

บทที่ 10 ภาคผนวก**1. เอกสารหมายเลข 1:**

แบบฟอร์มขอรับการรับรองการทำวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง
เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล



ANIMAL CARE AND USE PROTOCOL
Mahidol University Animal Care and Use Committee (MU-ACUC)

COVER SHEET

Protocol No. :	This section will be filled by the MU- ACUC only
Received by MU-ACUC :	
Approved/disapproved by MU-ACUC :	
Expiration Date :	

1. Protocol title:

การทดสอบความเป็นพิษของ tetrodotoxin ในหนูทดลองด้วยวิธี mouse bioassay และการทดสอบการบลั่งพิษของ tetrodotoxin โดยแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลในหนูทดลอง

2. Principal investigator: ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

Position: ศาสตราจารย์ **Department:** ประสาทวิทยา
Faculty/Institute คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
Tel. 02-4196497; 081 8153917 **Fax:** 02-4196491 **E-mail:** tmwcc@mahidol.ac.th

3. Co-investigator:

3.1 น.ส. มนต์รัตน์ จุลเนตร

Position: นักศึกษาปริญญาเอก **Department** วิทยาภูมิคุ้มกัน
Faculty/Institute คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
Tel. 089-6794864 **Fax.** 02-4196491 **E-mail** monchu82@gmail.com

3.2 ดร. (นาย) นิทัศน์ สุขรุ่ง

Position: อาจารย์ **Department** สถานส่งเสริมการวิจัย
Faculty/Institute คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
Tel. 081 6648287 **Fax.** 02-4196491 **E-mail** sinsru@mahidol.ac.th

3.3 ผศ. ดร. (นางสาว) พจณี ศรีมานะ

Position: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ **Department** โครงการบัณฑิตศึกษา
Faculty/Institute คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Tel. 087 0800731 **Fax.** 02-5165379 **E-mail** srmanote_p@y7mail.com

3.4 ดร. (นาง) ยุพร สากลวารี

Position: นักวิจัยหลังปริญญาเอก **Department** ประสาทวิทยา
Faculty/Institute คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
Tel. 02-4196497 **Fax:** 02-4196491 **E-mail:** jub922@yahoo.com

3.5 ดร. (นางสาว) นิตยา อินทรวัฒนา

Position: อาจารย์ **Department** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและอิมมิวโนโลยี
Faculty/Institute คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
Tel. 081 2070740 **Fax:** 02-6435583 **E-mail:** tmniw@mahidol.ac.th

3.7 รศ. ดร. (นาย) มนัส จงสงวน

Position: รองศาสตราจารย์ **Department** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและอิมมิวโนโลยี
Faculty/Institute คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
Tel. 081 4358727 **Fax:** 02-6435583 **E-mail:** tmmcs@mahidol.ac.th

4. Anticipated project period: กันยายน 2552 - ธันวาคม 2553**5. Source of funding(s): (if applicable)** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ**6. Principal investigator :** Professor Dr. Wanpen Chaicumpa

(Signature)

(Date)

Co- investigator : Dr. Monrat Chulanetr

(Signature)

(Date)

Co- investigator : Dr. Nitat Sookrung

(Signature)

(Date)

Co- investigator : Assistant Professor Dr. Potjanee Srimanote

(Signature)

(Date)

Co- investigator : Dr. Yuwaporn Sakolvaree

(Signature)

(Date)

Co- investigator : Dr. Nitaya Indrawattana

(Signature)

(Date)

Co- investigator : Assoc. Prof. Dr. Manas Chongsa-nguan

(Signature)

(Date)

Attending Veterinarian : 1) Dr. Monrat Chulanetr

(Signature)

(Date)

2) Professor Dr. Wanpen Chaicumpa

(Signature)

(Date)

Head of Department : Associate Professor Dr. Darawan Wanacheewanawin

(Signature)

(Date)

Faculty/Institute: Department of Parasitology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol
University

7. Approval

MU-ACUC Review :

Approved Approval recommended Disapproved

(Chair, MU-ACUC Signature)

(Date)

BODY OF PROTOCOL

1. Non-technical summary: (Provide a brief description of the project expressing its significance and needs for undertaking the study).

การศึกษานี้แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาถึงการกระจายตัวและความเป็นพิษของสารพิษจากปลาปักเป้า คือ tetrodotoxin และอนุพันธ์ของสารพิษชนิดนี้ในปลาทะเลที่จับได้จากแหล่งน้ำทะเลไทยทั้งอ่าวไทยและอันดามัน โดยทำการสกัดสารพิษจากอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าแล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นด้วยวิธี mouse bioassay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบความเป็นพิษของ tetrodotoxin เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่มีความเป็นพิษสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของสารพิษด้วยวิธี LC-MS/MS รวมถึงการแยกสารพิษในสารสกัดจากปลาปักเป้าด้วยวิธีการ HPLC เพื่อนำสารพิษที่แยกได้ไปใช้ในการคัดเลือกแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาล จากคลังแบคทีเรียโอฟาจหรือเรียกย่อๆ ว่า คลังฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อ tetrodotoxin ต่อไป

ในการศึกษาส่วนที่สอง โคลนของฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อ tetrodotoxin ที่คัดเลือกมานี้จะถูกนำไปใส่ในแบคทีเรียและเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่จำเพาะต่อ tetrodotoxin หลังจากแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนด้วยโปรตีนของแบคทีเรียแล้ว นำแอนติบอดีไปทดสอบความสามารถในการลบล้างความเป็นพิษของสารพิษ tetrodotoxin ของปลาปักเป้าต่อไป โดยเริ่มการศึกษาการลบล้างความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง จากนั้นแอนติบอดีที่สามารถลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin ได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง จะถูกนำไปศึกษาความสามารถในการลบล้างความเป็นพิษในหนูทดลองต่อไป

2. Rationale and literature review:

สารพิษ tetrodotoxin เป็นสารพิษที่เมื่อคนได้รับเข้าไป (ส่วนใหญ่จากการกินเนื้อปลาปักเป้าที่มีสารพิษสะสมอยู่) ก็จะทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยแบบอาการชา กล้ามเนื้ออ่อนเปลี้ย ที่อาจรุนแรงถึงเป็นอัมพาต สารพิษชนิดนี้ถูกพบเป็นครั้งแรกในปลาปักเป้า และหลังจากนั้นได้มีรายงานการพบ tetrodotoxin ในสัตว์อื่นอีกหลายชนิด สารพิษ tetrodotoxin ทำให้เกิดความเป็นพิษโดยไปจับและปิด sodium ion channel ที่บริเวณภายนอกของผิวเซลล์ ส่งผลให้ Na^+ ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ เกิดการขัดขวางการเกิด action potential ในช่วง depolarization เซลล์ที่มีความไว (susceptible) ต่อสารพิษชนิดนี้มากที่สุดคือเซลล์ประสาทและเซลล์กล้ามเนื้อ ผู้ที่ได้รับสารพิษจึงมีอาการแสดงที่เกี่ยวข้องกับระบบดังกล่าว ความรุนแรงของการได้รับสารพิษสามารถแบ่งเป็น 4 ระดับ โดยระดับความรุนแรงของอาการเป็นพิษขึ้นอยู่กับปริมาณของสารพิษที่ได้รับ (ตารางที่ 1)

ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ tetrodotoxin ส่วนมากอยู่ในเอเชียโดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และแอฟริกาใต้เส้นศูนย์สูตร นอกจากนี้ก็เริ่มมีรายงานความเป็นพิษของสารพิษชนิดนี้ในทวีปยุโรปบ้างประปราย การที่ผู้ป่วยได้รับสารพิษ tetrodotoxin มักเกิดจากการบริโภคอาหารที่เตรียมจากปลาปักเป้าและไข่แมงดาทะเล ในปัจจุบันนี้ยังไม่มี antidote สำหรับสารพิษ tetrodotoxin การรักษาทำโดยรักษาตามอาการที่เกิดขึ้นและการประคับประคองเช่นให้เครื่องช่วยหายใจ ให้สารน้ำเพื่อเร่งการขับถ่ายสารพิษออกทางไต เป็นต้น

เนื่องจากในขณะนี้ข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษของปลาปักเป้าแต่ละสปีชีส์ที่จับได้จากทะเลไทยยังมีอยู่น้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดของพิษในระดับอนุพันธ์ต่างๆ และชนิดของปลาที่มีสารพิษอนุพันธ์นั้นๆ รวมทั้งยังไม่มี antidote ที่สามารถยับยั้งพิษของ tetrodotoxin และอนุพันธ์ได้โดยตรง คณะผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาหาการกระจายตัวของสารพิษ tetrodotoxin และอนุพันธ์ในปลาทะเลที่จับได้ในทะเลไทย และพัฒนาแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่จับจำเพาะต่อ tetrodotoxin และสามารถลบล้างความเป็นพิษของ

tetrodotoxin และอนุพันธ์ จากคลังฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์ ทั้งนี้ในการตรวจกรองว่าปลาชนิดใด และเนื้อเยื่อใดของปลา มีสารพิษ tetrodotoxin และอนุพันธ์อยู่บ้างนั้น จำเป็นต้องใช้วิธีมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปคือวิธี mouse bioassay ส่วนการศึกษาลักษณะเฉพาะของ tetrodotoxin และอนุพันธ์ในระดับโมเลกุลจะใช้วิธี HPLC และ/หรือ LC-MS/MS การคำนวณปริมาณสารพิษในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาด้วยวิธี mouse bioassay นั้นจะคิดเป็น mouse units (MU) โดยที่ 1 MU คือปริมาณสารพิษที่ทำให้หนูทดลองน้ำหนักประมาณ 20 กรัมตายในระยะเวลา 30 นาที โดยปริมาณสารพิษ tetrodotoxin ที่น้อยที่สุดที่สามารถวัดด้วยวิธีนี้ได้คือ 0.2 µg (1 MU)

ส่วนการทดสอบการกลบล้างพิษนั้นเมื่อได้แอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่จับจำเพาะต่อ tetrodotoxin จากการทดสอบด้วยวิธีทางวิทยามีคุ้มกันแล้วและผ่านการทดสอบการกลบล้างความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงแล้วจะสามารถกลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin ได้ จึงจะนำไปทำการทดสอบในหนูทดลองต่อไป ทั้งนี้เพื่อใช้หนูทดลองน้อยที่สุดเท่าที่จะสามารถหลีกเลี่ยงการใช้ได้

ตารางที่ 1 ระดับความรุนแรงของการได้รับสารพิษ tetrodotoxin และอาการของผู้ที่ได้รับพิษ

ระดับความรุนแรง	อาการอาการของผู้ที่ได้รับพิษ	ระยะเวลาที่เริ่มมีอาการ
ระดับ 1	ชาบริเวณรอบปาก โดยอาจมีหรือไม่มีอาการทางระบบทางเดินอาหาร (มีอาการคลื่นไส้เป็นส่วนใหญ่)	5-45 นาที
ระดับ 2	มีอาการชาบริเวณลิ้นและใบหน้า หรือส่วนอื่นๆของร่างกาย มีอาการอัมพาตของระบบสั่งการเคลื่อนไหวขั้นต้น (early motor paralysis) และ incoordination slurred speech มีการตอบสนองเป็นปกติ (normal reflex)	10-60 นาที
ระดับ 3	มีอาการอัมพาตแบบอ่อนแรงทั่วร่างกาย ระบบหายใจล้มเหลว ไม่สามารถพูดได้ ม่านตาขยายหรือไม่ตอบสนอง ผู้ป่วยยังคงมีสติ	15 นาที - หลายชั่วโมง
ระดับ 4	ระบบหายใจล้มเหลวและขาดออกซิเจนขั้นรุนแรง ความดันโลหิตต่ำ หัวใจเต้นช้า หรือการเต้นของหัวใจผิดปกติ (cardiac dysrhythmias) อาจมีอาการหมดสติได้	15 นาที – 24 ชั่วโมง

References

1. Ahasan HAMN, Mamum AA, Karim SR, Bakar MA, Gazi EA, Bala CS. Paralytic complication of puffer fish (Tetrodotoxin) poisoning. *Singapore Med J* 2004; 45(2): 73-74.
2. Brillantes S, Samosorn W, Faknoi S, Oshima Y. Toxicity of puffers landed and marketed in Thailand. *Fisheries Science* 2003; 69: 1224-1230.
3. Chowdhury FR, Nazmul AHAM, Mamunur RAKM, Al MA, Khaliduzzaman SM. Tetrodotoxin poisoning: a clinical analysis, role of neostigmine and short-term outcome of 53 cases. *Singapore Med J* 2007; 48(9): 830-833.
3. Diener M, Christian B, Ahmed MS, Luckas B. Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu oblongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 1997-2002.
5. Fernández-Ortega JF, Morales-de los Santos JM, Herrera-Gutiérrez ME, Fernández-Sánchez V, Loureo PR, Rancano AA, Téllez-Andrade A. Seafood intoxication by tetrodotoxin: first case in Europe. *J Emerg Med* 2009 (in press).

6. Horie M, Kobayashi S, Shimizu N, Nakazawa H. Determination of tetrodotoxin in puffer-fish by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 2002; 127: 755-759.
7. Isbister GK, Son J, Wang F, Maclean CJ, Lin CS, Ujma J, Balit CR, Smith B, Milder DG, Kiernan MC. Puffer fish poisoning: a potentially life-threatening condition. *MJA* 2002; 177: 650-653.
8. Kanchanapongkul J. Tetrodotoxin poisoning following ingestion of the toxic eggs of the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda*, a case series from 1994 through 2006. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008; 39(2): 303-306.
9. Keisuke M and Tamao N. Distribution and origin of tetrodotoxin. *Toxin reviews* 2001; 20(1): 11-33.
10. Klsbister G, Kiernan MC. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol* 2005; 4: 219-228.
11. Sobel J, Painter J. Illness caused by marine toxins. *CID* 2005; 41: 1290-1296.
12. Noguchi T Mahmud Y. Current methodologies for detection of tetrodotoxin. *Toxin Reviews* 2001; 20(1): 35-50.
13. Treveet AJ, Mavo B, Warrell DA. Tetrodotoxic poisoning from ingestion of a porcupine fish (*Diodon hystrix*) in Papua new guinea: nerve conduction studies. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56(1): 30-32.
14. Yasumoto T, Yotsu M, Endo A, Murata M, Naoki H. Interspecies distribution and biogenetic origin of tetrodotoxin and its derivatives. *Pure Appl Chem* 1989; 61(3): 505-508.

3. Objective(s): (Provide goal/specific aim of this project)

1. เพื่อศึกษาถึงการกระจายตัวและความเป็นพิษของสารพิษจากปลาปักเป้า คือ tetrodotoxin และอนุพันธ์ของสารพิษชนิดนี้ ในปลาปักเป้าทะเลที่จับได้จากแหล่งน้ำทะเลไทยทั้งอ่าวไทยและอันดามัน

2. ผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถกลบล้างพิษของสารพิษ tetrodotoxin จากปลาปักเป้า ด้วยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ สำหรับการนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้รักษาผู้ที่ได้รับพิษ tetrodotoxin ต่อไป

4. Experimental design: (Provide a detail of experimental design addressing a hypothesis.)

ตัวอย่างปลาปักเป้าและการเตรียมสารสกัดจากปลาปักเป้า

ตัวอย่างปลาปักเป้าจะได้อาจมาจากการซื้อจากชาวประมงในจังหวัดต่างๆที่จับปลาปักเป้าจากทะเลอ่าวไทยและอันดามัน เช่นชลบุรี ตรัง สมุทรสาคร โดยได้รับมาเป็นตัวอย่างปลาที่ตายแล้วและแช่ในน้ำแข็ง

การเตรียมสารสกัดจากปลาปักเป้าทำโดยชำแหละและแยกอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้า ได้แก่ ตับ อวัยวะสืบพันธุ์ กระเพาะและทางเดินอาหาร หัว และ กล้ามเนื้อ แล้วนำไปบด จากนั้นสกัดสารพิษ โดยเติม 0.1% acetic acid ในปริมาณที่เท่ากัน (w/v) แล้วนำไปต้มโดยใช้ water bath ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสจะถูกเก็บและนำไปตรวจกรองว่ามีพิษหรือไม่ต่อไป ส่วนสารละลายที่ใช้ในกลุ่มควบคุมลงนั้นใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเนื้อปลาปักเป้า ในทุกขั้นตอนของการเตรียมสารสกัดจากปลาปักเป้าใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การตรวจกรองความเป็นพิษของสารสกัดจากปลาปักเป้าโดยวิธี mouse bioassay

นำสารสกัดจากปลาปักเป้าที่ได้ข้างต้นปริมาตร 0.4-0.5 มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนูไมซ์ outbred ICR เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 20 กรัม สังเกตอาการแสดงออกต่างๆ

ของหนูทดลองหลังฉีดสารพิษจนกระทั่งตาย ได้แก่พฤติกรรมทั่วไป ลักษณะการเคลื่อนไหว รูปแบบการหายใจ โดยอาการของหนูทดลองเมื่อได้รับสารพิษ tetrodotoxin ได้แก่ ใช้ขาถูบริเวณรอบจมูกและปาก ในการเคลื่อนไหวจะพบว่าสองขาหลังอ่อนแรงหรือเป็นอัมพาต การเคลื่อนไหวของขาไม่สัมพันธ์กัน หายใจถี่ขึ้น ถี่และเร็ว ชักและ/หรือกระตุก ระบบหายใจล้มเหลว และตายในที่สุด ความรุนแรงของอาการในหนูทดลองจะแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณสารพิษที่มีอยู่ในสารสกัดจากปลาปักเป้า ในกรณีที่หนูทดลองไม่ตาย จะสังเกตว่ามีความผิดปกติที่ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ตามปกติเกิดขึ้นหรือไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองในการกินอาหารหรือน้ำได้ เป็นต้น

คณะผู้วิจัยจะให้หนูทดลองที่ซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติปรับตัวในสภาพการเลี้ยงที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลก่อนการทำการทดลอง 2 วัน ในช่วงเวลานั้นจะมีการตรวจดูพฤติกรรม อณูภูมิร่างกายของหนูทดลอง น้ำหนักตัว ก่อนเริ่มดำเนินการทดลอง ด้วยการฉีดสารสกัดจากปลาปักเป้าเข้าในช่องท้องโดยใช้ เข็มเบอร์ 26 หลังฉีดสารสกัดจากปลาปักเป้าแล้วสังเกตอาการจากการได้รับสารพิษเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 3 ชั่วโมง และหลังจากนั้นหากหนูทดลองไม่ตายจะตรวจดูอาการทุกชั่วโมงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วติดตามอาการของหนูทดลองต่อเนื่องทุกวันในช่วงเช้าและเย็น เพิ่มเติมจากการตรวจสุขภาพสัตว์ปกติประจำวัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลในการลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin ในสารสกัดจากปลาปักเป้า

แอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ถูก transfected ด้วย phagemid vector ที่ carry gene ที่เป็นรหัสของแอนติบอดีของมนุษย์ที่ดิสเพลย์บนอนุภาคของฟาจและจับจำเพาะกับ tetrodotoxin และมีความสามารถในการลบล้างความเป็นพิษได้จากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง จะถูกนำไปทดสอบการลบล้างความเป็นพิษจาก tetrodotoxin ในหนูทดลอง และเนื่องจากโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่นำมาใช้นั้นเป็น recombinant protein ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. coli* ดังนั้นก่อนที่จะนำมาทดสอบการลบล้างความเป็นพิษจึงจะทำการกำจัด endotoxin ออกจากแอนติบอดีก่อนที่จะนำไปทดสอบ

การทดสอบการลบล้างความเป็นพิษทำโดยนำสารพิษที่สกัดจากปลาปักเป้าที่ทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการ HPLC และสารพิษมาตรฐานไปบ่มกับแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่เตรียมไว้จากนั้นจึงฉีดสารพิษที่บ่มกับแอนติบอดีเข้าช่องท้องของหนูทดลองแล้วสังเกตอาการแสดงของการได้รับพิษ เช่นเดียวกับการทดสอบความเป็นพิษจากสารสกัดจากปลาปักเป้า

5. Data analysis and statistical method: แอนติบอดีที่ต้องการจะต้องสามารถป้องกันไม่ให้หนูทดลองเกิดอาการผิดปกติใดๆ เมื่อนำแอนติบอดีนั้นๆ ไปผสมกับ tetrodotoxin แล้วฉีดเข้าช่องท้องของหนูทดลองเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับสารพิษปริมาณเท่ากันผสมกับบัฟเฟอร์

6. Animal model and species justification:

6.1 Description of animals

Common name	Species	Strain/ Stock	Age	Weight (grams)	Sex	Number
Mice	<i>Mus musculus</i>	ICR	4-6 weeks	20-22	male	100*
Puffer fish	Various genera and species	NA	NA	-	-	50*

*จำนวนน้อยที่สุดที่จะใช้

Special consideration: (List specialized requirements for the research animals, e.g. certain antibody or virus free, *Pasteurella* free, etc.): Conventional

Source/Vendor: หนูทดลองจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ และปลาปักเป้าจากอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

6.2 Scientific justification for animal species and number requested

6.2.1 Explain why the proposed species is/are the most appropriate.

การที่เลือกสัตว์สารพิษ tetrodotoxin จากปลาปักเป้าเนื่องมาจากรายงานผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ tetrodotoxin ส่วนมากเกิดจากการบริโภคปลาปักเป้า นอกจากนี้ข้อมูลในด้านความเป็นพิษของปลาปักเป้าแต่ละสปีชีส์ที่จับได้ในประเทศไทยนั้นยังไม่สมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาถึงการกระจายตัวของสารพิษ tetrodotoxin จากปลาปักเป้าที่จับได้ในน่านน้ำทะเลไทยเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อไป

ในด้านของการทดสอบสารพิษนั้นสาเหตุที่เลือกใช้หนูทดลองเป็นหนูไมซ์เพื่อทดสอบสารพิษเนื่องจากเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบสารพิษ tetrodotoxin และมีการศึกษาความเป็นพิษของหนูพันธุ์ ICR ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ จึงมีข้อมูลเบื้องต้นในด้านความเป็นพิษในหนูสายพันธุ์นี้อยู่ในวารสารนานาชาติ จึงเหมาะที่จะใช้หนูสายพันธุ์ ICR เพื่อทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของ tetrodotoxin

6.2.2 Provide an explanation or statistical analysis on the number of animals to be used.

จำนวนหนูทดลองที่จะใช้ในการทดสอบความเป็นพิษจะขึ้นกับจำนวนปลาปักเป้าที่จัดหามาได้ สารสกัดแต่ละตัวอย่างจะใช้หนูทดลอง 2 ตัวเพื่อ screen หว่ามีพิษหรือไม่ ส่วนจำนวนหนูทดลองที่จะใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการลบล้างความเป็นพิษของสารพิษ tetrodotoxin จะใช้จำนวน 5 ตัวต่อการทดสอบหนึ่งครั้งเพื่อให้เห็นนัยสำคัญทางสถิติ

7. Animal care:

7.1 Husbandry consideration: (Briefly describe animal housing and living conditions, routine animal observations, feed and water provisions, etc).

7.1.1 Study location: (Animal house)

ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาปรสิตวิทยา ชั้น 7 ตึกอศุลยเดชวิกรม คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

7.1.2 Housing system:

- ☒ Clean conventional ☐ Strict hygienic conventional
☐ Isolator maintained ☐ Barrier maintained
☐ Other, please specify

7.1.3 Housing

- ☒ Laminar flow ☐ Environmental chamber ☐ Isolator
☐ Other, please specify

7.1.4 Caging:

- ☒ Solid bottom, open top ☐ Static filtered top cages
☐ Suspended cages, wire bottom ☐ Metabolic cages
☐ Individual ventilated cage (IVC)
☐ Other, please specify

7.1.5 Cage size (W x L x H) ...25×30×20 cm...(Shoe box type).....

7.1.6 Caging materials

- ☒ Plastic ☐ Stainless steel
☐ Other, please specify

7.1.7 Number of animals per cage ...5.....

7.1.8 Environmental requirements:

Temperature:23 ± 2...°C.....

Humidity:60 ± 2 %.....

Light: ☒ Standard fluorescent
☐ Other, please specify

Light cycle: ☒ Standard 12:12 (light:dark)
☐ Other, please specify

7.1.9 Food:

Type of food: ☒ Standard diet ☐ Other, please specify

Feeding schedule:

- ☒ Routine feeding (*Ad libitum*)
☐ Other, please specify

7.1.10 Water:

Type of water: ☐ Hyperchlorinated ppm.
☐ Acidified, pH
☒ Other, please specify ...Filtered Tap water.....

Provision of water:

- ☒ Routine feeding (*Ad libitum*)
☐ Other, please specify

7.1.11 Bedding or litters:

☐ No☒ Yes , please specify ☒ Sterile ☐ Non-sterile

Type of bedding or litters:

- ☒ Wood shaving ☐ Sawdust
☐ Paper ☐ Other, please specify

Schedule of bedding changing:

- ☒ Weekly ☐ At specified interval, everyday(s)

7.2 Attending veterinary care: (Describe the routine veterinary care. List the criteria used for health evaluation while the animals are on study).

มีการดูแลและสุขภาพสัตว์โดยตรวจดูสภาพภายนอก การกินอาหารและน้ำ พฤติกรรมทั่วไปทุกวัน โดยเมื่อดูจากสภาพภายนอกแล้วหนูทดลองจะต้องมีขนเรียบ ไม่ฟู ไม่มีแผลหรือความผิดปกติเมื่อมองจากภายนอก ไม่มีคราบน้ำตา (ocular discharge) หรือสารคัดหลั่งไหลออกมาทางจมูก (nasal discharge) หนูกินอาหารและน้ำได้ตามปกติ ไม่ซึมหรือชุกตัวอยู่ตัวเดียวตามมุมกรง การเคลื่อนไหวเป็นปกติ หนูที่ถูกสงสัยว่ามีอาการป่วยจะถูกแยกออกมาเลี้ยงตัวเดียวเพื่อสังเกตอาการ และ/หรือทำการรักษาเบื้องต้นต่อไป

8. Animal welfare:

8.1 Does the proposed research duplicate any previous work?

☐ Yes ☒ No

☐ Literature search is attached ☒ Literature search was conducted on

ในส่วนของการสกัดและทดสอบสารสกัดจากปลาปักเป้าว่ามีความเป็นพิษหรือไม่ มีงานวิจัยบางส่วนได้ทำแล้วและรายงานไว้ในวารสารวิชาการนานาชาติ แต่การศึกษากการกระจายตัวของสารพิษในปลาปักเป้าที่จับได้ในน่านน้ำทะเลไทยนั้นข้อมูลในด้านความเป็นพิษของปลาปักเป้าแต่ละสปีชีส์ที่จับได้ยังไม่สมบูรณ์ และมีข้อสันนิษฐานว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงถิ่นที่อยู่ของปลาเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศ จากภาวะโลกร้อน จึงสมควรมีการศึกษาโดยละเอียด

ส่วนการลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin โดยแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่เตรียมจากคลังฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์นั้นยังไม่มีงานวิจัยถูกตีพิมพ์มาก่อนหน้านี้ งานวิจัยเกี่ยวกับสารพิษจากปลาปักเป้าส่วนมากจะมุ่งเน้นไปยังการหาวิธีการตรวจสอบสารพิษชนิดนี้ด้วยวิธีต่างๆ เช่น ELISA หรือ LC-MS/MS

☒ Database used are

Pubmed

If yes, explain why it is scientifically necessary to duplicate the experiment.

8.2 Replacement, reduction and refinement

8.2.1 Replacement of animals (e.g., with *in vitro* models, computer models or less sentient animals):

ในการลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin โดยแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลนั้นจะผ่านการทดสอบการลบล้างความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง (Neuroblastoma cell line) เสียก่อนและเลือกเฉพาะแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพในการลบล้างความเป็นพิษ เพื่อไปทดสอบการลบล้างความเป็นพิษในหนูทดลอง เพื่อการใช้หนูทดลองให้เหลือน้อยที่สุดเฉพาะที่จำเป็นเท่านั้น

8.2.2 Reduction in the number of animals (e.g., using appropriate statistical methods in the design and analysis of the study; reduction in experimental variability by using animals of defined genetic or microbiological status.):

ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากปลาปักเป้านั้น การวัดความเป็นพิษของ tetrodotoxin เป็นหน่วย MU จะอ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ทำให้ไม่ต้องทดสอบการฉีดสารพิษมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้กับหนูทดลองเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างระยะเวลาที่หนูทดลองตายกับความเข้มข้น (ปริมาณ) ของสารพิษ จึงสามารถลดจำนวนของหนูทดลองที่จะใช้ในส่วนนี้ไปได้มาก

8.2.3 Refinement of experimental procedures to minimize pain or distress (e.g., early endpoints; use of analgesics, anesthetics or sedatives; techniques that reduce stress in the animal):

Nil

8.3 Potential animal pain and distress assessment:

8.3.1 During the study:

1) How often will the clinical condition of animals be monitored?

ทั้งการทดสอบความเป็นพิษ และการทดสอบความสามารถในการลบล้างความเป็นพิษใช้เวลาสังเกต

อาการของสัตว์หลังจากฉีดสารพิษ หรือสารพิษที่ถูกกลบฝังความเป็นพิษด้วยโมโนโคลนาลแอนติบอดีโดยเริ่มจากสังเกตอาการแสดงของการได้รับสารพิษเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 3 ชั่วโมงหลังจากการฉีด และหลังจากนั้นจะตรวจดูอาการทุกชั่วโมง เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วติดตามอาการของหนูทดลองต่อเนื่องทุกวันในช่วงเช้าและเย็นเพิ่มเติมจากการตรวจสุขภาพสัตว์ปกติประจำวัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

2) Who will monitor the clinical condition of the animals?

การสังเกตอาการของสัตว์ทดลองทำโดย Co-investigator คือ สัตวแพทย์หญิง (นางสาว) มนต์รัตน์ จุลเนตร ผู้ร่วมวิจัย โดยมี สัตวแพทย์หญิง ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา หัวหน้าโครงการ เป็นผู้ให้คำปรึกษา

8.3.2 Are the animals expected to experience any specific study-induced or related problems (i.e. health problems, pain, distress, complications, etc.) or any health problems as a result of the phenotype of the animal?

☒ Yes ☐ No If yes, please answer the following questions:

1) Describe the expected problems อาจมีหนูบางตัวที่แสดงอาการเป็นอัมพาตภายหลังการทดสอบความเป็นพิษในสารสกัดจากปลาปักเป้าในกรณีที่สารสกัดนั้นมีความเป็นพิษในปริมาณน้อยกว่า lethal dose

2) What criteria(s) will be used to assess pain, distress, or discomfort?

Check all that apply:

- ☐ Inactivity
- ☐ Loss of appetite
- ☐ Loss of weight ☐ 5% ☐ 10 % ☐ 15% ☐ 20% weight loss
- ☐ Restlessness
- ☐ Abnormal resting postures, somnolence or hunched posture
- ☐ Licking, biting, scratching, or shaking a particular area
- ☒ Failure to show normal patterns of inquisitiveness
- ☐ Failure to groom, causing unkempt appearance
- ☐ Guarding (protecting the painful area)
- ☒ Loss of mobility
- ☐ Red stain around the eyes of rats
- ☒ Self-mutilation
- ☐ Labored breathing
- ☐ Unresponsiveness
- ☐ Other (please list)

8.4 Anesthesia

☐ Yes ☒ No

If yes, please answer the following questions:

- 1) Preanesthetic preparation :
- 2) Type of anesthesia used :
- 3) Dose :
- 4) Route of administration :

- 5) Frequency of anesthesia :
- 6) Length of anesthesia :
- 7) Who is responsible for maintaining anesthesia? :
- 8) If inhalation anesthetics are used, describe the system for scavenging waste anesthetics gas.....
- 9) What criteria(s) will be used to assess level of anesthesia?

Check all that apply:

- | | | |
|---|---|--|
| ☐ Respiration rate | ☐ Body temperature | ☐ Heart rate |
| ☐ ECG | ☐ Toe pinch | ☐ Tail pinch |
| ☐ Corneal reflex | ☐ Pedal reflex | ☐ Muscular relaxation |
| ☐ Color of mucous membrane | | |
| ☐ Other (pulse oximeter, respirometer) please list | | |

- 10) How animals are kept warm?

8.5 Analgesics and/or tranquilizers:

- ☐ Yes ☒ No

If yes, please specify

- 1) Type of analgesics used
- 2) Dose
- 3) Route of administration

8.6 Describe post-anesthetic treatment or intervention:

9. Surgery:

- ☒ Yes ☐ No

If yes, please answer the followings:

9.1 Surgical procedure is:

- ☒ Non-survival ☐ Survival
- ☐ Major ☐ Minor
- ☐ One time ☐ Multiple

9.2 Location: Give the location/room number for the proposed surgical procedure.

ห้องสัตว์ทดลอง ชั้น 7 ตึกอศุลยเวชวิกรม คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

9.3 Surgeon/qualification: Indicate who will perform the surgery, and his/her qualifications, training, or experience in the proposed procedure.

ผู้ทำการผ่าตัดได้แก่ co-investigator คือ น.ส. มนต์รัตน์ จุลเนตร ซึ่งจบการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม) มีความรู้ทางกายวิภาคของสัตว์และการใช้อุปกรณ์ผ่าตัดรวมถึงการเก็บตัวอย่างอวัยวะ

9.4 Procedure: Describe in detail the surgical procedure

หลังจากที่ฉีดยาสกัดจากปลาปักเป้าให้หนูทดลองและสารสกัดจากปลาปักเป้านั้นมีความเป็นพิษที่สามารถทำให้หนูทดลองตายแล้ว จะทำการผ่าเปิดช่องอกและช่องท้องของหนูทดลองที่ตายเพื่อเก็บตัวอย่างเลือด และอวัยวะได้แก่ ปอด หัวใจ ตับ ม้าม ทางเดินอาหาร และกระบังลม และเก็บตัวอย่างของระบบประสาทของหนูทดลองได้แก่ สมอง ไขสันหลัง และเส้นประสาท sciatic โดยเก็บตัวอย่างลงใน 10% formaldehyde โดยอาจนำชิ้นเนื้อที่เก็บไปศึกษาเพิ่มเติมถึงการกระจายของสารพิษในหนูทดลองต่อไป

9.5 Pre- and post-operative provision: Detail the provision for both pre-and post-operative care, including provisions for post-surgical observation.

การผ่าตัดจะทำการขึ้นภายหลังจากที่หนูทดลองตายจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากปลาปักเป้า โดยเงื่อนไขก่อนหน้าการผ่าตัดเหมือนเงื่อนไขการประเมินสุขภาพสัตว์ก่อนทดสอบสารพิษ

9.6 Describe long-term care of chronic survival procedure. -

9.7 Multiple survival surgery procedures: Multiple major operative procedures on the same animal must be adequately justified for scientific reasons by the principal investigator in writing.

9.7.1 Procedure: -

9.7.2 Scientific justification: -

10. Blood or body fluid withdrawal/tissue collection/injections, tail clip, gavage

Describe in detail : method(s), needle size(s), volume(s) collected or administered, and frequency of collection or injection.

	Anatomic location	Needle size/ catheter size and length	Biopsy size	Volume collected (ml)	Volume administered (ml)	Frequency (times per day)
Blood withdrawal						
Body Fluid withdrawal						
* Tissue collection	*	-	*	*	-	once
Injection/ Infusion	i.p.	No. 26	-	-	0.4-0.5 ml	once
Tail clip						
Gavaging						
Other						

* Please see item 9.4

Total blood volume ml. in total study days or months

11. Restraint with mechanical devices:

☐ Yes ☒ No

If yes, describe device, duration of restraint, frequency of observation, conditioning procedures and steps to assure comfort and well-being.

-

If prolonged restraint is used, must provide justification:

-

12. Project involving food and water deprivation or dietary manipulation:

☐ Yes ☒ No

If yes, describe methodology. State objective criteria used to assess physical condition and pain,

discomfort, stress, and distress during the course of study. Include clinical signs or manifestations expected from the procedure. What criteria will be used to determine a humane endpoint before severe morbidity and death?

☐ Individual animal's weight is monitored every days.

☐ Individual animal's weight is not monitored.

	Amount restricted/added	Duration	Compound supplemented	Compound deleted	Frequency
Food restriction					
Fluid restriction					
Nutrient alterations					

13. Tumor and disease models, toxicity testing:

☒ Yes ☐ No

If yes, describe methodology used for tumor/disease and/or toxicity testing. State objective criteria used to assess physical condition and pain, discomfort, stress, and distress during the course of study, including clinical signs or manifestations expected from the procedure. What criteria will be used to determine a humane endpoint before severe morbidity and death?

ทั้งการทดสอบความเป็นพิษ และการทดสอบความสามารถในการปล้ำงความเป็นพิษทำโดยนำสารสกัดจากปลาปักเป้าที่ได้ข้างต้นปริมาตร 0.4-0.5 มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal; i.p.) ของหนู ICR เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 20 กรัม เก็บข้อมูลระยะเวลาตั้งแต่หลังฉีดสารพิษจนกระทั่งหนูทดลองตาย และสังเกตอาการแสดงของหนูทดลองหลังจากการฉีดสารพิษจนกระทั่งตาย การสังเกตอาการหลังได้รับสารพิษเป็นช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ ระยะเวลาต่อเนื่อง 3 ชั่วโมงหลังจากการฉีดสารสกัดจากปลาปักเป้า และหลังจากนั้นจะตรวจดูอาการทุกชั่วโมง เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วติดตามอาการของหนูทดลองต่อเนื่องทุกวันในช่วงเช้า และเย็นเพิ่มเติมจากการตรวจสุขภาพสัตว์ปกติประจำวัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในกรณีที่หนูทดลองไม่ตาย แต่มีความพิการที่ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ตามปกติเกิดขึ้น หรือไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองให้กินอาหาร หรือน้ำต่อไปได้เกิดขึ้นภายหลังการฉีดสารพิษหนูดังกล่าวจะถูกทำการุณยฆาตต่อไป

14. Behavioral studies:

☐ Yes ☒ No

If yes, describe in detail types of behavioral manipulations, including placement in testing chambers or apparatus, use of aversive stimuli, duration of test periods, and frequency of test periods.

.....

15. Euthanasia / Disposition of animals

15.1 Disposal of animals after completion of activity:

☒ Euthanatized ☐ Return to production/breeding unit/facility inventory

☐ Transfer to another research project:

– Protocol No. and investigator

☐ Other (Please describe)

15.2 Euthanasia method

☐ Anesthetic overdose, please list

Drugs used for euthanasia

Dose

Route of administration

☒ Cervical dislocation Decapitation

☐ CO₂ Chamber Other (Please describe)

16. Study endpoint: (State the project study endpoint for the animals. Indicate whether recovery, euthanasia, or death is/are expected ; specific plan for determining when the animal experimentation phase will be stopped).

การศึกษาความเป็นพิษในหนูทดลองจะยุติลงเมื่อหนูตาย หรือมีอาการเป็นปกติหลังจากได้รับสารสกัดจากปลาปักเป้าไปแล้วเป็นระยะเวลา 7 ชั่วโมง โดยผู้ศึกษาจะสังเกตอาการของหนูทดลองภายหลังจากฉีดสารพิษในระยะเวลา 3 ชั่วโมงแรก และทุกๆ 1 ชั่วโมงหลังจากนั้น แล้วติดตามอาการของหนูทดลองต่อเนื่องทุกวัน ในช่วงเช้าและเย็นเพิ่มเติมจากการตรวจสอบสัปดาห์ปกติประจำวัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในกรณีที่หนูทดลองไม่ตายแต่มีความพิการที่ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ตามปกติเกิดขึ้น หรือไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองให้กินอาหารหรือน้ำต่อไปได้ภายหลังการฉีดสารพิษ หนูดังกล่าวจะถูกทำการุณยฆาตต่อไป

Early endpoint is used (the animals are humanely euthanized prior to the expected terminate study day:

☐ Yes ☒ No

Early endpoint criteria used are

17. Biohazard/safety:

☐ Infectious agent (s) is/are used: specify

☐ Biohazardous chemical or carcinogen or radioactive material is/are used

specify

☐ Recombination agent(s) is/are used: specify

☒ None

17.1 Provide a list of any potential biohazards associated with this protocol. Specify biosafety level. ☒ ABSL 1 ☐ ABSL 2 ☐ ABSL 3 ☐ ABSL 4

17.2 Explain any safety precaution or program designed to protect personnel from biohazard and any surveillance procedure in place to monitor potential exposure

ผู้วิจัยจะระมัดระวังเป็นพิเศษเกี่ยวกับสารพิษจากปลาปักเป้าตั้งแต่การเก็บตัวอย่าง การฆ่าละลาย การสกัดพิษ การเก็บเนื้อเยื่อและสารสกัดที่มีพิษ คณะผู้วิจัยมีความรู้เกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์และสารเคมีในการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ และในขณะที่ทำการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลอง มีการใส่อุปกรณ์ป้องกันตัวได้แก่เสื้อคลุม ถุงมือและหน้ากาก ต้องระมัดระวังไม่ให้สัตว์กัดหรือข่วน ไม่สัมผัสของเสียหรือสารคัดหลั่งจากสัตว์

17.3 Explain how the waste is decontaminated and disposed.

ของเสียจากสัตว์ทดลองจะถูกแยกใส่ในถุงขยะติดเชื้อและกำจัดทิ้งโดยการเผา ส่วนของเสียที่เกิดจาก

การสกัดสารพิษจะนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เพื่อทำลายสารพิษก่อนที่จะกำจัดทิ้ง

17.4 List primary safety equipment and personnel protective equipment requirements.

ผู้วิจัยจะใส่เสื้อคลุม ถุงมือและหน้ากากทุกครั้งที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับตัวสัตว์

17.5 List procedures if any accident, injury or illness occurs.

งานวิจัยส่วนใหญ่ของโครงการนี้จะทำในภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งอยู่ภายในบริเวณโรงพยาบาลศิริราชและอยู่ใกล้มากกับ Emergency Room ของโรงพยาบาลศิริราช นอกจากนี้ในห้องปฏิบัติการยังมี emergency shower, eye washers และ first aid ในภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มีแพทย์ที่สามารถให้ความช่วยเหลือหากมี accident เกิดขึ้น หลายท่านเช่น คือ รศ. พญ. ดร. อัญชลี ตั้งตรงจิตร รศ. พญ. สุภัทรา เตียวเจริญ

17.6 List specific treatment provision for accidental exposure.

เช่นเดียวกับข้อ 17.5

17.7 List relevant occupational medical health provision.

เช่นเดียวกับข้อ 17.5

18. Qualification of personnel:

List all individuals who will be working with the animals on this project. Include all investigators, students, post-doctoral researchers, staff research associates and laboratory assistants who will actually work with the animals. If personnel do not have experience, state how they will be trained:

Name	Responsibilities	Description of relevant experience or training
สัตวแพทย์หญิง มนต์รัตน์ จุลเนตร	ดูแลสุขภาพสัตว์ประจำวัน เป็นผู้ทำการทดลองเกี่ยวกับสัตว์ทั้งการทดสอบสารพิษ และทำการทดสอบการปลั่งล้าง ความเป็นพิษ	จบการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม) มีพื้นฐานในการทำงานเกี่ยวกับสัตว์ การประเมินสุขภาพสัตว์และทำการรักษาขั้นต้น
สัตวแพทย์หญิง ศ.ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา	ให้คำปรึกษาแก่สัตวแพทย์หญิง มนต์รัตน์ จุลเนตร	จบการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม) เคยสอนเรื่อง Laboratory Animal Manipulation มีพื้นฐานในการทำงานเกี่ยวกับสัตว์ต่างๆ และสัตว์ทดลอง สามารถประเมินสุขภาพสัตว์และให้การรักษา

As Principal investigator on this protocol, I verify that the information herein is true and correct and that I am familiar with and will comply with standard of animal care and use established under the ethical guidelines and policies of Mahidol University, and Office of the National Research Council of Thailand (NRCT). Additionally, I acknowledge my responsibilities and provide assurances for the followings:

A. Animal use: The animals authorized for use in this protocol will be used only in the activities and in the manner described herein, unless a deviation is specifically approved by the MU-ACUC.

B. Duplication of effort: I have made a reasonable, good faith effort to ensure that this protocol is

not an unnecessary duplication of previous experiments.

C. Statistical assurance: I assure that I have consulted with qualified statistician to evaluate the statistical design or strategy of this proposal, and that the minimum number of animals needed for scientific validity are used.

D. Biohazard/safety: I have taken into consideration, and I have made the proper coordinations regarding all applicable rules and regulations concerning radiation protection, biosafety, recombinant issues, etc., in the preparation of this protocol.

E. Training: I verify that the personnel performing the animal procedures/manipulations described in this protocol are technically competent and have been properly trained to ensure that no unnecessary pain or distress will be caused as a result of the procedures/manipulations.

F. Responsibility: I acknowledge the inherent moral and administrative obligations associated with the performance of this animal use protocol, and I assure that all individuals associated with this project will demonstrate a concern for the health, comfort, welfare, and well-being of the research animals. Additionally, I pledge to conduct this study in the responsibility for implementing animal use alternatives where feasible, and conducting humane and lawful research.

G. Scientific review: This proposed animal use protocol has received appropriate peer scientific review, and is consistent with good scientific research practice.

H. Research studies: This protocol IS NOT associated with a grant application. If yes, I certify that this protocol is essentially the same as the study found in the grant application or program/project. The MU-ACUC and the funding agency will be notified of any changes in the proposed project, or personnel, relative to this application. I will not proceed with animal experiment until approval by the MU-ACUC is granted.

Professor Dr. Wanpen Chaicumpa, D.V.M. (Hons.), Ph.D.

(Principal investigator)

Date

2. เอกสารหมายเลข 2:

เอกสารรับรองการทำวิจัยในสัตว์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทาง
วิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล การรับรองเลขที่
009/2553



2 ถนนพหลโยธิน
บางกอกน้อย
กรุงเทพฯ 10700

โทรศัพท์ (662) 419-8751
โทรสาร (662) 418-3307

คณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

หมายเลข 009/2553

ชื่อโครงการภาษาไทย : การทดสอบความเป็นพิษของ tetrodotoxin ในหนูทดลองด้วยวิธี mouse bioassay และการ
ทดสอบการกลับล้างพิษของ tetrodotoxin โดยแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวในหนูทดลอง

รหัสโครงการ : SI-ACUP 009/2553

หัวหน้าโครงการ / หน่วยงานที่สังกัด : ศาสตราจารย์ ดร.วันเพ็ญ ชัยคำภา / ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สถานที่ทำวิจัย : คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

เอกสารที่รับรอง :

1. โครงการวิจัยตามใบสมัคร เลขที่ 009/2553
2.
3.
4.

วันที่รับรอง : 28 มิถุนายน 2553

วันที่หมดอายุ : 27 มิถุนายน 2554

คณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ที่เป็นสากล ได้แก่
International Guiding Principles for Biochemical Research Involving Animals.

(ศาสตราจารย์ ดร.โกวิท พัฒนาปัญญาสตี)
ประธานกรรมการคณะกรรมการจริยธรรม
การใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์คลินิก นายแพทย์ธีรวัฒน์ กุลทนันทน์)
คณบดีคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

๒๘ มิถุนายน ๒๕๕๓
วันที่

๐๑ มิ.ย. ๒๕๕๓
วันที่



2 PRANNOK Road
BANGKOKNOI
BANGKOK 10700
THAILAND

Tel. (662) 419-8751
FAX (662) 418-3307

Siriraj Animal Care and Use Committee (SI-ACUC)

Certificate of Approval

COA no. 009/2553

Protocol Title : Mouse bioassay for determining tetrodotoxin toxicity and tetrodotoxin neutralization by human ScFv in mice

SI-ACUP number : SI-ACUP 009/2553

Principal Investigator / Affiliation : Prof. Dr. Wanpen Chaicumpa /

Department of Parasitology

Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Research site : Faculty of Medicine Siriraj Hospital

Approval includes :

1. ANIMAL CARE AND USE PROTOCOL No. 009/2553

2.

3.

4.

Approval date : June 28, 2010

Expired date : June 27, 2011

This is to certify that Siriraj Animal Care and Use Committee is in full Compliance with International Guidelines for Animal Research Protection such as International Guiding Principles for Biochemical Research Involving Animals.

K. Pattanapanyasat

(Prof. Dr. Kovit Pattanapanyasat)
Chairman

June 28, 2010

date

T. Kulthanan

(Clin. Prof. Teerawat Kulthanan, M.D)
Dean of Faculty of Medicine Siriraj Hospital

01 JUN 2553

date