แนวทางสำหรับการผลิต polyclonal antibody ในสัตว์ทดลอง

1. จุดมุ่งหมาย

มีการนำสัตว์จำพวกฟันแทะและกระต่ายมาใช้เพื่อการผลิต antibody ตามวัตถุประสงค์ต่างๆ ของงานวิจัย adjuvant ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การใช้ Freund's Complete Adjuvants (CFA) โดยไม่เหมาะสมหรือไม่จำเป็นอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบ เกิดฝีหนอง หรือเนื้อตาย มีการรายงานการแพร่กระจายของ granuloma ไปยังปอด ตับ ไต หัวใจ ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อกระดูก หลังจากที่ฉีด adjuvant เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) หรือการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (intravenous) ในกระต่ายและหนูแรทเช่นเดียวกับในแฮมสเตอร์ หนูไมซ์ และหนูตะเภา และเช่นเดียวกับที่เกิดในมนุษย์ซึ่งจะเกิดความเจ็บปวดจากฝีหรือการบวม แนวทางต่อไปนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อจำกัดหรือลดการใช้ adjuvant ในกระบวนการผลิต polyclonal antibody อย่างถูกต้องเหมาะสม ลดความไม่สบายของสัตว์ทดลองที่ถูกนำมาใช้ อันจะส่งผลถึงด้านสวัสดิภาพสัตว์เพื่อลดความเจ็บปวดและไม่สบายของสัตว์ทดลองระหว่างการศึกษาวิจัย

2. การเลือกชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง

นักวิจัยควรจะพิจารณาใช้วิธีการผลิต antibody ในห้องปฏิบัติการ หรือเลือกใช้ antibody ที่มีวางขายเป็นการค้าซึ่งมีเทคโนโลยีที่ผลิต antibody ให้ได้จำนวนมากในห้องปฏิบัติการ (*ex vivo* method) ก่อนเลือกใช้วิธีการผลิต antibody ในสัตว์ทดลอง นักวิจัยต้องพิจารณาไตร่ตรองการเลือกชนิดและสายพันธุ์สัตว์ทดลองที่จะนำมาใช้ในการศึกษา

3. Antigen

การทำให้ antigen บริสุทธิ์เป็นเรื่องสำคัญมาก รวมถึงวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการศึกษาหรือผลิตต้องปราศจากสารที่เป็นพิษอย่างแท้จริง (เช่น ยูเรีย กรดอะซิติก) ควรระวังไม่ให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อของเชื้อก่อโรคและความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นทั้งในสัตว์ทดลองที่นำมาใช้ การแพร่ระบาดไปสู่สัตว์อื่นๆ หรือเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นหากมีการใช้สารพิษหรือเชื้อก่อโรคเป็น antigen จะต้องได้รับการพิจารณาไตร่ตรองระดับนโยบายหรือคณะกรรมการพิจารณางานวิจัยของหน่วยงานและต้องผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการเตรียม immunogen ดังตารางที่ 4

4. Adjuvants

แม้ว่า Freund adjuvant มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดี แต่การใช้ Freund adjuvant สามารถทำให้เกิดปัญหาได้ เช่น หากเปลี่ยนอยู่ในรูปอิมัลชัน (emulsion) (ขั้นตอนการผสม adjuvant กับสารละลาย antigen) ทำให้เกิดสภาพของ adjuvant ที่ไม่ค่อยเสถียร ยังไม่มีความแน่ชัดเรื่องตำแหน่งที่ฉีดเพื่อให้เกิดการดูดซึมได้ดีที่สุดเพื่อให้ไปถึงกลุ่มของเซลภูมิคุ้มกัน และยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดแผลเปื่อยในตำแหน่งที่ฉีด มีการสร้าง granuloma เกิด ascitic fluid ที่ไม่ตรงตามเวลา (กรณีฉีดเข้าช่องท้อง) ทำให้สัตว์เจ็บป่วยและไม่สบายมากขึ้น หากจำเป็นต้องใช้ Freund adjuvant ใช้ Freund's Complete Adjuvant ได้เพียงครั้งแรกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunization) เพียงครั้งเดียวเท่านั้น ในขณะเดียวกันผู้ปฏิบัติงานควรจะระมัดระวังและหลีกเลี่ยงอุบัติเหตุจากการโดนเข็มฉีดที่มี antigen เพราะเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบที่เจ็บปวดบริเวณที่ฉีดเช่นเดียวกันโดยการใช้ทิปปิดปลายเข็มไว้

ปัจจุบันมี adjuvant อื่นๆ เช่น Ribi และ Titer Max ที่ได้รับการศึกษาแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่มีความปลอดภัยกว่าการใช้ Freund adjuvant ดังนั้นการใช้ Freund adjuvant จึงต้องมีการพิจารณาไตร่ตรองอย่างรอบคอบโดยพิจารณาเปรียบเทียบกับ adjuvant อื่น ข้อมูลทางเลือกในการใช้ adjuvant ดังตารางที่ 5

5. การฉีดภูมิคุ้มกัน

การฉีดสำหรับการผลิต antibody ในงานประจำ ควรจะฉีดเข้าที่ใต้ผิวหนัง 2-4 ตำแหน่งต่อสัตว์ 1 ตัว โดยทั่วไปจะฉีดบริเวณหลังห่างจากกระดูกสันหลัง ตำแหน่งอื่นๆ เช่น ชั้นผิวหนัง (intradermal, I.D.)ชั้นกล้ามเนื้อ (intramuscular, I.M.) ช่องท้อง (intraperitoneal, I.P.) สำหรับการฉีดเข้าทาง I.D. ไม่ควรใช้กับหนูไมซ์ และการฉีดเข้าทาง I.M. ไม่ควรใช้กับสัตว์ฟันแทะที่มีขนาดเล็ก ปริมาตรในการฉีดที่แนะนำและจำนวนรายการดังตารางที่ 1 การฉีดในปริมาตรมากที่สุดมีรายละเอียดดังตารางที่ 2 ต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก ต้องกรอง antigen (ตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน) ก่อนการผสมกับ adjuvant ตำแหน่งที่จะฉีดต้องสะอาด โดยฆ่าเชื้อโรคบริเวณผิวหนังด้วยแอลกอฮอล์ เบตาดีน หรือคลอเฮ็กซิดีน

การฉีดเข้า Intravenous (I.V.) เฉพาะ antigen ที่ไม่มี adjuvant การฉีดเข้า footpad และ popliteal lymph node อนุญาตให้ทำได้ตามความจำเป็น แต่อย่างไรก็ตามต้องได้รับการพิจารณาอย่างถี่ถ้วนจากสัตวแพทย์ที่รับผิดชอบและคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง ดังนั้นการส่งแบบเสนอโครงการที่มีการใช้สัตว์ทดลองสำหรับงานวิจัย ผลิต ทดสอบ และการเรียนการสอน เพื่อขอรับการพิจารณาต้องระบุข้อมูลรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติต่อสัตว์ รวมทั้งชนิด antigen อย่างชัดเจน ไม่ควรฉีดที่ footpad ในกระต่าย

ตารางที่ 1 แสดงตำแหน่งที่จะฉีดและปริมาตรที่ฉีด immunogen ในรูปของ adjuvant

	Mice	Rats	Hamsters	Guinea pigs	Rabbits
ใต้ผิวหนัง (subcutaneous)	0.1มล/ตำแหน่ง สูงสุด 4 ตำแหน่ง	0.1-0.2 มล/ ตำแหน่ง สูงสุด 4 ตำแหน่ง	0.1มล/ตำแหน่ง สูงสุด4 ตำแหน่ง	0.1-0.2 มล/ ตำแหน่ง สูงสุด4-6 ตำแหน่ง	0.1-0.25 มล/ตำแหน่ง สูงสุด8-10 ตำแหน่ง
ชั้นกล้ามเนื้อ (I.M.)	0.5 มล. ถ้าจำเป็น แต่ไม่แนะนำ	ไม่แนะนำ	0.5 มล. ถ้า จำเป็นแต่ไม่ แนะนำ	ไม่แนะนำ	0.25มล/ตำแหน่ง สูงสุด2 ตำแหน่ง
ช่องท้อง (I.P.)	0.1มล/ตำแหน่ง สูงสุด1ตำแหน่ง	0.25มล/ตำแหน่ง สูงสุด1 ตำแหน่ง	0.25มล/ตำแหน่ง สูงสุด1 ตำแหน่ง	0.25มล/ตำแหน่ง สูงสุด1 ตำแหน่ง	ไม่แนะนำ
ชั้นผิวหนัง (I.D.)	ไม่แนะนำ	ไม่แนะนำ	ไม่แนะนำ	ไม่แนะนำ	0.025 มล/ตำแหน่ง สูงสุด5-8 ตำแหน่ง

ตารางที่ 2 ปริมาตรการฉีด antigen ที่ไม่มี adjuvant ที่มากสุดที่แนะนำ

	S.C.	I.M.	I.D.	I.P.	I.V.
Mice	0.5 ml	0.05 ml	NR	1 ml	0.2 ml
Hamster	1.0 ml	0.1 ml	NR	2-3 ml	0.3 ml
Guinea pigs	1.0 ml	0.1 ml	NR	10 ml	0.5 ml
Rats	1.0 ml	0.1 ml	NR	5 ml	0.5 ml
Rabbits	1.5 ml	0.5 ml	0.05 ml	20 ml	1-5 ml

NR = ไม่แนะนำ

6. การเก็บเลือด

เจาะเก็บเลือดได้ 10% ของปริมาตรเลือดทั้งหมด ได้ 1 ครั้ง โดยไม่ต้องให้สารทดแทน โดยให้สัตว์ได้มีช่วงเวลาพัก 3-4 สัปดาห์ ปริมาตรการเก็บเลือดและวิธีการเก็บเลือดที่แนะนำตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาตรการเก็บเลือดที่แนะนำ *

	ปริมาตรเลือด (ml/Kg)	ปริมาตรเลือดเฉลี่ย	เก็บเลือดทุก 3 สัปดาห์ (10% BV)	เก็บเลือดทุก สัปดาห์ (5% BV)	เก็บเลือดทุกวัน (1% BV)
หนูไมซ์ (30 g)	80	2.4 ml	0.24 ml	0.12 ml	0.024 ml
หนูแรท (300 g.)	60	18 ml	1.8 ml	0.90 ml	0.18 ml
กระต่าย (3 Kg)	50	150 ml	15 ml	7.5 ml	1.5 ml

** อ้างอิงจาก Laboratory Animals, 1993, Removal of blood from mammals and birds, 27, 1-22*

สำหรับกระต่าย เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำขอบหูหรือเส้นเลือดแดงกลางหูโดยสายยางหรือเข็มฉีดยา ไม่อนุญาตให้ใช้วิธีการเฉือนหรือตัดเส้นเลือด หรือใช้สารที่ทำให้เกิดการระคายเคือง เช่น xylene เพื่อขยายเส้นเลือดที่หูกระต่าย

หนูไมซ์ อาจใช้การจับบังคับสัตว์ด้วยมือหรือใช้อุปกรณ์จับบังคับสัตว์เพื่อการฉีดภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามการเจาะเก็บเลือดต้องทำให้สัตว์สลบก่อน

หนูแรท ควรจะทำให้สลบก่อนจึงจะฉีดภูมิคุ้มกันและเก็บเลือด ในบางกรณีเพื่อความปลอดภัยของเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานอาจใช้อุปกรณ์บังคับหนูที่ได้รับการยอมรับ และทำภายใต้การสลบในระดับที่เหมาะสมสำหรับการผ่าตัด การเก็บเลือดซ้ำต้องได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง การเก็บเลือดจากหัวใจจะใช้สำหรับการเก็บเลือดครั้งสุดท้ายและต้องทำภายใต้การสลบในระดับที่เหมาะสมสำหรับการผ่าตัด

7. ระยะเวลาของการทดลอง

ข้อเสนอโครงการเพื่อใช้สัตว์ในการผลิต antibody ควรระบุชัดเจนว่าจะมีขั้นตอนการปฏิบัติโดยละเอียดในสัตว์ การประเมินสัตว์เมื่อใดและอย่างไร (immunoassay, western blot, immunofluorescence) และจะเลี้ยงดูสัตว์ยาวนานเท่าใด ถ้ายังคงต้องการผลิต antibody ต่อไปอีกเป็นเดือนๆ หรือปีๆ ต้องเสนอเรื่องการดูแลที่ดีและกระบวนการดำเนินการเก็บเลือดครั้งสุดท้ายของกระต่าย มิใช่เพียงระบุว่าจะมีการเลี้ยงดูแลสัตว์ต่อไปอีก x เดือน หรือ x ปี เพื่อทำการกระตุ้นภูมิและเก็บเลือดในบางโอกาส ดังนั้นสำหรับผลิต antibody ไม่ควรใช้กระต่ายในการทดลองนานกว่า 18 เดือน

ตารางที่ 4 วิธีการเตรียม immunogen

immunogen	การเตรียม	Adjuvant ที่แนะนำ	ข้อสังเกต
Fixed cells or suspensions of particulate material	แขวนลอย (suspensions) ใน TBS, PBS	Ribi, TiterMax, ASF, $Al(OH)_3$ gel	ควรจะฉีดภายใต้ผิวหนัง (subcutaneous) หรือ i.p. แต่ไม่ควรฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (intravenous)
แบคทีเรียที่มีชีวิต เชื้อรา ไวรัสหรือจุลชีพ	แขวนลอย (suspensions) ใน TBS, PBS	Ribi, TiterMax, ASF, $Al(OH)_3$ gel	ไม่ควรใช้เป็น immunogen เว้นแต่ว่าใช้เป็นทางเลือกสุดท้าย
Bands or spots of proteins resolved on acrylamide gels (electrophoresis or isoelectric focusion)	- วิธีที่ดีที่สุดคือ electroelution ถ้าแสดง SDS ควรจะลดจำนวนจากมาตรฐาน 0.1%-0.02% หรือน้อยกว่านี้ ดังนั้นไม่เป็นอุปสรรคต่อรูปแบบ adjuvant ที่เป็นอิมัลชั่น หรือ เป็นอันตรายต่อ สัตว์ ยูเรีย และ สารตัวอื่นๆที่เสียสภาพโดยตรงควรจะกำจัดออกโดย dialysis และ gel filtration	- Ribi, $Al(OH)_3$ gel	- ถ้าโปรตีนตกตะกอนเมื่อSDS หรือ ยูเรีย ถูกกำจัด มันสามารถดูดซับบน $Al(OH)_3$ gel ในการแสดงของ SDS หรือ ยูเรีย ผลึกจะรวมตัวกับโปรตีนโดยการปั่นหมุนเหวี่ยง และ ละลายใน buffer saline อีกครั้งสำหรับใช้ฉีด โปรตีน <0.1 mg/ml อาจจะทำให้เข้มข้นโดยultrafitration หรือการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต จะไม่ใช้ trichloroacetic acid หรือ chaotrope ซึ่งจะไปทำลายแอนติเจน
	- ถ้า electroelution เป็นไปไม่ได้ ชิ้นของgel สามารถแช่แข็ง-แห้ง เป็นผงละเอียดในครก และสาก และ ยังนำมาละลายใน TBS หรือ PBS ได้อีก และ	- Ribi, TiterMax	- ตัวนี้สามารถฉีดเข้าใต้ผิวหนังได้ ผงเจลสามารถส่งผ่านไปฝังตัวในโปรตีนอย่างช้าๆ ซึ่งดีสำหรับค่าเริ่มต้นของแอนติบอดี้ที่สูงขึ้น แต่จะต่ำลงเมื่อสุดท้ายก่อนที่จะรวมกัน เจลที่ชื้นอยู่สามารถเตรียมได้ง่าย แต่

	ฉีดโดยไม่ต้องใช้ adjuvant ชิ้นส่วนของเจลที่ยังชื้นอยู่สามารถรวมกับ adjuvant ที่มีoil ผสมอยู่ ที่ผ่านเข็มเบอร์ 25		วัสดุนี้จะไปสะสมบริเวณที่ฉีดมากขึ้น การทำวิธีนี้การฉีดอาจจะทำให้อ่อนแอ หรือ เกิดฝีหนองได้
โปรตีน เปปไทด์โปรตีนรวม	ละลายใน tris-หรือ phosphate-buffered physiological saline (TBS, PBS)	Ribi, TiterMax, ASF, $Al(OH)_3$ gel	immunizing antigen ควรจะบริสุทธิ์ที่สุดที่จะทำได้
โอลิโกเปปไทด์	Peptide จะเป็น immunogen ที่ดีกว่าเมื่อรวมกับตัวพาเช่น hemocyanin ควรจะรวมสารละลายใน tris-หรือ TBS, PBS	Ribi, TiterMax, ASF, $Al(OH)_3$ gel	การรวมตัวครั้งที่สองบนตัวนำที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ตัวเชื่อมที่แตกต่างหรือ spacer arm ควรจะใช้ทดสอบความจำเพาะของ peptide ที่จำเพาะต่อการตอบสนอง antibody โดยวิธี immunoassay ไม่มีความจำเป็นหรือแม้แต่ความต้องการใช้โปรตีนจากสายพันธุ์ (species) ที่สร้างภูมิคุ้มกันชนิดตัวนำ มีชุด (kit) แตกต่างกันไปสำหรับ การรวมตัวทางเคมีที่แตกต่างกันไปวางขายเป็นการค้าในปัจจุบัน

ตารางที่ 5 adjuvant ที่มีขายทางการค้าสำหรับการผลิตแอนติบอดี้

ชื่อผลิตภัณฑ์	แหล่งที่มา	ส่วนประกอบทางเคมี	ปฏิกิริยากับแอนติเจน	อธิบาย
TiterMax™	Vaxcel, Inc., Norcross, Georgia(800) 345-2987	พันธะที่ไม่ใช่ไอออนิก Block โคพอลิเมอร์ที่ อนุภาคซิลิกาเล็กๆ + สารประกอบเคมีชนิดหนึ่ง + emulsifier	จับกับส่วนที่ชอบน้ำ: น้ำในน้ำมันในสารละลายอิมัลชั่นทำให้เสถียรโดยอนุภาคขนาดเล็ก	เป็น adjuvant ที่คล้ายกับ Freund adjuvant แต่ไม่มีผลต่อตำแหน่งที่ฉีด: ง่ายต่อการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน; ไม่เหนี่ยวนำให้เกิด hypersensitivity หรือเกิดได้น้อย การผสมหนึ่งครั้งใช้ได้สำหรับการฉีดทั้งหมด ส่งเสริมส่วนย่อยๆ ของ IgG
Ribi adjuvant สำหรับหนู ไมซ์ หนูแรท หนูตะเภา	Ribi Immunochem Research, Inc., Hamiton, Montana (800) 548-7424	Squalene + Tween 80 +monophosphoryl lipid A (MPL) + trehalose dimycolate (TDM)	Oil-in-Water emulsion	ง่ายต่อการรวมกับแอนติเจน ไม่มีผลตรงข้ามร่วมกับ Freund's ; น้ำมันเป็นตัวmetabolize จากตำแหน่งที่ฉีด
Aluminium hydroxide; Alhydrogel™ Rehsorptar II™	Armour Biochemical Co., Kankakee, IL; (815) 932-6771 Superfors (Denmark)	สารละลาย คอลอยด์เจลของผลึกเล็กๆที่ใช้ตัวเดียวหรือผสมกับ muranyl dipeptide	ดูดกลืน	ทำให้เกิดความพอใจสูง ค่าของการตอบสนองสูง อาจจะใช้ดูดกลืนโปรตีนจากสารละลายที่มี

				เกลือ หรือ ยูเรียอยู่ เป็นต้น
Alum	Pierce Chemical Co., Rockford, IL (800)8-PIERCE	ผลึกเล็กๆของ Aluminium potassium phosphate ในสารละลาย	ดูดกลืน	ใช้ได้ผลดีกับโปรตีน ช่วงระยะเวลาของการตอบสนองนาน อาจจะใช้ดูดกลืนโปรตีนจากสารละลายที่มีเกลือ หรือ ยูเรียอยู่ เป็นต้น
SAF-1	Syntex Research, Palo Alto,CA	สูตรที่มีความเหมาะสมของ emulsifiying และ adjuvant phospholipids	Oil-in-Water emulsion	ทำให้เป็น emulsion ง่าย ในช่วงเวลาที่ยาวนาน ทำให้เกิดการปกป้อง cell-mediat และ เกิดการตอบสนองของของเหลวภายในร่างกาย
Freund adjuvant	Difo Corp.(Fisher Scientific)	แบบสมบูรณ์ : mineral oil ผสมกับ เชื้อ mycobacterium ที่ตายแล้ว ไม่สมบูรณ์ : มีเฉพาะ mineral oil	Water-in-oil emulsion	เตรียม emulsion ให้เสถียรยาก รูปแบบที่สมบูรณ์สามารถใช้เป็น dose ครั้งแรกได้ น้ำมันที่ตำแหน่งฉีดยังคงมีอยู่ อาจเป็นสาเหตุการเกิดก้อนเนื้อที่ไม่ปกติ และ granulomas อันที่เสร็จสมบูรณ์แล้วไม่ควรใช้ฉีดที่ตำแหน่ง ID และ IM เชื้อ mycobacterium

				อาจจะทำให้เกิดการตอบสนองที่ไม่ต้องการอาจจะเกิดอันตรายต่อเจ้าหน้าที่ ถ้าเกิดอุบัติเหตุในการฉีด
Adjuvax™	Alpha-Beta Technology, Worcester, MA (800)833-0503	ขนาดเท่ากับไมครอนแตกกิ่งก้านเป็นอนุภาคเล็กๆของกลูแคน	ดูดกลืนสารละลายคอลอยด์ที่เหมือนน้ำ	เตรียมง่าย ปล่อยแอนติเจนไปยังเป้าหมายและ ทำลายเซลล์ macrophage adjuvant ตัวเดียวไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาในหนูไมซ์
Opti-vant™	Transgenic Science, Inc., Worcester, MA (800)282-7879	อนุภาคกลูแคน	ดูดกลืนสารละลายคอลอยด์ที่เหมือนน้ำ	เหมือนกับ Adjuvax™
Quil A	Superfose (เดนมาร์ก)	saponin บริสุทธิ์	สารตึงผิว antigen – complex	ใช้ได้ผลดีกับโปรตีน มีเครื่องบ่งชี้จำกัดเป็นคำแนะนำของQuil ความพอใจสูง จำนวนแอนติบอดี้ปานกลาง
DDA	Calbiochem Corp., San Diego, CA (800)854-3417	Dimethyldioctadecyl ammonium bromide (lipoidal quaternary ammonium compound)	ปฏิกิริยาระหว่างไอออนิกและสารที่ไม่ชอบน้ำ	ใช้ประโยชน์กับอนุภาคของแอนติเจนและละลายกับแอนติเจน ทำสารละลายคอลอยด์เหมือนกับน้ำ

เอกสารอ้างอิง

1. Jennings, V.M., Review of selected adjuvants used in antibody production. ILAR Journal. 1995, 37, pp119-125.
2. Jackson, KR and Fox, JG. ,Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. ILAR Journal. 1995, 37, pp 141-153.
3. Canadian Council on Animal Care, Guidelines on: antibody production, 2002.