9901(1000x)
1	2.035	1.138	1.554
2	2.079	1.191	1.628
3	1.983	1.108	1.551
4	1.907	1.089	1.539
5	1.880	1.039	1.456
6	2.039	1.218	1.473
Mean	1.987	1.130	1.534
SD	0.079	0.066	0.062
%CV	4.0	5.9	4.1

血漿BC111所測得平均值為 1.987，標準差為0.079，CV%值為4。
血清NC94-25B所測得平均值為1.13，標準差為0.066，CV%值為5.9。
成品FN9901所測得平均值為 1.534，標準差為0.062，CV%值為4.1。
初步結論：ELISA分析方法之精密度可達90%以上。

(2) 系統之準確性測試：

準確度代表用該方法所得之分析結果與真值接近之程度。依下式計算其回收率。回收率(%)=[(2倍混合液濃度)-檢品濃度]/標準品濃度*100%。

飯匙倩		混合 OD ₄₅₀ 值	Sample OD ₄₅₀ 值	回收率	%RE
BC111	1	2.020	1.803	97.7	2.3
	2	2.046		99.9	0.1
	3	2.035		99.0	1.0
	4	2.090		103.8	3.8
	5	2.036		99.0	1.0
	6	2.002		96.1	3.9
稀釋 1000 倍的標準品 OD ₄₅₀ 值：2.290					

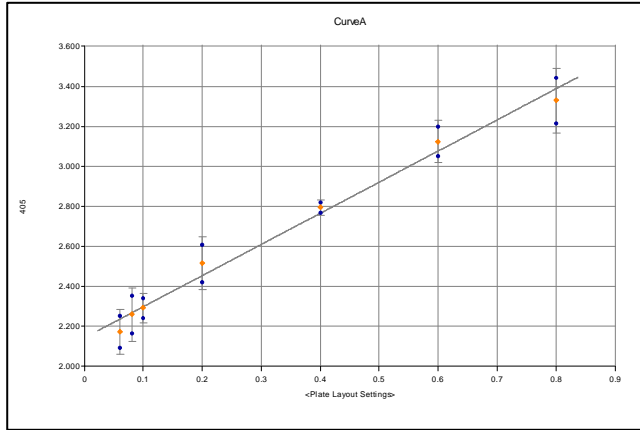
飯匙倩		混合 OD ₄₅₀ 值	Sample OD ₄₅₀ 值	回收率	%RE
NC94-25B	1	1.943	1.660	102.8	2.8
	2	1.962		104.5	4.5
	3	1.946		103.0	3.0
	4	2.010		109.0	9.0
	5	1.993		107.4	7.4
	6	1.851		94.3	5.7
稀釋 1000 倍的標準品 OD ₄₅₀ 值：2.166					

飯匙倩		混合 OD ₄₅₀ 值	Sample OD ₄₅₀ 值	回收率	%RE
FN9901	1	1.730	1.633	105.3	5.3
	2	1.735		105.9	5.9
	3	1.705		102.4	2.4
	4	1.724		104.6	4.6
	5	1.670		98.4	1.6
	6	1.637		94.6	5.4
稀釋 1000 倍的標準品 OD ₄₅₀ 值：1.734					

初步結論：ELISA分析方法準確度之回收率可達90-115%。

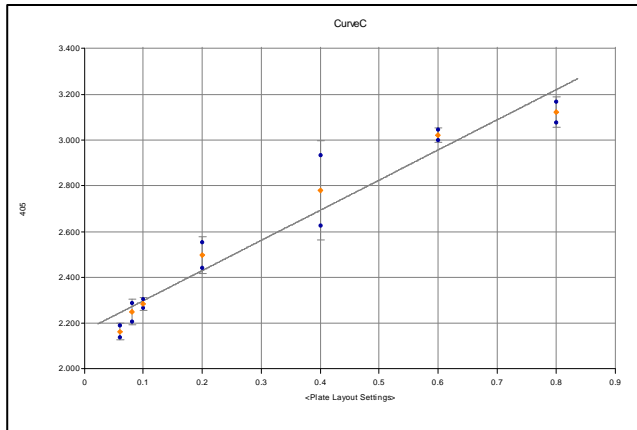
(3) 系統之線性範圍測試：

FN9901



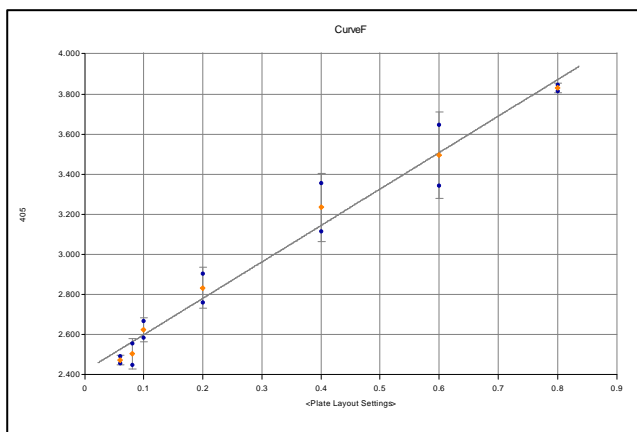
Curve Name	Curve Formula	A	B	R ²
CurveA	Y=A*X+B	1.56	2.14	0.988

NC94-25B



Curve Name	Curve Formula	A	B	R ²
CurveA	Y=A*X+B	1.32	2.17	0.963

BC111



Curve Name	Curve Formula	A	B	R ²
CurveA	Y=A*X+B	1.82	2.42	0.988

初步結論：ELISA分析方法之線性的相關係數可達0.95以上

(4) 系統之最低偵測極限LOD(Limit of detection)及最低偵測量LOQ

(Limit of quantiation)：

確效指標為 RSD 小於 5% 以下。測出分析方法的最低定濃度。確

效指標為線性回歸系數 (R²) 值必須在0.95以上。

		BC111				NC94-25B				FN9901	
		SLOPE	R ²			SLOPE	R ²			SLOPE	R ²
Day1	1	1.2083	0.9847	Day1	1	0.7650	0.9422	Day1	1	1.0276	0.9923
	2	1.1041	0.9896		2	0.7722	0.9700		2	0.9965	0.9908
	3	1.1336	0.9932		3	0.7636	0.9541		3	0.9516	0.9969
	4	1.1391	0.9958		4	0.7551	0.9598		4	0.9132	0.9942
	5	1.1301	0.9936		5	0.7986	0.9731		5	0.9290	0.9948
	6	1.1326	0.9921		6	0.7887	0.9660		6	0.9133	0.9878
Day2	1	1.1364	0.9923	Day2	1	0.7627	0.9652	Day2	1	0.9192	0.9880
	2	1.0965	0.9933		2	0.7776	0.9694		2	0.9326	0.9911
	3	1.1198	0.9926		3	0.7793	0.9714		3	0.9215	0.9926
	4	1.1155	0.9940		4	0.7942	0.9703		4	0.9342	0.9923
	5	1.1077	0.9957		5	0.7916	0.9675		5	0.9172	0.9946
	6	1.0801	0.9953		6	0.8516	0.9719		6	0.9977	0.9889
Day3	1	1.2162	0.9919	Day3	1	0.7937	0.9649	Day3	1	0.9986	0.9902
	2	1.1978	0.9913		2	0.7807	0.9523		2	1.0285	0.9931
	3	1.1813	0.9928		3	0.7832	0.9582		3	0.9898	0.9967
	4	1.1699	0.9928		4	0.7835	0.9533		4	0.9879	0.9954
	5	1.1428	0.9900		5	0.7709	0.9502		5	0.9771	0.9956

	6	1.1703	0.9933		6	0.8517	0.9638		6	0.9771	0.9904
Mean		1.1435	0.9925	Mean		0.7869	0.9624	Mean		0.9618	0.9925
SD		0.039	0.003	SD		0.027	0.009	SD		0.040	0.003
%CV		3.4	0.3	%CV		3.4	0.9	%CV		4.2	0.3
LOD		0.113		LOD		0.111		LOD		0.138	
LOQ		0.340		LOQ		0.334		LOQ		0.414	

初步結論：BC111的LOD：0.113及LOQ：0.340。

NC94-25B的 LOD：0.111及LOQ：0.334。

FN9901的 LOD：0.138及LOQ：0.414。

討論與建議

採用實驗動物中和抗體測定法檢測抗蛇毒血清之效價是目前常用的方式，但檢測時間需要三天才會知道結果，考量到檢測時間過長，力價可能早已下降，無法正確掌握最佳的採血時機，影響到各種抗蛇毒血清之製備。因此本計畫以酵素連結免疫反應（ELISA）測定法作為抗蛇毒力價的指標，能夠縮減蛇毒血清效價檢測時間，達到及時採血的目的。此外毒蛇為保育類動物，較不易取製蛇毒，使用酵素連結免疫反應（ELISA）測定效價所使用的蛇毒劑量，比實驗動物中和抗體測定法所需要的劑量少，能有效利用有限的蛇毒蛋白。

初步的實驗結果顯示，使用酵素連結免疫反應(ELISA) 檢驗系統所得實驗結果，與利用小鼠進行實驗動物中和抗體測定法的實驗結果相較，具有一致性，確實能夠大幅縮短鑑定抗體效價所需的時間，達到即時採血得到最佳抗體的效益。在分析確效的部分，使用酵素連結免疫反應（ELISA）檢驗系統進行分析，測量的精密度可達到94%以上，準確度的回收率也達到90-115%，代表實驗數據符合真實度相當高；在線性係數的確效結果方面，三種蛇毒血清的線性係數分別為0.988（BC111）、0.963（NC94-25B）和0.988（FN9901），皆達到0.95以上的水準；此外BC111、NC94-25B和FN9901的LOD分別為0.113、0.111和0.138，BC111和NC94-25B的LOQ分別為0.339、0.333和0.414。

各項確效指標都顯示，利用酵素連結免疫反應（ELISA）檢驗系統來鑑定抗飯匙倩蛇毒血清效價，其檢驗數據具有相當的穩定性以及真實性。相信未來此檢驗系統建立之後，能夠取代實驗動物中和抗體測定法，有效減少實驗動物的使用量，縮短檢驗時間，透過快速檢驗、及時採血，提昇原料品質，強化本局穩定國內抗蛇毒血清供應，使本局的毒蛇血清製劑獲得最佳品質保證的效益。

未來將進行其他毒蛇血清效價鑑定，測試此系統對於不同蛇毒血清是否一樣具有相同的穩定性，並建立標準效價檢驗作業流程。

參考文獻

1. R. Chander et al. 2006 A new in-vitro agglutination technique for potency estimation of antisnake venom serum (ASVS) *Toxicon* 48 (2006) 1011–1017
2. FDA CDER CVM. Guidance for industry: bioanalytical method validation May 2001.
3. 毛壽先、殷鳳儀。台灣常見陸地毒蛇簡介。台灣省立博物館。1990。
4. Laloo DG, David R, Theakston G. Snake Antivenoms. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*. 2003, 41 : 277-290.
5. Winkel KD, Mirtschin P, Pearn J. Twentieth century toxinology and antivenom development in Australia. *Toxicon* 2006, 48. 738–754.
6. Hodgson WC, Wickramaratna JC. 2006. Snake venoms and their toxins: An Australian perspective Wayne C. Hodgson, Janith C. Wickramaratna. *Toxicon*. 48 : 931-940.
7. WHO OFFSET PUBLICATION NO. 58, 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. World Health Organization, Geneva, p. 5.
8. Roush, W., 1996. Hunting for animal alternatives. *Science* 274, 168–171.
9. Ahuja, M.L., Brooks, A.G., 1944. In-vitro test for assay of potency of cobra anti-venom. *Indian J. Med. Res.* 32, 227–231.
10. Ananthapadmanabhan, J., 1991. Snakebite. In: Dalal, P.M.(Ed.), *Medicine update*. Association of Physicians of India, Bombay, pp. 93–114.
11. Boche, I., Russell, F.E., 1968. Passive haemagglutination studies with snake venom and antivenin. *Toxicon* 6, 125–130.
12. Christensen, P.A., 1955. *The South African Snake Venoms and Antivenoms*. The South African Institute for medical Research, Johannesburg, pp. 67–88.
13. Eagle, H., 1937. The coagulation of blood by snake venom and its physiological significance. *Exp. Med.* 65, 613–639.
14. Chang LS, Lin R, Chen KC, Chang CC. Enrichment of the antibodies against the C-terminus of Taiwan cobra cobrotoxin using dimeric glutaraldehyde-modified toxin as an immunogen. *Toxicon* . 2003, 41 : 181–186.
15. Eugeniusz W, Janusz D, Anderzej L. Nutritional immunity in horses. *Bull. Vet. Inst.*
16. oleman, R.M., Lombard, M.F., Sicard, R.E., 1992. *Fundamental Immunology*, second ed. W.M.C. Brown Doboguce, IA 5, pp. 88–115.