สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administration

วารสารอาหารและยา THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
ปีที่ 32 ฉบับที่ 1 (2568): มกราคม – เมษายน Vol. 32 No. 1 (2025): January – April
https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของโพลีแซคคาไรด์ Pneumococcal Polysaccharides และโปรตีนพาหะชนิด CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต ด้วยวิธี Slot blot

กัสมา บุญมาก[1] สุภาภรณ์ ชุมพล[1] อภิชัย ศุภสารสาทร[1] สุภาพร ภูมิอมร[2]

[1]สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี [2]สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี
ที่อยู่ติดต่อ: กัสมา บุญมาก สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000 katsama.b@dmsc.mail.go.th

Method Development and Validation of Identity Test for Pneumococcal Polysaccharides and CRM_{197} Carrier Protein in Pneumococcal Conjugate Vaccine by Slot Blot Assay

Katsama Boonmak[1] Supaporn Chumpol[1] Apichai Supasarnsathorn[1] Supaporn Phumiamorn[2]

[1]Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi. [2]Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand.
Contact address: Katsama Boonmak, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, Katsama.b@dmsc.mail.go.th

Received: 21 August 2024, **Revised:** 10 October 2024, **Accepted:** 20 December 2024

Abstract

Background: Identity testing is a crucial process that should be conducted on the pneumococcal conjugate vaccine to verify its identity for quality control purposes. The vaccine consists of purified polysaccharides from each serogroup of Streptococcus pneumoniae, conjugated with diphtheria cross-reactive material (CRM197), as specified in the registration dossier. Therefore, this testing ensures that recipients can trust the quality, efficacy, and safety of the vaccine. The identity test of the pneumococcal conjugate vaccine is a newly developed identity testing method by the Institute of Biological Products.

Objectives: To develop and validate a standard method for identity testing of pneumococcal polysaccharides and the CRM_{197} carrier protein using the slot blot assay to verify the identity of the pneumococcal conjugate vaccine.

Methods: The optimum conditions were determined based on the specific reaction between the antigen and antibody, making them suitable for testing. Additionally, method validation was confirmed for two parameters including specificity and intermediate precision.

Results: The results of the optimum conditions for the identity test of pneumococcal polysaccharides and the carrier protein diphtheria Cross Reactive Material (CRM_{197}) in pneumococcal conjugate vaccines, using the slot blot assay, demonstrated that each antigen was specific to its corresponding serotype antibody, leading to the formation of an antigen-antibody complex. Therefore, this method must be performed according to the specified protocol to accurately verify the identity of the vaccine. Validation results revealed high specificity: pneumococcal conjugate vaccine samples displayed distinct dark purple bands, indicating positive identification, while meningococcal vaccine samples showed a negative result, represented by a white band on the nitrocellulose membrane. Furthermore, intermediate precision was confirmed by two independent analysts, both of them obtained consistent results. In both cases, dark purple bands appeared on the nitrocellulose membrane, indicating positive identification. Therefore, this method successfully passed validation and can be adopted as a standard procedure.

Conclusions: The study results revealed that the identity test for pneumococcal polysaccharides and the CRM_{197} carrier protein using the slot blot assay met the validation requirements. Consequently, it is suitable for use as a standard method for the registration of the pneumococcal conjugate vaccine in Thailand.

Keywords: *streptococcus pneumoniae*, pneumococcal conjugate vaccine, slot blot assay, dossier registration

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต เป็นรายการทดสอบหนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน เพื่อยืนยันว่าวัคซีนประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* และ CRM_{197} ที่ใช้เป็นโปรตีนพาหะ ตรงตามซีโรไทป์ที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ เพื่อให้ผู้ได้รับวัคซีนมีความมั่นใจในคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัย ซึ่งทางสถาบันชีววัตถุยังไม่เคยมีรายการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตด้วยวิธี Slot blot มาก่อน

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ Pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตด้วยวิธี Slot blot ในการนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการสำหรับตรวจยืนยันเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต

วิธีการวิจัย: ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีด้วยการศึกษาปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และศึกษาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี และการตรวจสอบความเที่ยงของวิธี

ผลการศึกษา: ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ carrier protein ชนิด diphtheria Cross Reactive Material (CRM_{197}) ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต (pneumococcal conjugate vaccine) ด้วยวิธี slot blot พบว่าแอนติเจนแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีซีโรไทป์ของตนเองจึงจะสามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen-antibody complex) ได้ ซึ่งการทดสอบนี้ต้องปฏิบัติตามแม่แบบของการทดสอบที่กำหนดไว้ จึงสามารถตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีนได้อย่างถูกต้อง และเมื่อศึกษาความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีมีความจำเพาะสูง โดยตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตปรากฏแถบสีม่วงเข้ม ซึ่งแสดงผลเป็นบวก (positive identification) และวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นให้ผลการทดสอบเป็นผลลบ (negative identification) จะปรากฏแถบสีขาวบนแผ่น nitrocellulose membrane และผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน พบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 คนเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยปรากฏแถบสีม่วงเข้มบนแผ่น nitrocellulose membrane ซึ่งแสดงผลการทดสอบเป็นบวกของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ดังนั้นวิธีนี้จึงผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี และสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการได้

สรุป: การศึกษานี้พบว่าวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต ด้วยวิธี slot blot ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำวิธีมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ประกอบการการขอขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุจำหน่ายในประเทศ

คำสำคัญ: สเตรปโตคอคคัส นิวโมเนียอี วัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต วิธี slot blot ขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ

บทนำ

โรคปอดอักเสบ (pneumonitis) หรือปอดบวม เป็นอาการอักเสบของเนื้อปอด ส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ที่อาศัยตามปกติในลำคอของคน เชื้อชนิดนี้มีมากกว่า 90 ซีโรไทป์ อัตราการก่อโรคแต่ละซีโรไทป์มีความแตกต่างกัน[1] การแพร่เชื้อระหว่างคนมักเกิดจากการสัมผัสละอองฝอยของทางเดินหายใจผู้ที่ติดเชื้อไวรัสทางเดินหายใจส่วนบนอยู่ก่อนจะติดเชื้อนี้ได้ง่ายขึ้น จึงมักพบโรคนี้ได้บ่อยในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว เชื้อนี้ทำให้เกิดโรคได้หลายระบบที่สำคัญคือ โรคหูชั้นกลางอักเสบ โรคไซนัสอักเสบ และสามารถทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุกรานซึ่งมีความรุนแรง ได้แก่ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคปอดอักเสบ เป็นต้น สามารถพบได้ทุกเพศทุกวัย ในวัยเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 2 ปี ผู้ที่มีอายุ 65 ปีขึ้นไป และผู้ที่มีภาวะภูมิต้านทานต่ำ บางรายการติดเชื้ออาจรุนแรงและทำให้เสียชีวิตได้ โดยภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อแต่ละซีโรไทป์มีความจำเพาะไม่สามารถป้องกันโรคจากภูมิคุ้มกันที่เกิดจากเชื้อซีโรไทป์อื่นได้[1] วิธีการป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิต้านทาน ซึ่งมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุหรือผู้ที่มีโรคประจำตัวที่ระบบภูมิคุ้มกันไม่แข็งแรง มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อและมีอาการรุนแรงได้มากกว่าผู้ที่ภูมิคุ้มกันปกติ[2]

วัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบในปัจจุบันผลิตมาจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* โดยวัคซีนมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดโพลีแซคคาไรด์ (non-conjugate polysaccharide) และชนิดคอนจูเกต (conjugate polysaccharide) ซึ่งชนิดคอนจูเกตจะนำส่วนแอนติเจนของแต่ละซีโรไทป์เชื่อมต่อกับ carrier protein[2] โดยวัคซีนชนิดโพลีแซคคาไรด์มีข้อด้อยเป็น T- independent ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในเด็กเล็กที่อายุต่ำกว่า 2 ปี จึงมีการพัฒนาวัคซีนที่นำส่วนโพลีแซคคาไรด์แอนติเจนบนแคปซูลของเชื้อมาจับกับโปรตีนพาหะเพื่อเปลี่ยนแอนติเจนให้เป็น T-dependent ทำให้กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อมีการฉีดซ้ำได้[3] วัคซีนที่จำหน่ายในประเทศไทยมีทั้งชนิดโพลีแซคคาไรด์ 23 ซีโรไทป์ และชนิดคอนจูเกต 13 และ 15 ซีโรไทป์

ความมั่นใจในความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีน จึงมีความจำเป็นต้องมีการประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ด้วยการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของวัคซีนโดยใช้วิธีทางด้านความปลอดภัย ด้านเอกลักษณ์และความแรง รวมถึงด้านเคมีและฟิสิกส์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการตรวจสอบเอกลักษณ์เป็นการตรวจวิเคราะห์หนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน[3] ซึ่งเดิมการประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์นั้นทำโดยการพิจารณาเอกสารกระบวนการผลิต ต่อมาทางสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของโพลีแซคคาไรด์ pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะชนิด diphtheria Cross Reactive Material (CRM_{197}) ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตด้วยวิธี slot blot และวิธีนี้ทำให้มีการตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์วัคซีนเพื่อยืนยันว่าวัคซีนนั้นประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ตรงตามซีโรไทป์ที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ และเพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนตรงตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ โดยที่วิธี slot blot นั้นมีความไว และความจำเพาะสูงที่สามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของโพลีแซคคาไรด์แต่ละซีโรไทป์

และบ่งชี้เอกลักษณ์ของโปรตีนพาหะที่เชื่อมต่ออยู่กับโพลีแซคคาไรด์ได้ ซึ่งทางสถาบันชีววัตถุนั้นยังไม่มีการเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์มาก่อน ดังนั้น การศึกษานี้จึงดำเนินการพัฒนาวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์โดยใช้วิธี slot blot ซึ่งเป็นการขยายขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์รายการใหม่ เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot

2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยดำเนินการศึกษาความถูกต้องของวิธีด้วยสารแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด และตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต ชนิด 13 ซีโรไทป์ จำนวน 1 รุ่นการผลิต ที่มีการนำเข้ามาขึ้นทะเบียนในประเทศไทย โดยทำการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี ซึ่งใช้วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นเพื่อยืนยันความจำเพาะของวิธี และทำการตรวจสอบความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน

กลุ่มตัวอย่าง

วัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต ชนิด 13 ซีโรไทป์ (pneumococcal polysaccharides serotype 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F และ carrier protein ชนิด diphtheria CRM_{197} conjugate vaccine) จำนวน 1 รุ่นการผลิต ที่มีการนำเข้ามาขึ้นทะเบียนในประเทศไทย

สารแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด ได้แก่ monoclonal antibody serotype 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F และ 23F, rabbit polyclonal CRM_{197} antibody (ยี่ห้อ Pfizer) และ Protein A/G-HRP (Thermo scientific Product No. 32490)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์ Bio-Dot® SF Apparatus (Cat. No. 170-6542, BIO-RAD), แผ่นเมมเบรน nitrocellulose membrane precut, 0.45 µm, 9 x 12 cm. (Cat. No. 162-0117, BIO-RAD), แผ่น filter paper (Cat. No. 162-0161, BIO-RAD), เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมความเย็น, หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 15 และ 50 ml หลอดทดลอง Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml, Automatic pipette ขนาด 5-50 µl, 20-200 µl และ 100-1,000 µl

2. สารเคมีและน้ำยาทดสอบที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ 10x tris buffer saline (10x TBS) (Cat. No. 170-6435, BIO-RAD), bovine serum albumin (BSA) (CAS. No. 9048-46-8, Sigma-Aldrich), 1x TBS with 0.05%Tween 20® (TTBS) (washing buffer), 3% BSA in 1x TBS (blocking solution), 1% BSA in 1x TTBS (diluent), 1M sulfuric acid (stop solution), aluminium

phosphate stock suspension, 4CN peroxidase substrate (Cat. No. 5420-0022, Sera Care) และ peroxidase substrate (Cat. No. 5120-0038, Sera Care)

3. สารมาตรฐานที่ใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน (reference vaccine: 13v PNC control vaccine ยี่ห้อ Pfizer)

ขั้นตอนการศึกษา

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumo coccal polysaccharides และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีน

1. เตรียมตัวอย่างวัคซีนและวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ โดยนำตัวอย่างวัคซีนมา pooled รวมกัน ใส่ในหลอดทดลอง เติม aluminium salt ลงในหลอดทดลอง แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยง เก็บส่วนตะกอนก้นหลอด เติมน้ำกลั่นลงไป แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยง เก็บส่วนตะกอนก้นหลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 1M sodium hydroxide และ 1M citric acid ซึ่งในขั้นตอนนี้ทำเพื่อกำจัด aluminium salt ออกจากตัวอย่าง

2. เตรียมแผ่น nitrocellulose membrane และแผ่น filter paper โดยการนำแผ่น filter paper จำนวน 3 แผ่น แช่ใน 1xTBS และนำแผ่น nitrocellulose membrane แช่ลงในน้ำ แล้วนำไปแช่ใน 1xTBS

3. เติมตัวอย่างวัคซีน วัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน และ negative control (diluent) ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ตามตำแหน่งที่กำหนดไว้ แล้วเปิด valve ใช้แรงดันสุญญากาศเพื่อให้ตัวอย่างถูกดูดผ่านแผ่นเมมเบรน จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย 1xTBS แล้วเปิด valve แรงดันสุญญากาศดูดสารให้ผ่านแผ่นเมมเบรน โดยทำการล้างแผ่นเมมเบรนในขั้นตอนนี้จำนวน 2 รอบ

4. เติม specific antibody โดยเตรียม specific antibody ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนแต่ละซีโรไทป์ โดยเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 1% BSA in TTBS แล้วเติม specific antibody ที่มีความจำเพาะแต่ละแอนติเจน เติมลงในตำแหน่งที่กำหนดไว้ แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เปิด valve แรงดันสุญญากาศดูดสารให้ผ่านแผ่นเมมเบรน จากนั้นล้างทันทีด้วยสาร TTBS แล้วทำการเปิด valve แรงดันสุญญากาศดูดสารให้ผ่านแผ่นเมมเบรน โดยทำการล้างแผ่นเมมเบรนในขั้นตอนนี้จำนวน 2 รอบ

5. การ blocking ให้ทำการย้ายแผ่น nitrocellulose membrane ใส่ในกล่องพลาสติกที่เติมสาร blocking solution (3% BSA in 1xTBS) โดยแช่แผ่นเมมเบรนในกล่อง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที หลังจากครบเวลานำแผ่นเมมเบรนแช่ในสาร TTBS เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที โดยทำการแช่แผ่นเมมเบรนในสาร TTBS จำนวน 2 รอบ

6. เติม secondary antibody โดยเตรียม protein A/G-HRP เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1: 2500 ด้วย 1% BSA in TTBS ย้ายแผ่น nitrocellulose membrane แช่ลงในกล่องพลาสติกที่เติมสาร protein A/G-HRP และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที หลังจากครบเวลานำแผ่นเมมเบรนแช่ในสาร TTBS เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วย้ายแผ่นเมมเบรนแช่ในสาร 1xTBS นาน 5 นาที

7. ขั้นตอนปฏิกิริยาการเกิดสี โดยการเตรียมผสมสารซับสเตรท 4CN peroxidase substrate และ peroxidase substrate ในสัดส่วน 1:1 แล้วเติมลงในกล่องพลาสติก หลังจากนั้นแช่แผ่น membrane จะปรากฏแถบแบนสีม่วงเข้มภายใน

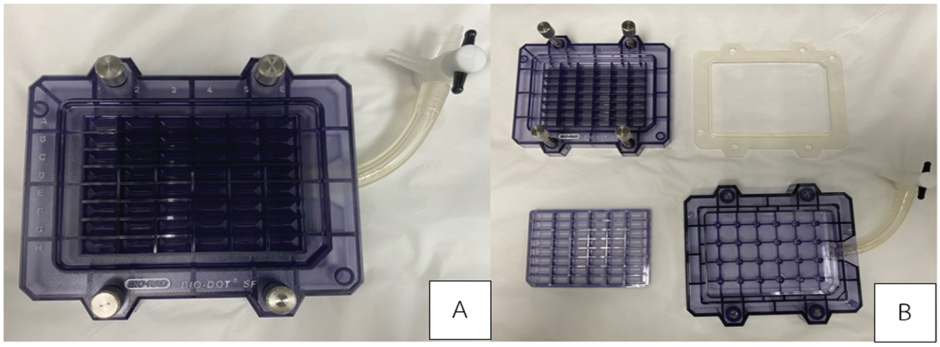
5 นาที หลังจากครบเวลาย้ายแผ่น membrane แช่ลงในน้ำ แล้วปล่อยให้แผ่น membrane แห้งธรรมชาติ

8. อ่านผล โดยตัวอย่างวัคซีนปรากฏแถบสีม่วงเข้มในตำแหน่ง pneumococcal polysaccharides ทั้ง 13 ซีโรไทป์ และปรากฏแถบสีม่วงเข้มในตำแหน่ง CRM_{197} แสดงว่าตัวอย่างวัคซีนนี้ประกอบด้วยแอนติเจนในแต่ละซีโรไทป์ชนิด Pneumococcal polysaccharides ที่มีความจำเพาะ และเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ CRM_{197} ให้รายงานผลการทดสอบเป็นผลบวก ในขณะที่ตัวอย่างวัคซีนที่ปรากฏแถบสีขาว แสดงว่าตัวอย่างวัคซีนไม่มีแอนติเจนดังกล่าว ให้รายงานผลการทดสอบเป็นผลลบ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot เป็นรายการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative assay) เพื่อระบุความจำเพาะของ pneumococcal polysaccharides serotype 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F และ carrier protein ชนิด diphtheria CRM_{197} conjugate vaccine โดยรายงานผลเป็นบวกหรือลบ จึงมีการดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี และความเที่ยงของวิธี ตามข้อกำหนดมาตรฐาน ICH guideline[4]

การหาความจำเพาะของวิธี เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ โดยเตรียมตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน และวัคซีนอื่นซึ่งในการทดสอบนี้ใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นประกอบด้วยแอนติเจนชนิด polysaccharide ที่ผลิตจากเชื้อ *N. meningitidis* จำนวน 4 ซีโรกรุ๊ป คือ A C Y และ W135 จับกับท็อกซอยด์ของเชื้อคอตีบซึ่งใช้เป็นโปรตีนพาหะ จากนั้นเติมตัวอย่างลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยใช้อุปกรณ์ Bio-Dot® SF Apparatus (ดังรูปที่ 1) และอ่านผลการทดสอบโดยการเติม 4-chloro-naphthol (CN) peroxidase substrate ซึ่งแต่ละช่องของอุปกรณ์ Bio-Dot® SF apparatus แสดงถึงแอนติเจนแต่ละชนิด (ดังตารางที่ 1) การแปลผลหากผลการทดสอบให้ผลบวก จะปรากฏแถบสีม่วงเข้มบนแผ่น nitrocellulose membrane ในขณะที่ผลลบจะปรากฏแถบสีขาว



รูปที่ 1 อุปกรณ์ Bio-Dot® SF apparatus สำหรับตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot

A: ชุดอุปกรณ์ Bio-Dot® SF apparatus และ B: ส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์ Bio-Dot® SF apparatus

ตารางที่ 1 ช่องตำแหน่งตัวอย่าง และวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานบนแผ่น nitrocellulose membrane ที่วางบนชุดอุปกรณ์ Bio-Dot® SF Apparatus สำหรับตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot

ROW	LANE 1	LANE 2	LANE 3	LANE 4	LANE 5	LANE 6
ROW A	Ref. serotype 1	Ref. serotype 14	Sample serotype 1	Sample serotype 14	-	-
ROW B	Ref. serotype 3	Ref. serotype 18C	Sample serotype 3	Sample serotype 18C	-	-
ROW C	Ref. serotype 4	Ref. serotype 19A	Sample serotype 4	Sample serotype 19A	-	-
ROW D	Ref. serotype 5	Ref. serotype 19F	Sample serotype 5	Sample serotype 19F	-	-
ROW E	Ref. serotype 6A	Ref. Serotype 23F	Sample serotype 6A	Sample serotype 23F	-	-
ROW F	Ref. serotype 6B	Ref. CRM_{197}	Sample serotype 6B	Sample CRM_{197}	-	-
ROW G	Ref. serotype 7F	Negative control	Sample serotype 7F	Negative control	-	-
ROW H	Ref. serotype 9V	-	Sample serotype 9V	-	-	-

การทดสอบความเที่ยงของวิธี

ทำการทดสอบโดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ตัวอย่าง pneumococcal polysaccharides ชนิด 13 ซีโรไทป์ และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ จำนวน 1 รุ่นการผลิต และผู้วิเคราะห์แต่ละคนทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ศึกษาโดยทำการเตรียมตัวอย่างวัคซีน และวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน แล้วเติมตัวอย่างลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยใช้อุปกรณ์ Bio-Dot® SF Apparatus และอ่านผลการทดสอบด้วยการเติม 4-chloro-naphthol (CN) peroxidase substrate การแปลผลหากผลการทดสอบให้ผลบวก จะปรากฏแถบสีม่วงเข้มบนแผ่น nitrocellulose membrane ในขณะที่ผลลบจะปรากฏแถบสีขาว

ผลการศึกษา

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) การทดสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot assay ดำเนินการทดสอบโดยใช้วัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้เป็น positive control และวัคซีนอื่นซึ่งในการทดสอบนี้ใช้วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่จำเพาะแต่ละชนิดเท่านั้น ผลการทดสอบโดยใช้วัคซีนอื่นที่ไม่ใช่วัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ซึ่งทดสอบวัคซีนโรคไข้กาฬหลังแอ่น พบว่าไม่มีการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ antigen-antibody complex

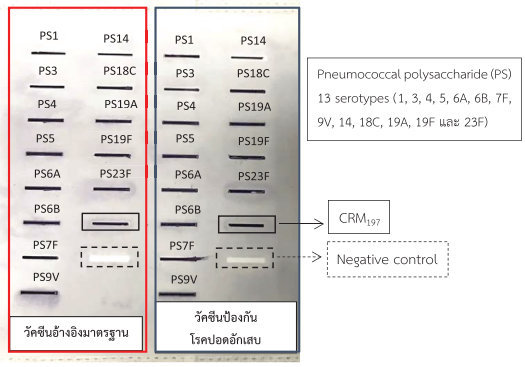
ซึ่งเป็นการจับกันระหว่างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนนั้น โดยแสดงผลการทดสอบดังนี้

1. ตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบให้ผลการทดสอบเป็นผลบวก โดย pneumococcal polysaccharides แต่ละซีโรไทป์ (13 ซีโรไทป์) และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ปรากฏแถบสีม่วงเข้มบนแผ่น nitrocellulose membrane ทั้งหมด 13 แบน ซึ่งเป็นไปตามตำแหน่งที่กำหนดไว้ (ดังรูปที่ 2)

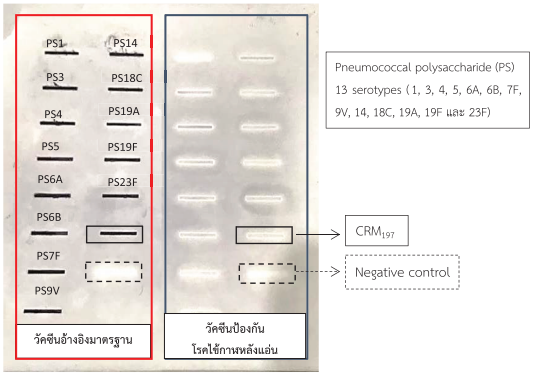
2. ตัวอย่างวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน ให้ผลการทดสอบเป็นผลบวก โดย pneumococcal polysaccharides แต่ละซีโรไทป์ (13 ซีโรไทป์) และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ปรากฏแถบสีม่วงเข้มบนแผ่น nitrocellulose membrane ทั้งหมด 13 แบน ซึ่งเป็นไปตามตำแหน่งที่กำหนดไว้ (ดังรูปที่ 2 และ 3)

3. negative control คือ diluent (1%BSA in 1x TTBS) ให้ผลการทดสอบเป็นผลลบ โดยปรากฏแถบสีขาวบนแผ่น nitrocellulose membrane ซึ่งเป็นไปตามตำแหน่งที่กำหนดไว้

4. วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นให้ผลการทดสอบเป็นผลลบ โดยไม่แตกต่างจาก negative control (ดังรูปที่ 3)

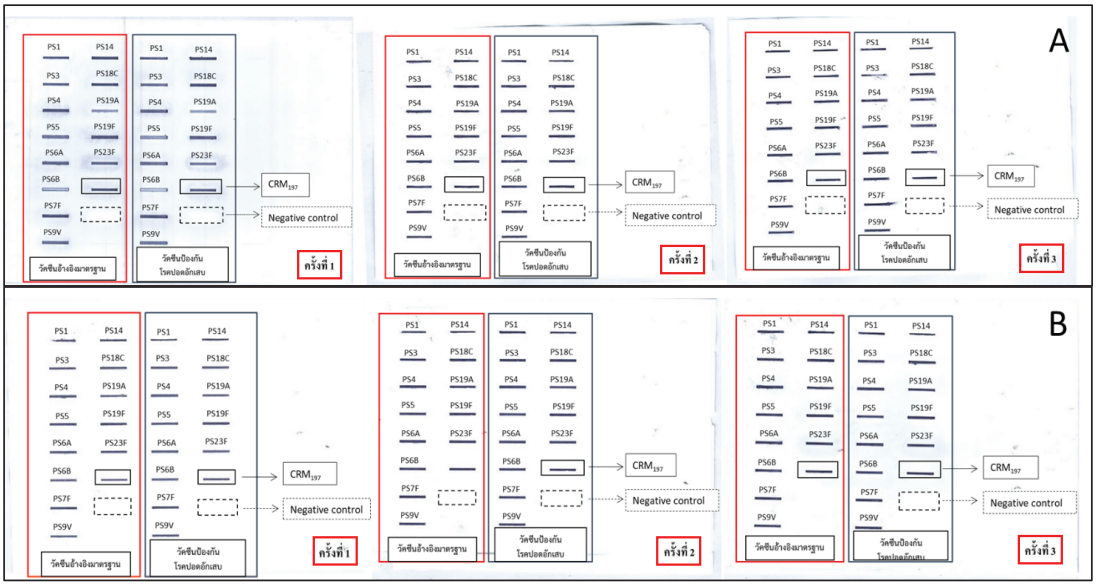


รูปที่ 2 ผลการทดสอบการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot assay โดยทดสอบกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานและตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ



รูปที่ 3 ผลการทดสอบการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot assay โดยทดสอบกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานและตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น

ผลการตรวจสอบความเที่ยงของวิธี (intermediate precision) เมื่อทำการทดสอบโดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบรุ่นการผลิตเดียวกัน และผู้วิเคราะห์แต่ละคนทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง พบว่าผลการทดสอบผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ในตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบและวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานให้ผลการทดสอบเป็นผลบวก โดย pneumococcal polysaccharides แต่ละซีโรไทป์ (13 ซีโรไทป์; 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F และ 23F) และโปรตีนพาหะ CRM_{197} ปรากฏแถบสีม่วงเข้มบนแผ่น nitrocellulose membrane ทั้งหมด 13 แบน ซึ่งเป็นไปตามตำแหน่งที่กำหนดไว้ และผลการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ในส่วนของ negative control ให้ผลการทดสอบเป็นผลลบ โดยปรากฏแถบสีขาวบนแผ่น nitrocellulose membrane ในตำแหน่งที่กำหนดไว้ (ดังรูปที่ 4) และสรุปผลการทดสอบ ดังตารางที่ 2



รูปที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบด้วยวิธี slot blot assay โดยรูป A: ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 ซึ่งทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง และ B: ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 ซึ่งทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และโปรตีนพาหะชนิด CRM197 ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot assay ของผู้วิเคราะห์ 2 คน จำนวน 3 ครั้ง โดยตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตปรากฏแถบสีม่วงเข้ม แสดงผลเป็นบวก (POS) และปรากฏแถบสีขาว แสดงผลเป็นลบ (NEG)

Analyst	Analyst 1						Analyst 2					
N=3	1st time		2nd time		3rd time		1st time		2nd time		3rd time	
Pneumococcal Polysaccharide (PS)	Ref. vaccine	13PCV vaccine	Ref. vaccine	13PCV vaccine	Ref. vaccine	13PCV vaccine	Ref. vaccine	13PCV vaccine	Ref. vaccine	13PCV vaccine	Ref. vaccine	13PCV vaccine
PS serotype 1	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 4	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 5	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 6A	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 6B	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 7F	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 9V	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 14	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 18C	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 19A	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 19F	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
PS serotype 23F	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
CRM_{197}	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Negative control	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

อภิปรายผล

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต เป็นรายการทดสอบหนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิตวัคซีน ตั้งแต่ขั้นตอนระหว่างการผลิตไปจนถึงได้เป็นผลิตภัณฑ์วัคซีน ได้แก่ ขั้นตอนผลิต purified polysaccharide, purified carrier protein, monovalent bulk conjugates และ final product[3,6] สำหรับวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต ตาม World Health Organization (WHO) แนะนำให้ใช้วิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) หรือวิธี serological test[3] ซึ่งวิธี NMR เป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือจำเพาะที่ไม่ได้เป็นเครื่องมือที่ใช้ทั่วไปจึงเป็นข้อจำกัดในการนำใช้เพื่อการควบคุมคุณภาพในระหว่างกระบวนการผลิต[3] ในขณะที่วิธี serological test เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยเทคนิค Slot blot ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ[5-6] อาศัยหลักการแอนติเจนที่สนใจจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะ เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันและแสดงผลการทดสอบเป็นแถบสี จึงเหมาะสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิต[5] การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค slot blot มาใช้เป็นวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกต โดยดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตาม ICH guideline[4] ผลการศึกษาความจำเพาะของวิธีให้ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด (ดังรูปที่ 2 และรูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะสูง โดยแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ไม่พบการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ข้ามซีโรไทป์กัน เนื่องจากแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ผลิตจากแคปซูลของเชื้อแบคทีเรีย Streptococcus pneumoniae ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ โดยโพลีแซคคาไรด์แต่ละซีโรไทป์จำแนกจากโครงสร้างโพลีแซคคาไรด์แคปซูล และความจำเพาะทางภูมิคุ้มกัน[7-8] เพื่อยืนยันว่าวิธีนี้สามารถระบุเอกลักษณ์ของแอนติเจนแต่ละชนิดได้อย่างถูกต้อง และผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบรุ่นการผลิตเดียวกัน และผู้วิเคราะห์แต่ละคนทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง พบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 คน เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน และเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ดังรูปที่ 4) แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง สามารถใช้วิธีนี้เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค slot blot ได้ และวิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตได้

สรุปผล

การศึกษานี้ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของ pneumococcal polysaccharides และ CRM_{197} ในวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบ ด้วยวิธี slot blot พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูงต่อ pneumococcal polysaccharides serotype 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F และ carrier protein ชนิด diphtheria cross reactive material (CRM_{197}) จึงสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของโพลีแซคคาไรด์แต่ละซีโรไทป์ และสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของโปรตีนพาหะที่เชื่อมต่ออยู่กับโพลีแซคคาไรด์ได้ อีกทั้งวิธีนี้ยังมีความเที่ยงสูง

โดยผลการทดสอบจากผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบในห้องปฏิบัติการได้

ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค slot blot เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจนจำเพาะเท่านั้น วิธีนี้จึงสามารถตรวจวิเคราะห์ได้เฉพาะแอนติเจนจำเพาะต่อ pneumococcal polysaccharides serotype 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F และโปรตีนพาหะชนิด Diphtheria cross reactive material (CRM_{197}) เท่านั้น หากส่วนประกอบในวัคซีนประกอบด้วยแอนติเจนชนิดอื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ซีโรไทป์อื่น หรือ carrier protein ชนิดอื่น ต้องดำเนินการศึกษาความเหมาะสมของวิธี และศึกษาความถูกต้องของวิธีให้จำเพาะสำหรับแอนติเจนนั้น ๆ ต่อไป และการทดสอบในแต่ละครั้งควรเตรียมสารเคมีใหม่ทุกครั้ง นอกจากนี้การเก็บรักษาสารมาตรฐาน สารแอนติบอดีต้องเก็บรักษาในอุณหภูมิที่กำหนดไว้ และแบ่งสารใส่หลอดทดลองปริมาตรให้เพียงพอสำหรับการนำมาใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง เพื่อลดการแช่แข็งละลายหลายครั้ง (Freeze-Thaw cycle)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค: วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น. กรุงเทพฯ: เวิร์คพริ้นท์; 2562.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal vaccination [Internet]. [cited 2024 Jul 23]. Available from: https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/index.html
3. World Health Organization. Annex 3 recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. Geneva; 2011. Technical Report Series No. 977.
4. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) [Internet]. 2005 [cited 2024 Jul 16]. Available from: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf
5. Bio-Rad Laboratories. Bio-Dot® SF microfiltration apparatus instruction manual [Internet]. [cited 2024 Jul 12]. Available from: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1706542.pdf
6. Brown T. Analysis of RNA by northern and slot-blot hybridization. Curr Protoco Immunology [Internet]. 2001 May;Chapter 10:Unit 10.12 [cited 2024 Jul 18]. Available

from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18432675/#:~:text=Specific%20sequences%20in%20R20RNA%20preparations,by%20slot%20or%20dot%20blotting doi: 10.1002/0471142735.im1012s07. PMID: 18432675

7. Hamm M, Ha S, Rustandi RR. Automated capillary western dot blot method for the identity of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine. Anal Biochem [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 18]; 478:33-9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25813208/ doi: 10.1016/j.ab.2015.03.021. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25813208
8. Skinner JM, Indrawati L, Cannon J, Blue J, Winters M, et al. Pre - clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. Vaccine [Internet]. 2011 [cited 2024 Jul 19]; 29:8870-6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21964055/ doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.078. Epub 2011 Oct 1. PMID: 21964055