Chulalongkorn Medical Journal

Volume 33
Issue 5 *May 1989*

Article 4

5-1-1989

การผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจากเลือดของคนไทย

สวง ปัณฑวงศ์

กิตติพันธ์ หัสเสม

ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช

อรุณรัตน์ จันทนขจรพุ้ง

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

ปัณฑวงศ์, สวง; หัสเสม, กิตติพันธ์; สกุลดำรงค์พานิช, ทัศนีย์; and จันทนขจรพุ้ง, อรุณรัตน์ (1989) "การผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจากเลือดของคนไทย," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 33: Iss. 5, Article 4.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol33/iss5/4

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจากเลือดของคนไทย

สวง ปัณฑวงศ์* กิตตินันท์ หัสเสม*
ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช* อรุณรัตน์ จันทนขจรฟุ้ง*

Pundhawong S, Hussem K, Sakuldamrongpanich T, Chantanakajornfung A. Production of rabies immunoglobulin (Human). Chula Med J 1989 Apr; 33(4) : 355-361

Production of rabies immunoglobulin (HRIG) from volunteer donors was performed under the cooperation of the National Blood Centre and the Science Division of the Thai Red Cross Society to solve the problem of rabies in Thailand to meet our economic status by avoiding imported therapeutic materials, by using the modified cold ethanol protein fractionation method to fractionate the plasma obtained from volunteer donors who were immunized with 0.1 ml intradermal cell culture vaccine (TRCS-VEROLAB, inactivated rabies vaccine on vero cells, Wista rabies strain PM/WI 38-1503-3M) at the deltoid regions of both arms on days 0, 7, and 21. One week to one month after the last shot, plasma from the immunized volunteers was obtained by manual double plasmapheresis. Since 1987, 4 batches of HRIG were produced from starting plasma of 61 to 72 liters per batch, obtaining the final product of TRCS-HRIG at the average of 300 (5 ml) vials per batch containing rabies antibody averaging 150 IU/ml, with 97 - 98% purity of IgG; all tests met the requirements recommended by WHO. The product was distributed to the science division of the Thai Red Cross Society to serve the public safety and economically.

Reprint request : Pundhawong S, Plasma and Blood Fractionation Division. National Blood Centre, The Red Cross Society, Henry Dunant Rd., Bangkok 10330, Thailand.
Received for publication. July 18, 1988.

* แผนกพลาสมาและแปรรูปโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เป็นเวลาเกือบ 50 ปีแล้ว ที่ได้มีการแยกสารประกอบโปรทีนของพลาสมาออกมาใช้ในวงการแพทย์ โดยเริ่มตั้งแต่ E.J.COHN และคณะ[1-3] ที่มหาวิทยาลัยฮาวาร์ด นับเป็นคนแรกที่ได้เริ่มยุคของ Plasma Fractionation ขึ้นในปี พ.ศ. 2483 โดยครั้งแรกก็ใช้ salts ต่าง ๆ เป็นตัวแยกสารประกอบโปรทีนในพลาสมาออกมา แต่ต่อมาในปี พ.ศ. 2489 ก็พบว่าแอลกอฮอล์เป็นตัวแยกที่ดีที่สุด จากนั้นก็ได้มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายคนได้พยายามค้นคว้าและดัดแปลงวิธีของโคห์น ให้ได้ผลดีขึ้น พร้อมทั้งประหยัด ง่ายและปลอดภัย เช่น Hink et al[4] (พ.ศ. 2500), Kistler และ Nitschmann[5,6] (พ.ศ. 2505) และ Bjorling[7] (พ.ศ. 2515) โดยใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวแยกเช่นเดียวกัน

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้เริ่มทำการแยกสารประกอบโปรทีนของพลาสมา ตั้งแต่ปี 2528 เพื่อแยกแอลบูมิน และอิมมูโนโกลบูลิน จากพลาสมาของโลหิตที่ได้มาจากผู้บริจาคโลหิต โดยสามารถแยกพลาสมาได้ครั้งละประมาณ 60-80 ลิตร

วัตถุประสงค์

ปัจจุบันโรคพิษสุนัขบ้า ยังเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำหรับประชาชนชาวไทยอยู่มากพอสมควรทีเดียว และเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่สกัดจากเซรุ่มคนยังต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ คนไข้รายหนึ่ง ๆ ถ้าฉีดเซรุ่มนี้จะต้องเสียเงินราว 7,000 - 8,000 บาท แต่ถ้าใช้เซรุ่มที่ทำจากม้าจะเสียเงินราว 600 - 900 บาท แต่ก็อาจจะเกิดอาการแพ้เซรุ่มจากม้าได้ ฉะนั้นศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ และกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย จึงได้เริ่มโครงการผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจากเลือดของคนไทยขึ้น โดยกองวิทยาศาสตร์ให้การสนับสนุนในด้านวัคซีนที่ใช้ฉีดให้กับอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเป็นผู้ผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า

วัสดุและวิธีการ

อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ

อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ ได้คัดเลือกจากบุคคลที่ไม่มีประวัติเกี่ยวกับโรคตับอักเสบหรือโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS) กล่าวคือ ไม่มีประวัติของตัวเหลือง, ตาเหลือง, รักร่วมเพศ, ติดยาเสพติดหรือเคยได้รับการถ่ายเลือดมาก่อน ซึ่งก็จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 คือประชาชนทั่วไป ซึ่งจะได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าให้ ซึ่งปัจจุบันมีอยู่ประมาณ 800 คน

กลุ่มที่ 2 คือประชาชนที่ถูกสุนัขบ้าหรือสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมกัด และได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเรียบร้อยแล้ว ซึ่งปัจจุบันมีอยู่ประมาณ 200 คน

การฉีดวัคซีนให้อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ

อาสาสมัครกลุ่มที่ 1 จะได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า คือ Merieux inactivated rabies vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนที่ทำมาจากเซลล์เพาะเลี้ยง (Wista Rabies Strain PM/WI 38-1503-3M) เข้าในชั้นผิวหนังที่บริเวณต้นแขนทั้งสองข้าง ๆ ละ 0.1 มล. ผู้ที่ยังไม่เคยฉีดวัคซีนมาก่อนจะต้องฉีด 3 ครั้งก่อน คือ ในวันที่ 0, 7 และ 21 หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน จึงจะมาบริจาคโลหิตหรือบริจาคพลาสม่า เพื่อนำมาผลิตเซรุ่ม และจะได้รับการฉีดวัคซีนกระตุ้นอีกครั้งหนึ่งประมาณ 1 สัปดาห์หรือ 1 เดือน ก่อนที่จะมาบริจาคโลหิตอีกต่อไป

อาสาสมัครกลุ่มที่ 2 จะเป็นผู้ได้รับการฉีดวัคซีนชนิดเดียวกันจนครบเรียบร้อยแล้ว หลังจากที่ถูกสุนัขกัด และทางกองวิทยาศาสตร์จะเป็นผู้ทำการคัดเลือกและส่งมาให้ทางศูนย์บริการโลหิตฯ พร้อมทั้งหนังสือรับรองเพื่อดำเนินการต่อไป และทางศูนย์บริการโลหิตฯ ก็จะฉีดวัคซีนกระตุ้นให้เหมือนกับอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 ในการที่จะมาบริจาคโลหิตในครั้งต่อไป

ที่มาของพลาสมาเพื่อนำมาผลิตเซรุ่ม

พลาสมาที่จะนำมาผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าก็ได้มาจากอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยการบริจาคโลหิตหรือบริจาคพลาสมา

จากการบริจาคโลหิต

การบริจาคโลหิตก็เหมือนกับผู้บริจาคโลหิตทั่ว ๆ ไป โดยจะเจาะโลหิตจากอาสาสมัครลงในถุงพลาสติกแบบคู่ (CPD double blood bag) ประมาณ 450 มล. แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (MSE Refrigerated Centrifuge) 2,200 รอบ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรด จากนั้นก็แยกพลาสมาออกโดยเครื่องปั่นแยกพลาสมา (Plasma extractor) เข้าไปในถุงอีกถุงหนึ่ง (satellite bag) เป็น closed system เพื่อป้องกันการติดเชื้อโรคซึ่งจะได้พลาสมาประมาณ 200-250 มล. ก็นำพลาสมาไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -30 องศา

เซ็นติเกรด ส่วนเม็ดเลือดแดงที่ได้ก็นำไปเก็บไว้ที่ตู้ +4 องศาเซ็นติเกรด เพื่อนำไปใช้กับผู้ป่วยที่ต้องการและการบริจาคโลหิตก็สามารถที่จะบริจาคได้ทุก 3 เดือน

จากการบริจาคพลาสมา

การบริจาคพลาสมา คือการนำเอาแต่พลาสมาอย่างเดียวจากอาสาสมัคร โดยวิธีการที่เรียกว่าการทำ plasmapheresis ซึ่งจะทำแบบ manual double plasmapheresis โดยจะเจาะเลือดอาสาสมัครลงในถุงของชุดทำ plasmapheresis ประมาณ 450 มล. แล้วนำไปปั่นแยกเอาพลาสมาออก ส่วนเม็ดเลือดทั้งหมดจะนำกลับคืนเข้าไปในตัวของอาสาสมัครคนนั้น (autotransfusion) จากนั้นก็เจาะเลือดออกมาอีกถุงหนึ่ง แล้วทำเช่นเดียวกับถุงแรก ก็จะได้พลาสมาครั้งหนึ่ง 2 ถุง ประมาณ 400-450 มล. นำพลาสมาที่ได้ไปเก็บไว้ที่ตู้ -30 องศาเซ็นติเกรด การบริจาคพลาสมาสามารถที่จะบริจาคได้ทุกเดือน

ขั้นตอนในการผลิตเซรุ่ม

การตรวจสอบพลาสมา

พลาสมาที่ได้มาทุกถุง ก่อนที่จะนำมาผลิตเซรุ่มจะต้องผ่านการตรวจสอบที่สำคัญดังนี้

- การตรวจความแรงของภูมิคุ้มกัน (titer of rabies antibody) จะต้องมีภูมิคุ้มกันไม่ต่ำกว่า 10 IU/ml
- การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี (Hepatitis B Surface antigen) ต้องไม่มี
- การตรวจหา anti-HIV (AIDS) ต้องไม่มี

โดยจะคัดเลือกเฉพาะพลาสมาที่ได้มาตรฐานผ่านการตรวจสอบดังกล่าวเรียบร้อยแล้วเท่านั้นมาผลิตเซรุ่ม โดยจะรวบรวมพลาสมาให้ได้ครั้งหนึ่ง ๆ ประมาณ 60-80 ลิตร ก็จะประมาณ 300-400 ถุง (5 ถุงเท่ากับ 1 ลิตร) นำพลาสมาที่ได้มาละลายที่ห้อง +4 องศาเซ็นติเกรด เมื่อละลายเรียบร้อยนำมาเทรวมกันในถังขนาดความจุ 200 ลิตร เก็บตัวอย่างพลาสมาจาก pooled plasma ไปตรวจสอบหามาตรฐานอีกครั้งหนึ่ง คือตรวจ pH, total proteins, titer ของ rabies antibody, HBsAg, anti HIV และ fractions ต่าง ๆ ของโปรตีนของพลาสมา

การแยกสารประกอบโปรทีนของพลาสมา (plasma fractionation)

การทำ plasma fractionation ใช้วิธีของ Mme Fontez[8] แห่งศูนย์บริการโลหิตมองเปลิเยร์ประเทศฝรั่งเศส ซึ่งได้ดัดแปลงบางขั้นตอนจากวิธีของ Kistler และ Nitschman[5] (ตามแผนผังที่ 1 และ 2) ขั้นตอนการผลิตแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

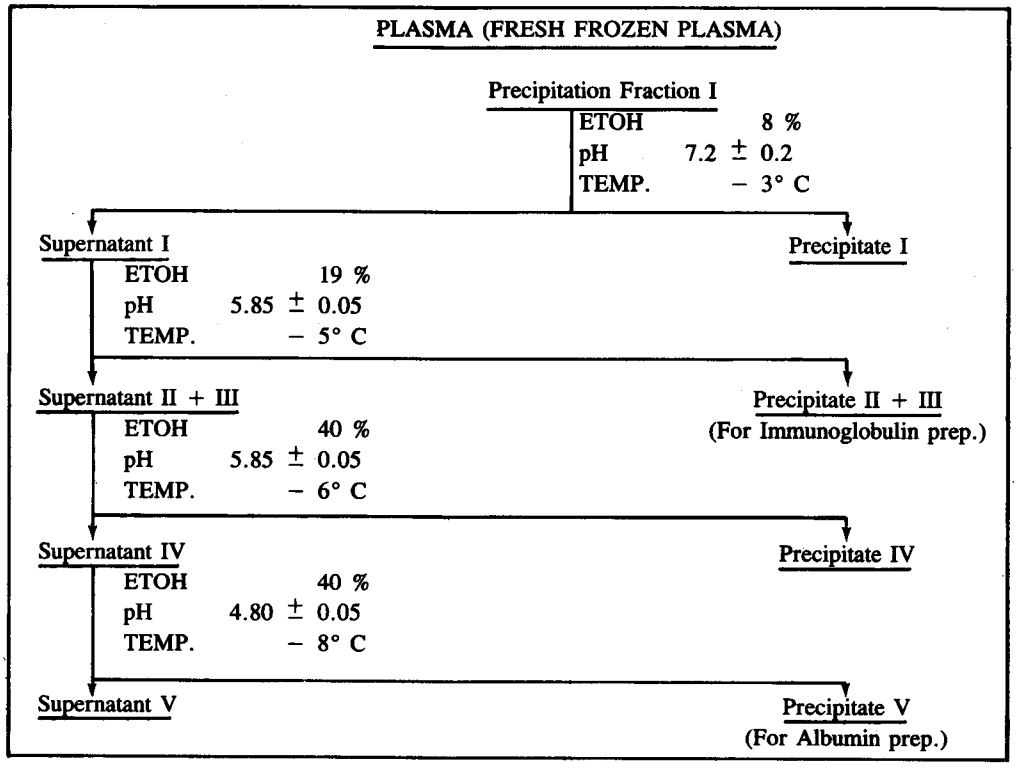

Figure 1. Schematic of plasma fractionation at NBC Bangkok by cold ethanol method.

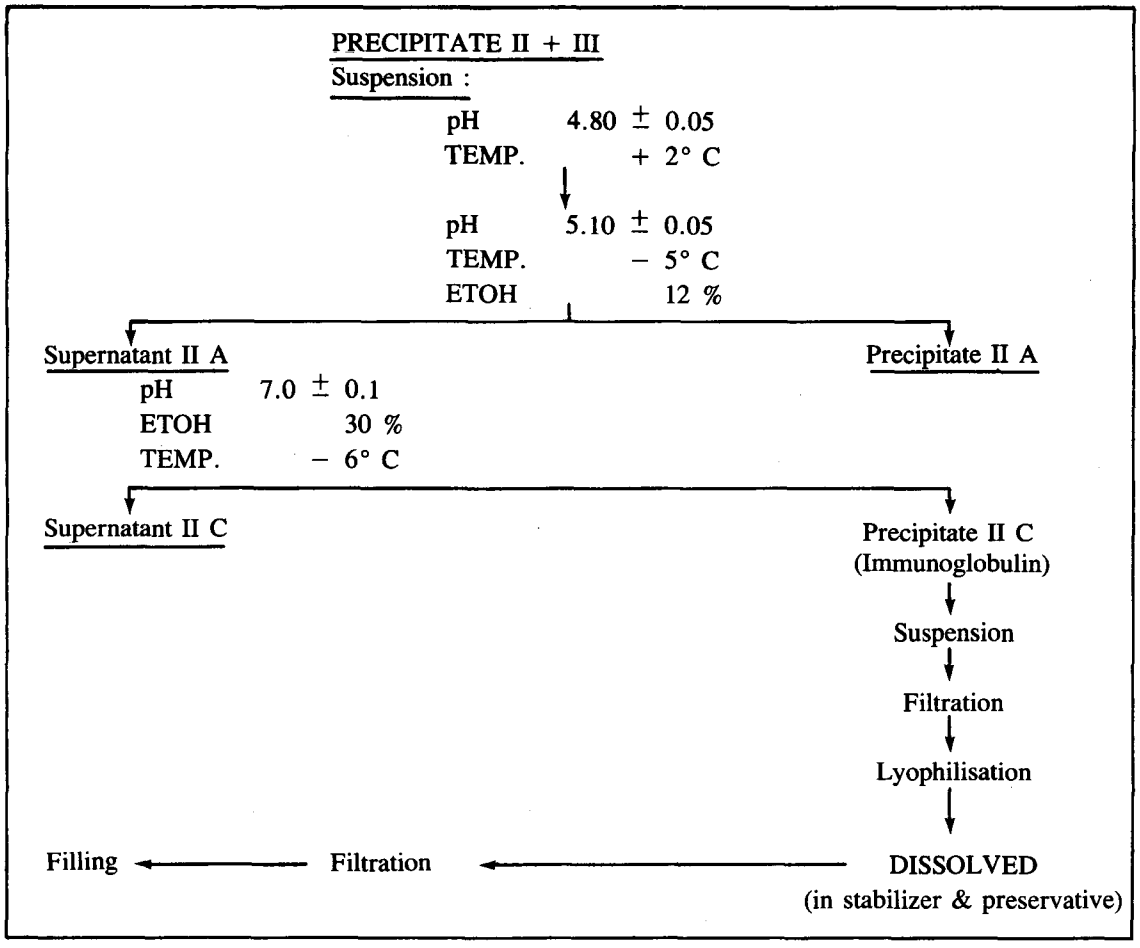

Figure 2. Preparation of immunoglobulin (NBC bangkok).

- การแยกเอาโปรทีน Precipitate II+III

การแยกโปรทีนส่วนต่าง ๆ ออกตามวิธีดังกล่าวก็จะใช้เอธานอลแอลกอฮอล์เป็นตัวแยกโดยความควบคุมให้ได้ pH, ionic strength, อุณหภูมิ, เวลา และจำนวนของโปรทีนต่าง ๆ กัน (ตามแผนผังที่ 1) ในถังที่มีเครื่องกวนและท่อความเย็นเพื่อกวนให้ส่วนผสมต่าง ๆ ในถังให้เข้ากันได้ดีและควบคุมอุณหภูมิของส่วนผสมให้ได้ตามต้องการ การแยกเอาตะกอนของโปรทีนส่วนต่าง ๆ ออกก็ใช้ปั่นแยกออกโดยเครื่องปั่นแยกรอบสูง (CEPA Centrifuge, model Z601, West Germany) ประมาณ 17,000 รอบต่อนาที ก็จะได้ตะกอนของโปรทีน ส่วนที่ II+III (Precipitate II+III) ออกมาประมาณ 3.3-4.1 กิโลกรัม

- การแยกเอาโปรทีน Precipitate IIC (Immunoglobulins)

เมื่อได้ precipitate II+III เรียบร้อยแล้ว ก็นำมาแยกเอาเฉพาะ precipitate IIC โดยวิธีเดียวกัน (ตามแผนผังที่ 2)

- การทำ final product (ตามแผนผังที่ 2)

นำ precipitate IIC มาละลายน้ำกลั่น 5 ลิตรต่อ 1 กิโลกรัม ของ precipitate ซึ่งมี glycin ประมาณ 10 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมของ precipitate เพื่อเป็นตัว stabilizer นำมากรองด้วย non-asbestos filter (Seitz, Germany) ขนาด Supra 500, Supra 100 และ Supra EKS ตามลำดับบรรจุในขวดขนาด 500 มล. จำนวน 300 มล. นำไปปั่นให้แข็งด้วยเครื่อง Vertical spin freezer(USIFROID, Model CM10, France) ที่อุณหภูมิ -45 องศาเซ็นติเกรด ประมาณ 20 นาที จากนั้นก็นำมาทำแห้ง (Lyophilisation) ด้วยเครื่อง Freeze - drying (USIFROID, model S.M.V., France) นำผงของ PIIC ที่ได้มาละลายน้ำกลั่นที่ผสมด้วย glycin ประมาณ 0.3 mol/liter เป็นตัว stabilizer และ 0.01% ของ Thimerosal เป็นตัว preservative กรอง sterile ด้วยแผ่นกรองชนิด non-asbestos ขนาด Supra 500, Supra 100 และ Supra EKS (Seitz, Germany) ตามลำดับ จากนั้นก็นำมาบรรจุลงในขวดขนาด 5 มล. โดยผ่านเครื่องกรอง millipak 100 ขนาด 0.22 ไมครอน (Millipore, U.S.A.)

การตรวจสอบมาตรฐานของการผลิต

การตรวจสอบมาตรฐานของการผลิต ได้ทำการตรวจสอบตั้งแต่พลาสมาที่นำมาผลิตเซรุ่ม ระหว่างการแยกส่วนประกอบของโปรทีน และการเตรียมเซรุ่ม ตามขั้นตอนที่ทาง WHO[9] ได้กำหนดไว้ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

- การตรวจ Potency หรือ titer ของ antibody โดยวิธี Rapid Immunofluorescent Focus Inhibition Test[10] (RIFFIT) และวิธี Neutralization Protection Test in animals
- การตรวจ concentration ของ protein ด้วยวิธี Biuret
- การตรวจ pH ในเซรุ่มที่ผลิต โดยผสมเป็น 1 กรัม % ของโปรทีน ด้วย 0.15 mol/l sodium chloride วัดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซ็นติเกรด ± 2 องศาเซ็นติเกรด
- การตรวจสอบหาจำนวนของ immunoglobulins โดยวิธี radial immunodiffusion และ electrophoresis
- การตรวจสอบไพโรเจน ได้ตรวจสอบโดยฉีด immunoglobulin เข้าหลอดเลือดดำของกระต่ายขนาด 1.0 มล. ต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมของกระต่ายทั้ง 3 ตัว ต่อครั้ง
- การตรวจสอบ toxicity ได้ตรวจสอบในหนูโดยฉีด immunoglobulin ขนาด 0.5 มล. เข้าช่องท้อง ให้หนูทั้งหมด 6 ตัวต่อครั้ง
- การตรวจ sterility ตรวจสอบโดยใช้สารเพาะเชื้อ 2 ชนิด คือ Fluid Thioglycollate และ Sabouraud ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซ็นติเกรด และ 37 องศาเซ็นติเกรด เป็นเวลา 2 อาทิตย์
- การตรวจสอบ stability โดยการนำเซรุ่มที่ผลิตได้ใส่ไว้ใน water bath 57 องศาเซ็นติเกรด นาน 4 ชั่วโมง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโปรทีน
- การตรวจสอบ HBsAg และ anti-HIV โดยวิธี ELIZA ด้วยน้ำยาของ Pasteur, Wellcome, Abbott, Hoechst และ Green Cross

ผลของการผลิต

ผลของการผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 4 lots ด้วยกัน ได้ผล (ตามตารางที่ 1, 2 และ 3) ที่สำคัญ ๆ ดังนี้

Table 1 Yield of antibody and protein in bulk purified material

lot no.	starting plasma (F.F.P)				bulk purified material			yield of protein
	bags	vol. l	titer IU/ml	protein gm %	vol. l	titer IU/ml	protein gm %	gm/L of plasma
8713	300	61	11	5.9	6.15	48.2	4.85	4.89
8720	388	70	14.1	5.5	7.25	48.8	5.10	5.28
8809	362	66	13.9	6.1	18.6	49.0	2.60	7.33
8818	393	72	10.0	5.8	18.6	31.5	2.20	5.68

Table 2 Distribution of immunoglobulins in final product

lot no.	yield of protein	yield of Ig	distribution of Ig %			
	gm/L of plasma		IgG	IgA	IgM	IgD
8713	4.89	4.74	96.67	2.0	1.29	0.04
8720	5.28	5.15	97.67	2.1	0.31	0.02
8809	7.33	7.12	96.97	2.0	0.98	0.05
8818	5.68	5.50	97.33	1.9	0.75	0.02

Table 3 Control final product of rabies immunoglobulin (human)

final product \ lot no.	8713	8720	8809	8818
hrig 5 ml/vial (vial)	261	291	320	284
hydrogen ion concentration (pH)	6.95	7.04	6.85	6.90
concentration of protein (gm%)	17.5	15.6	15.5	14.0
potency (IU/ml)	133	147	155	150
purity of IgG (%)	97	98	97	97
stability test	neg.	neg.	neg.	neg.
sterility test	neg.	neg.	neg.	neg.
toxicity test	neg.	neg.	neg.	neg.
pyrogenicity test	neg.	neg.	neg.	neg.
stabilizer : glycin (mol/L)	0.3	0.3	0.3	0.3
preservative : thimerosal (%)	0.01	0.01	0.01	0.01

จำนวนของ immunoglobulins ได้ประมาณ 4.74-7.12 กรัมต่อลิตรของพลาสมา ซึ่งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 5.62 กรัมต่อลิตรพลาสมา นับได้ว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ เพราะโดยทั่วไปในการใช้วิธีนี้ จะได้จำนวนของ immunoglobulins ประมาณ 4.5 กรัมต่อลิตรของพลาสมา

Purity immunoglobulin G ที่ได้ก็อยู่ในมาตรฐาน คือได้ประมาณ 97-98% ซึ่งตามมาตรฐานของ WHO จะต้องมี purity ของ IgG ไม่น้อยกว่า 90%

Potency ของเซรุ่มที่ผลิตได้ก็นับว่าอยู่ในมาตรฐาน คือได้ประมาณ 133-155IU/ml. ซึ่งตามมาตรฐานของ U.S.P. ต้องมี Potency ไม่น้อยกว่า 110 IU/ml.

Stability ของเซรุ่มก็อยู่ในมาตรฐาน คือไม่มีการเปลี่ยนแปลง คงทนต่อสภาพอุณหภูมิ 57 องศาเซ็นติเกรด นาน 4 ชั่วโมง เป็นอย่างดี

วิจารณ์

โครงการผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้านี้ จะต้องมีอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการจำนวนมาก ถึงจะผลิตเซรุ่มออกใช้ได้พอเพียง เพราะว่าการผลิตแต่ละครั้งจะต้องใช้พลาสมาประมาณ 60 ถึง 80 ลิตร ซึ่งจะได้เซรุ่มประมาณครั้งละ 300 ขวด ๆ ละ 5 ลบ.ซม

วิธีการผลิตนั้น วิธี cold ethanol protein precipitation เป็นวิธีที่เหมาะกับสภาพและสถานะทางเศรษฐกิจของบ้านเรา เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด ข้อสำคัญจะต้องควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น pH, concentration of protein, concentration of ethanol, ionic strength และอุณหภูมิให้เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของการผลิต ซึ่งสภาวะทั้ง 5 นี้เป็นตัวสำคัญและมีอิทธิพลต่อการที่จะสามารถแยกโปรทีนแต่ละตัวออกมาได้มากหรือน้อย

การผลิตด้วยวิธีนี้ ก่อนที่จะทำเป็น final solution นั้นจะต้อง eliminate เอาแอลกอฮอล์ออกให้หมด ซึ่งในการผลิตนี้ต้องนำ bulk purified material มาทำแห้งโดยวิธี lyophilisation ซึ่งจำนวนโปรทีนและ titer ของ rabies antibody ใน bulk purified material ยังมีปริมาณที่ต่ำอยู่ (ตามตารางที่ 1) จากนั้นจึงนำ powder ที่ได้มาละลายทำเป็น final solution (filling lot) โดยการนำค่าโปรทีนและ titer ของ bulk purified material มาคำนวณให้ final product มีจำนวนโปรทีนอยู่ระหว่าง 10-18 กรัม% และ titer ของ rabies antibody ไม่น้อยกว่า 110 ยูนิต/ลบ.ซม. ตามมาตรฐานของ U.S.P.[11] ดังนั้นค่าโปรทีนและ titer ของ rabies antibody ใน final product จะมีค่าสูงขึ้น (ตามตารางที่ 3)

สำหรับ titer ของ antibody ในเซรุ่มที่ผลิตโดยวิธีนี้ จะได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวน titer ของ antibody ที่มีอยู่ในพลาสมาที่นำมาผลิต สำหรับพลาสมาที่จะนำมาผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า จะต้องมี titer ของ rabies antibody ไม่น้อยกว่า 10 ยูนิต/ลบ.ซม. จึงจะได้ final product ที่มี titer ของ rabies antibody ตามมาตรฐานที่ต้องการ

สรุป

ได้ทำการผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า (HRIG) จำนวน 4 ครั้ง จากพลาสมาจำนวน 61, 66, 70 และ 72 ลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้รับบริจาคมาจากอาสาสมัครที่ได้คัดเลือกแล้ว ว่าไม่มีประวัติเกี่ยวกับโรคตับอักเสบ และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS) โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นผู้ที่เคยถูกสุนัขกัดและได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเรียบร้อยแล้ว และอีกกลุ่มหนึ่งเป็นประชาชนทั่วไป ซึ่งจะได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ที่ทำมาจากเซลล์เพาะเลี้ยง (TRCS-VERORAB) จำนวน 0.1 ลบ.ซม. เข้าชั้นผิวหนัง บริเวณต้นแขนทั้ง 2 ข้าง ในวันที่ 0, 7 และ 21 ได้ใช้วิธีการผลิตโดยวิธี cold ethanol protein precipitation ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kistler และ Nitschmann (1962) ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือ ได้เซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าขนาดบรรจุ 5 ลบ.ซม. ครั้งละ 261, 291, 320 และ 284 ขวด ตามลำดับ ซึ่งมี titer ของ rabies antibody เฉลี่ยประมาณ 150 ยูนิต/ลบ.ซม. สามารถแยก immunoglobulins ออกมาได้ เฉลี่ยประมาณ 5.62 กรัมต่อพลาสมา 1 ลิตร ซึ่งมี purity ของ IgG ประมาณ 97-98%, เซรุ่มที่ได้มี stability ดี นอกจากนั้น ได้ผ่านการตรวจสอบมาตรฐานอย่างอื่น ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีการผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในบ้านเรา ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงจันทพงษ์ วะสี ที่ได้กรุณาช่วยตรวจสอบยืนยันเกี่ยวกับ potency, HBsAg และ anti-HIV ในการผลิตเซรุ่มนี้

อ้างอิง

1. Cohn EJ, Strong LE, Hughes Jr. WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J Am Chem Soc 1946; 68:459-75
2. Cohn EJ. The history of plasma fractionation. In: Andrus EC, Bronk DW, Carden GA, eds. Advance in Mulitary medicine. Boston : Little, Brown, 1948.
3. Cohn EJ. A system for the separation of the components of human blood. Quantitation procedures for the separation of the protein components of human plasma. J Am Chem Soc 1950; 72:465-74
4. Hink JH, Jr, Hildago J, Seeberg VP. Johnson FF. Preparation and properties of a heat-treated human plasma protein fraction. Vox Sang 1957; 2:174-8
5. Kistler P, Nitschmann HH. Large scale production of human plasma fractionation. Vox Sang 1962; Jul-Aug; 7:414-24
6. Oncley JL, Melin M, Richert DA, Cameron JW, Cross PM, Jr. The separation of the antibodies, isoagglutinine, prothrombin, plasminogen and B1-lipoprotein into sub-fraction of human plasma. J Am Chem Soc 1949; 71:541-50
7. Bjorling H. Plasma fractionation methods used in Sweden. Vox Sang 1972 Jul-Aug; 23:18-25
8. Fontez Mme. Blood Transfusion Centre. Montpellier, France. (Personnel communication).
9. World Health Organization. The collection, fractionation, quality control, and uses of blood and blood products. Geneva: World Health Organization, 1981.
10. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull WHO; 1973; 48 Suppl : 525-41
11. United States Pharmacopeia Convention. U.S. Pharmacopeia National Formulary. XXI, January 1.1985.