

Cập nhật nghiên cứu Enterovirus Research: Chẩn đoán sinh học phân tử và Phát triển Vaccine

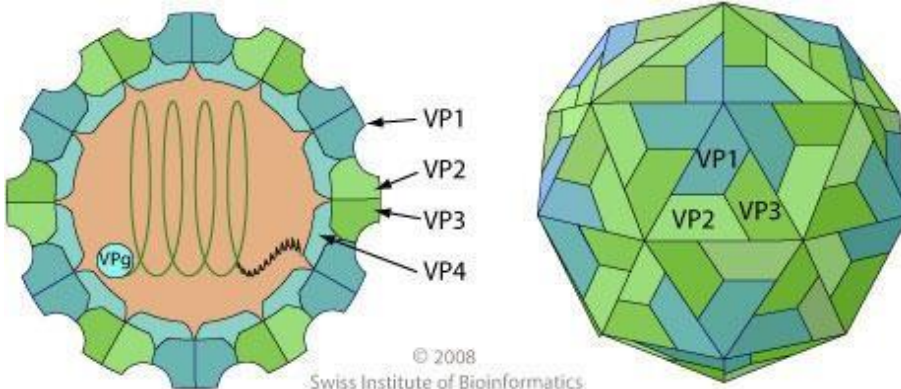
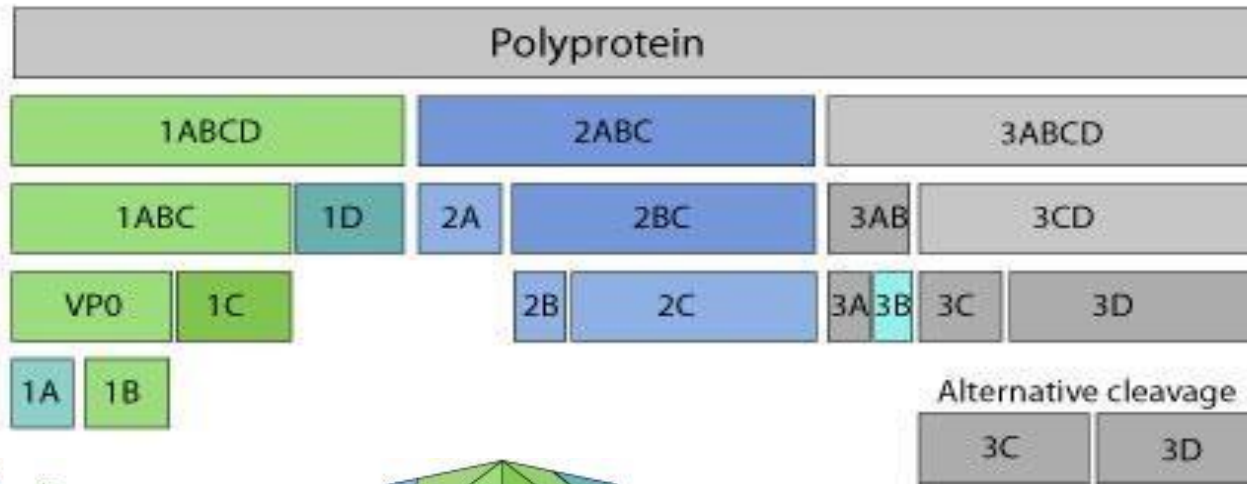
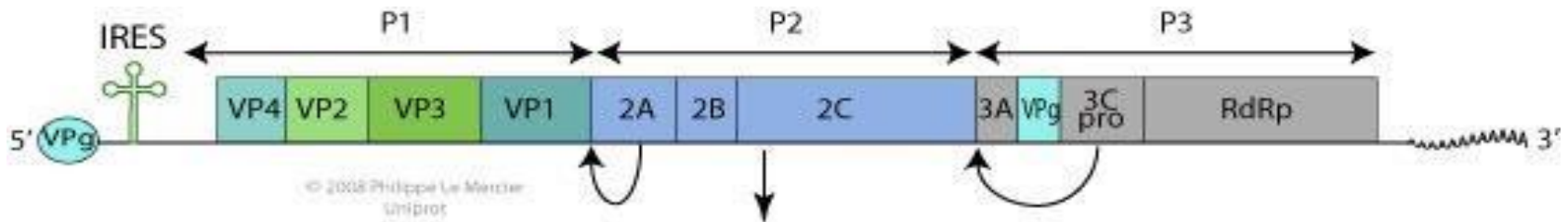
Tài trợ bởi Viện nghiên cứu sức
khỏe quốc gia (NHRI) và Bộ Y Tế
và Phúc Lợi (MOHW) Đài Loan

Min-Shi Lee (李敏西), MPH, PhD



Đại Diện Nhóm Nghiên Cứu Vaccine Enterovirus Viện
Các Bệnh Truyền Nhiễm Và Vaccine Quốc Gia
(NIIDV), Viện Nghiên Cứu Sức Khỏe Quốc Gia (NHRI)
Trúc Nam, Đài Loan

Enterovirus 71: Picornaviridae, 7.5kb ssRNA



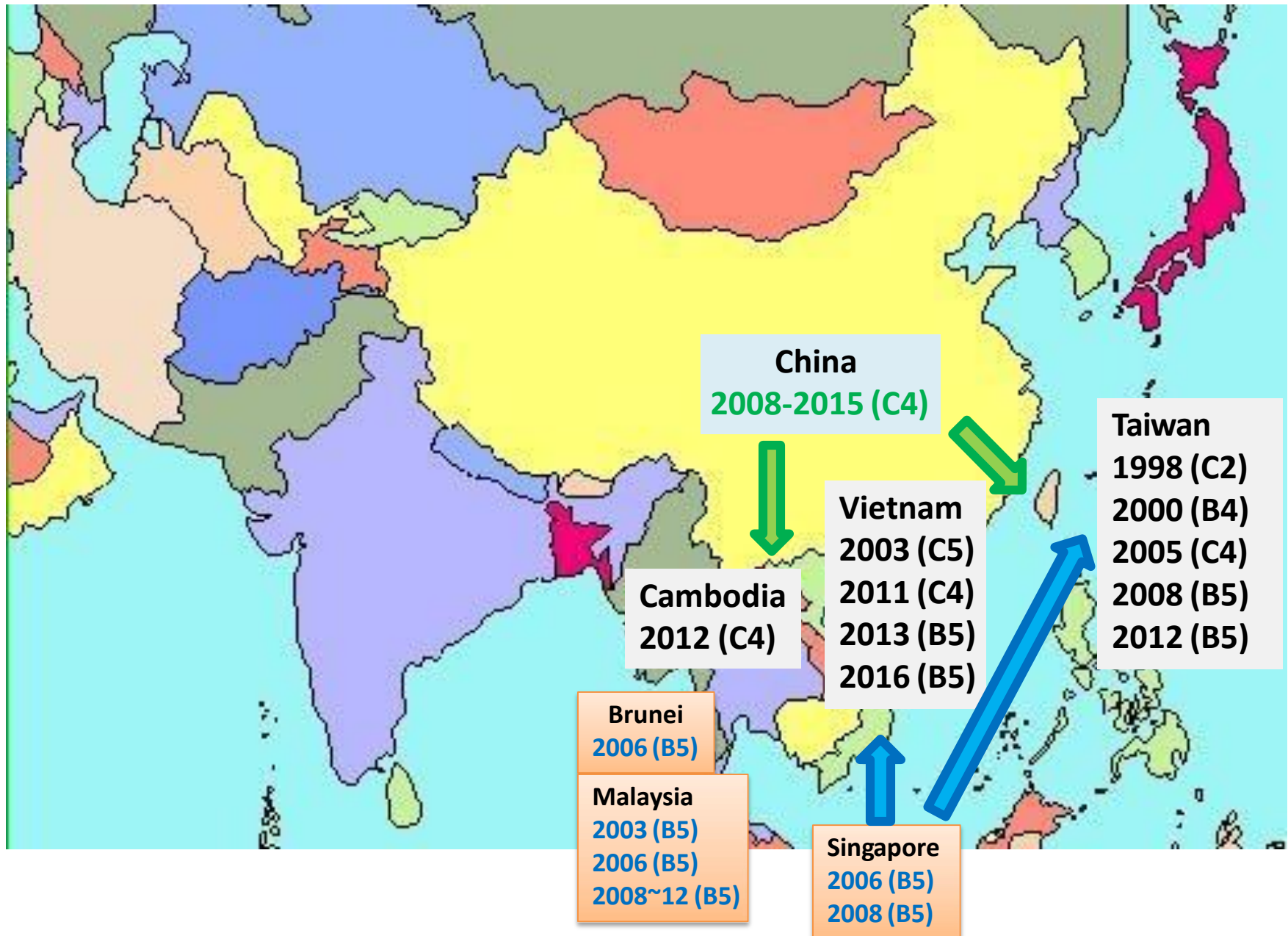
P1: kháng nguyên
P2: sao chép, độc lực
P3: Protease

Loài và Serotypes của Enterovirus ở người (116 serotypes, ICTV 2017)

Loài	Số serotypes	Serotypes
Enterovirus A	25	CA2-8, CA10, CA12, CA14, CA16, EV-A71, EV-A89-91, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121, SV19, SV43, SV46, BA13
Enterovirus B	63	CA9, CB1-6, E1-7, E9, E11-E21, E24-27, E29-33, EV69, EV73-75, EV77-88, EV93, EV97-98, EV100-101, EV106-107.....
Enterovirus C	23	PV1-3, CA1, CA11, CA13, CA17, CA19-22, CA24, EV-C95-96, EV-C99, EV-C102, EV-C104-105, EV-C109, EV-C113, EV-C116
Enterovirus D	5	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111. EV-D120

EV71 được chia làm 3 genogroup (A, B và C) gồm 11 genotypes (A, B1~B5, C1~C5).

Phân bố quốc tế EV-A71 ở Châu Á



So sánh 5 ứng viên vaccine EV71 virus toàn phần bất hoạt ở các thử nghiệm lâm sàng

Tổ chức (Quốc gia)	Virus Genotype	Cell line	Antigen Dosage, ug (methods)	Tình trạng
CDC/NHRI (Taiwan)	B4 ($\sim 10^7$ TCID50/ml)	Vero	L, M, H (total protein)	Phase III (two industry partners)
Sinovac (China)	C4 ($\sim 10^7$ TCID50/ml)	Vero	1 (viral protein by ELISA)	Cấp phép ở China
Beijing Vigoo (China)	C4 ($\sim 10^7$ TCID50/ml)	Vero	0.8 (viral protein by ELISA)	Cấp phép ở China
CAMS (China)	C4 ($\sim 10^7$ TCID50/ml)	KMB- 17	0.25 (viral protein by ELISA)	Cấp phép ở China
Inviragen/Takeda (Singapore)	B2 ($\sim 10^7$ TCID50/ml)	Vero	0.6 and 3.0 (total protein)	Phase I Hoàn tất

Đồng thuận về định lượng antigens của vaccine EV71 là đòi hỏi cấp thiết.

Nhiễm enterovirus nặng tại Taiwan từ năm 2012



台灣地區腸病毒重症偵測 Nguồn: Taiwan CDC

Year	Nghi ngờ	Xác định (tử vong)	Top 3 Serotypes EV (số ca)
2018	211	36 (8)	Echo11(12), EV71(8), CV-A4(2), CV-B1(2)
2017	129	24 (1)	EV-D68(12), CV-A6 (3), CV-A9 (2), CV-B3(2), Echo5 (2), EV71 (2)
2016	142	33 (1)	EV-71 (23), CV-A4 (2), CV-A6 (2), CV-B3 (2)
2015	100	6 (2)	CV-B5 (3), CV-A16 (2), Echo3 (1)
2014	54	6 (1)	CVA2, CVA5, CVA16, CVB5, Echo11, EV71
2013	122	10 (1)	EV71 (6), CVA6 (3), Echo30(1)
2012	294	146 (2)	EV71 (139), CV-A2 (2)
Total		261 (16)	EV71(177), EV-D68(12), Echo11(12), CVA6(8), CVA2(5)

- Dịch EV-D68 diện rộng năm 2014 và dịch bùng phát EV-D68 & EV-A71 năm 2018 tại Bắc Mỹ

Top 5 serotypes của EV tại Taiwan, từ năm 2005 (Taiwan CDC)						
Năm	Số EV phân lập được	Top 1	Top 2	Top 3	Top 4	Top 5
2005	1924	CV-B3 37%	CV-A16 24%	EV-A71 18%	CV-A6 6%	CV-A5 4%
2006	1303	CV-A2 19%	CV-A5 15%	CV-A4 15%	ECHO-18 15%	CV-B2 10%
2007	856	CV-A6 25%	CV-A10 21%	CV-A16 19%	CV-A4 7%	ECHO-6 5%
2008	670	CV-A2 34%	EV-A71 27%	CV-B4 11%	CV-A16 4%	CV-B1 3%
2009	1431	CV-A6 29%	CV-A4 25%	CV-A6 17%	CV-A5 12%	CV-A5 5%
2010	1742	CV-A16 30%	CV-A4 20%	CV-A6 17%	CV-A5 12%	CV-B1 3%
2011	3315	CV-A10 45%	CV-A9 18%	CV-A4 9%	CV-B5 9%	EV-A71 9%
2012	2250	EV-A71 39%	CV-A2 19%	CV-B3 12%	CV-A4 7%	ECHO-6 6%
2013	1463	CV-A16 31%	CV-A4 9%	CV-B4 8%	CV-B2 6%	CV-A10 5%
2014	1147	CV-A10 32%	CV-A4 19%	CV-B4 8%	CV-B2 6%	CV-A9 8%
2015	1036	CV-A16 32%	CV-A4 16%	CV-A6 15%	CV-A5 10%	ECHO-6 3%
2016	1843	CV-A10 29%	CV-A5 18%	CV-A2 16%	CV-A4 7%	CV-A16 5%

So sánh các phương pháp phân tử để phát hiện sớm và xác định serotype của Enterovirus từ mẫu phết họng của bệnh nhi

Pai-Shan Chiang^{1,2}, Mei-Liang Huang^{1,2}, Shu-Ting Luo¹, Tzou-Yien Lin^{2,3}, Kuo-Chien Tsao^{4,5}, Min-Shi Lee^{1*}

¹ National Institute: Taoyuan, Taiwan, ³ and Laboratory Sci

Table 3. Evaluation of three diagnostic methods for detection of enteroviruses in 110 clinical specimens.

⁴ Memorial Hospital, Medical Biotechnology Taiwan

Consensus result*	Virus isolation		5'UTR RT-PCR		VP1 CODEHOP	
	+	–	+	–	+	–
+	37	10	43	4	44	3
–	2	61	9	54	2	61
Sensitivity	0.787		0.915		0.936	
Specificity	0.968		0.855		0.968	
PPV	0.949		0.827		0.957	
NPV	0.859		0.930		0.953	
Agreement	0.891		0.881		0.955	

PPV: positive prediction value; NPV: negative prediction value. * Consensus results were based on the majority results of the three methods evaluated.
doi:10.1371/journal.pone.0048269.t003

RESEARCH ARTICLE

Tiếp cận bằng sinh học phân tử trong giám sát Enterovirus tại miền Bắc Đài Loan, 2008-2012

Wan-Yu Chung¹, Pai-Shan Chiang¹, Shu-Ting Luo¹, Tzou-Yien Lin^{2,3}, Kuo-Chien Tsao^{4,5}, Min-Shi Lee^{1*}

Table 1. Annual positive rates for enterovirus detection by two different laboratory methods, 2008–2012.

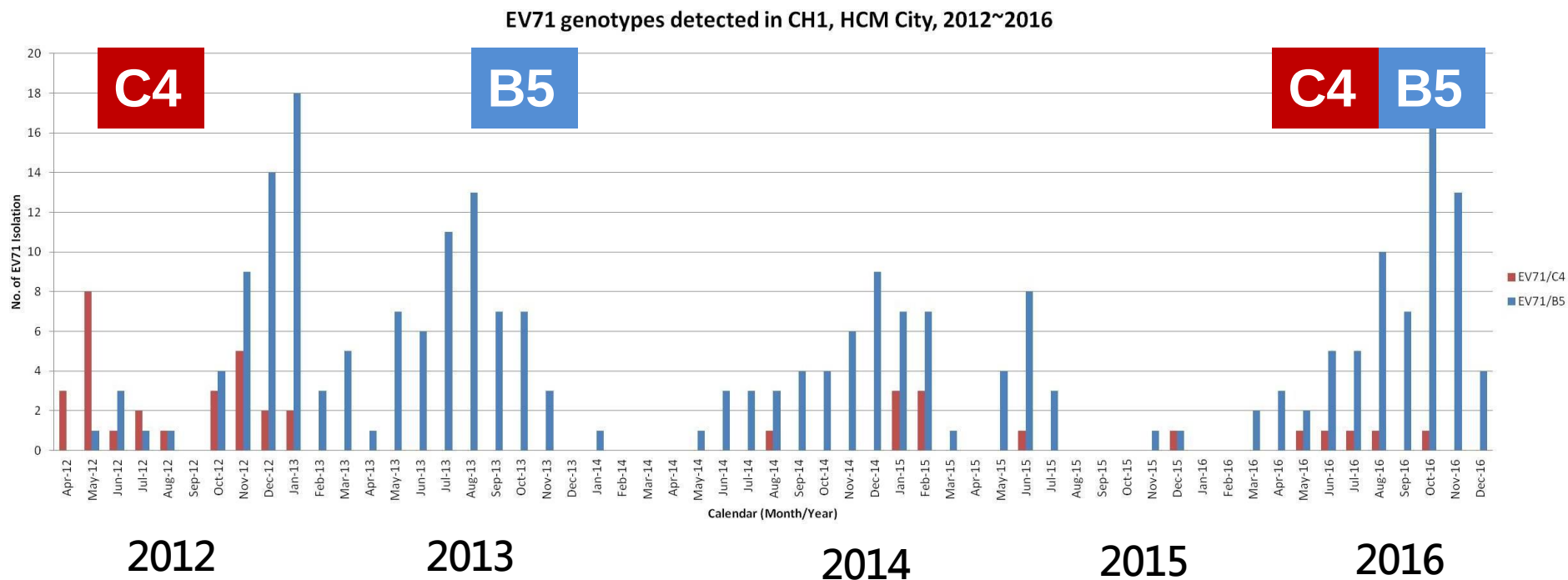
Year	Virus isolation		VP1-CODEHOP test	
	n/N	%	n/N	%
2008	18/61	29.5%	22/61	36.1%
2009	21/49	42.9%	26/49	53.1%
2010	89/160	55.6%	112/160	70.0%
2011	40/86	46.5%	47/86	54.7%
2012	40/75	53.3%	43/75	57.3%
Total	208/431	48.3%	250/431	58.0%

doi:10.1371/journal.pone.0167532.t001

Đánh giá 2 phương pháp chẩn đoán trong giám sát enterovirus tại BV. NĐ1, TP. HCM, Vietnam

Năm	Phân lập virus (BVNĐ1, Vietnam)			CODEHOP (NHRI, Taiwan)		
	No. tested	EV Dương (%)	EV-A71 (%)	No. tested	EV Dương (%)	EV-A71 (%)
2011	54	21 (38.9)	16 (29.6)	54	44 (81.5)	29 (53.7)
2012	409	79 (19.3)	28 (6.8)	409	266 (65.0)	60 (14.7)
2013	412	173 (42.0)	66 (16.0)	412	226 (54.9)	83 (20.1)
2014	521	120 (23.0)	14 (2.7)	521	310 (59.5)	35 (6.7)
2015	356	125 (35.1)	34 (9.6)	356	234 (65.7)	39 (11.0)
2016	324	99 (30.5)	17 (5.2)	325	217 (66.8)	74 (22.8)
2017	250	36 (14.4)	4 (1.6)	50	22 (44.0)	2 (4.0)

Genotypes của EV71 phát hiện tại BVNĐ1, TPHCM, 2012~2016



Phân bố top 5 enteroviruses trên bệnh nhi nội trú bằng phương pháp VP1-CODEHOP, BVND1, TPHCM, Vietnam

NĂM	No. tested	Top 1 N (%)	Top 2 N (%)	Top 3 N (%)	Top 4 N (%)	Top 5 N (%)
2011	54	EV-A71 29 (55.6)	CV-A6 1 (1.9)			
2012	409	CV-A6 141 (34)	EV-A71 60 (15)	CV-A16 37 (9)	CV-A10 8 (2)	CV-A4 6 (1.5)
2013	412	EV-A71 83 (20)	CV-A10 47 (11.4)	CV-A6 29 (7)	CV-A16 20 (4.9)	CV-A12 9 (2.2)
2014	521	CV-A6 139 (27)	CV-A10 64 (12)	CV-A16 40 (8)	EV-A71 35 (6)	CV-A5 9 (2)
2015	356	CV-A6 82 (23)	CV-A16 46 (13)	EV-A71 39 (11)	CV-A4 20 (5.6)	CV-A2 15 (4)
2016	325	EV-A71 74 (22.8)	CV-A10 67 (20.6)	CV-A16 18 (5.5)	CV-A8 14 (4.3)	CV-A6 10 (3.1)
Vietnam 2012-16	2077	CV-A6	EV-A71	CV-A10	CV-A16	
Taiwan 2008-12	431	CV-A16	CV-A6	EV-A71		

Hướng dẫn giám sát enterovirus. Hướng dẫn giám sát enterovirus với sự hỗ trợ của Sáng kiến loại trừ bại liệt (Polio Eradication Initiative (2015)

English (PDF, 376.1 KB)

2015, vi + 46 pages

ISBN 978 92 890 5081 4

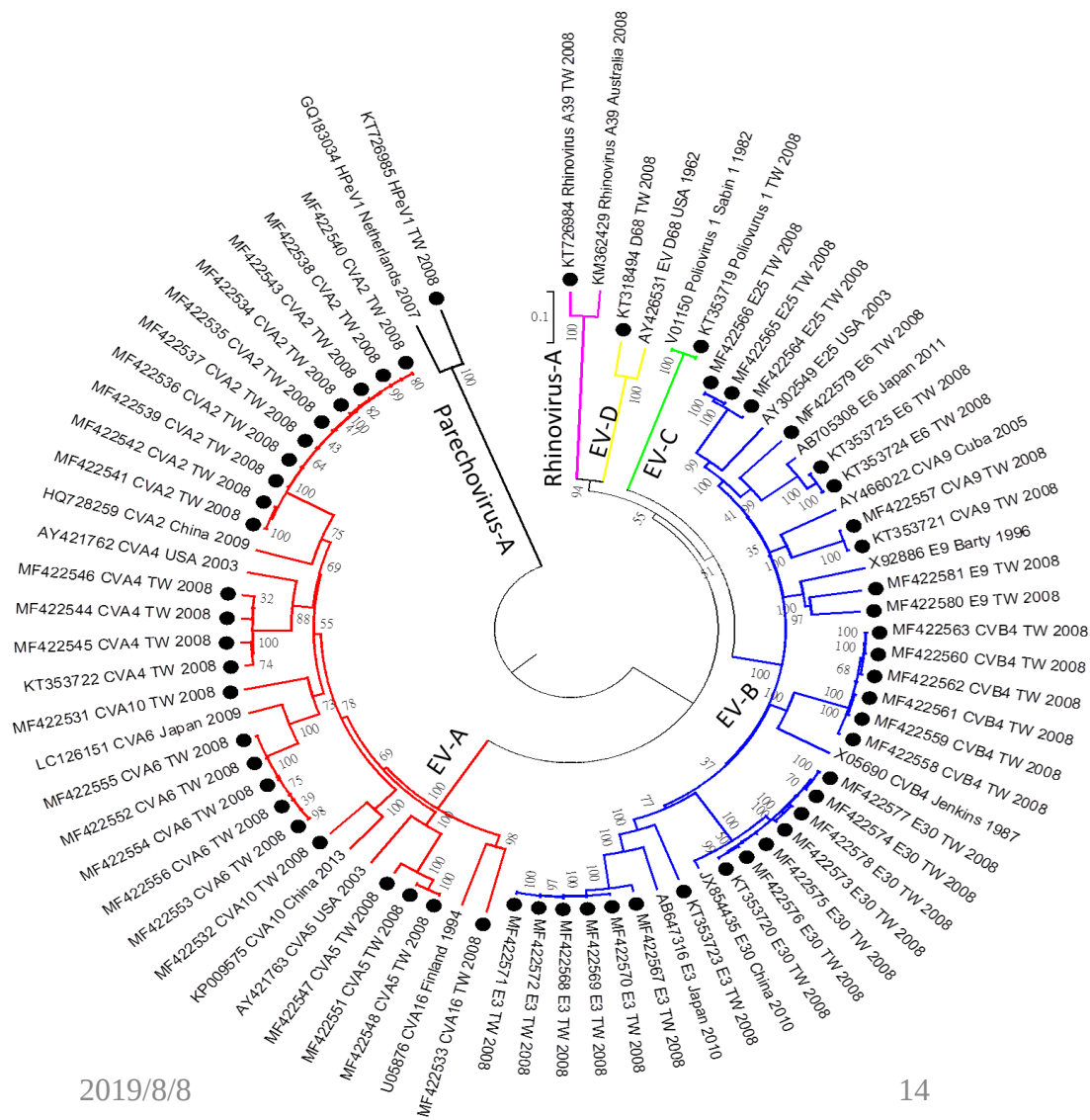
This publication is only available online.



The strategy for achieving polio eradication and maintaining polio-free status until global certification of eradication is complete has two major components: establishing high population immunity to polioviruses through immunization, and detecting and rapidly responding to poliovirus cases through high-sensitivity surveillance. While surveillance for acute flaccid paralysis is considered the "gold standard" for countries that were endemic or recently endemic for poliovirus, other surveillance strategies and data have been accepted from countries with a long history of non-endemicity, high levels of sanitation and strong health systems. This includes combinations of: surveillance for "poliomyelitis cases" and cases of vaccine-associated paralytic poliomyelitis, environmental surveillance for polioviruses and/or enterovirus surveillance.

These guidelines, devised by the WHO Regional Office for Europe and the United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC), provide national decision-makers and their technical advisors with information on the principles and practices of adopting enterovirus surveillance to support the Polio Eradication Initiative. The guidelines will help them decide if an enterovirus surveillance system could be established, or existing systems modified, that would meet both disease-control and programmatic requirements.

Phân tích bộ gene của Enteroviruses không phân serotype sử dụng giải trình tự gene thế hệ mới



- 59 bộ gen EV từ 51 mẫu, bao gồm cả 8 trường hợp đồng nhiễm.
- So sánh với các bộ gene virus ở những khu vực chung, có 29 biến thể gene (<90% đồng nhất) được xác định bằng tái tổ hợp liên serotypes.

EV-A : CV-A2, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A9, CV-A10, CV-A16

EV-B : CV-B4, E3, E6, E9, E25, E30

EV-C : PV-1

EV-D : EV-D68

RV-A : RV-A39

HPeV-A : HPeV-1

**EV-D68 được phân thành 3 dòng sau khi
canh chỉnh dữ liệu bộ gene:**

- 1) Dòng 1:** 2 markers mất đoạn ở 5'UTR
- 2) Dòng 2:** không mất đoạn
- 3) Dòng 3:** mất đoạn 24-nucleotide ở 5'UTR
và mất đoạn 3-nucleotide ở VP1

**Xác định Genotype (trình tự VP1): A1-A2, B0-
B3**

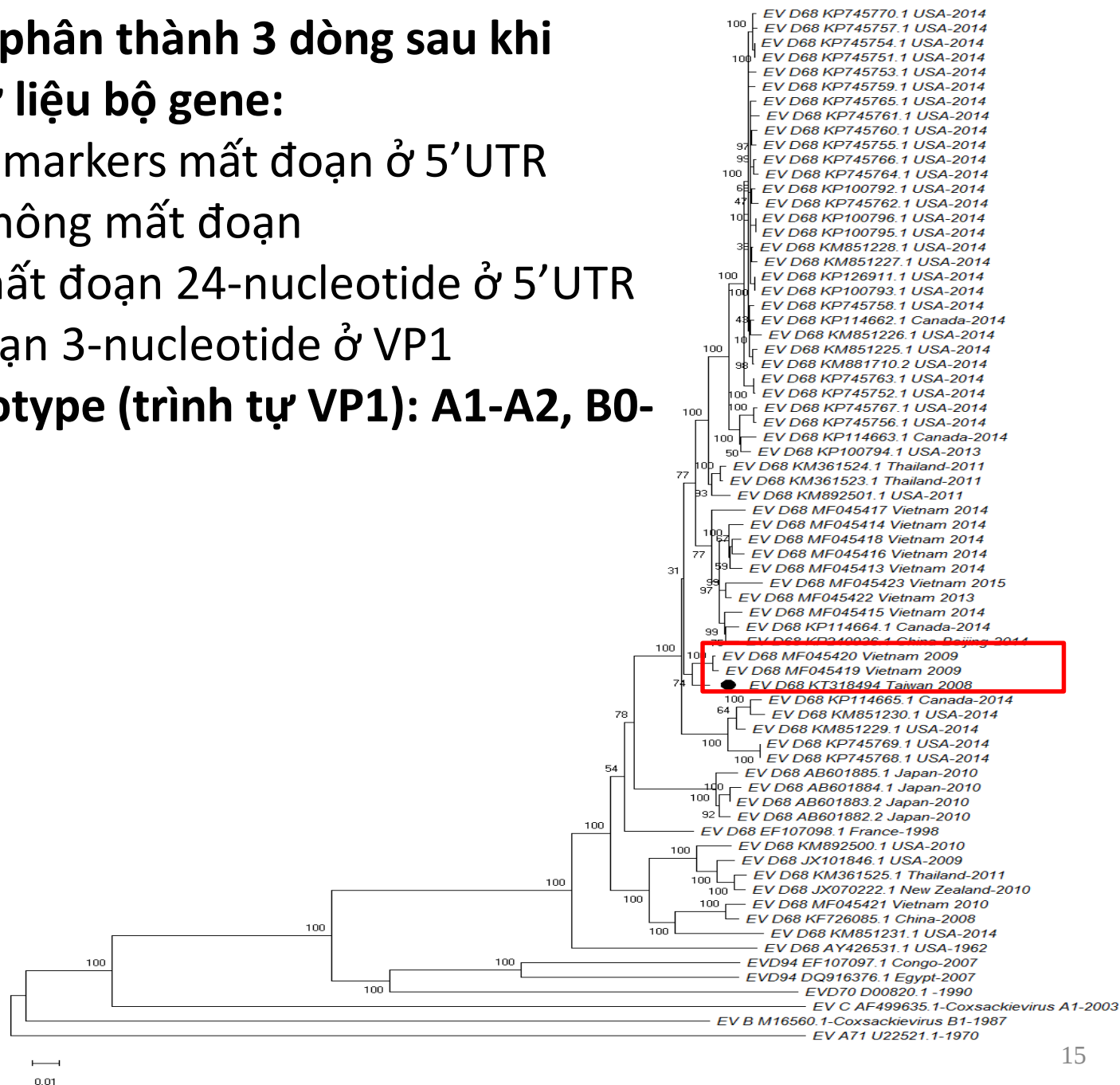


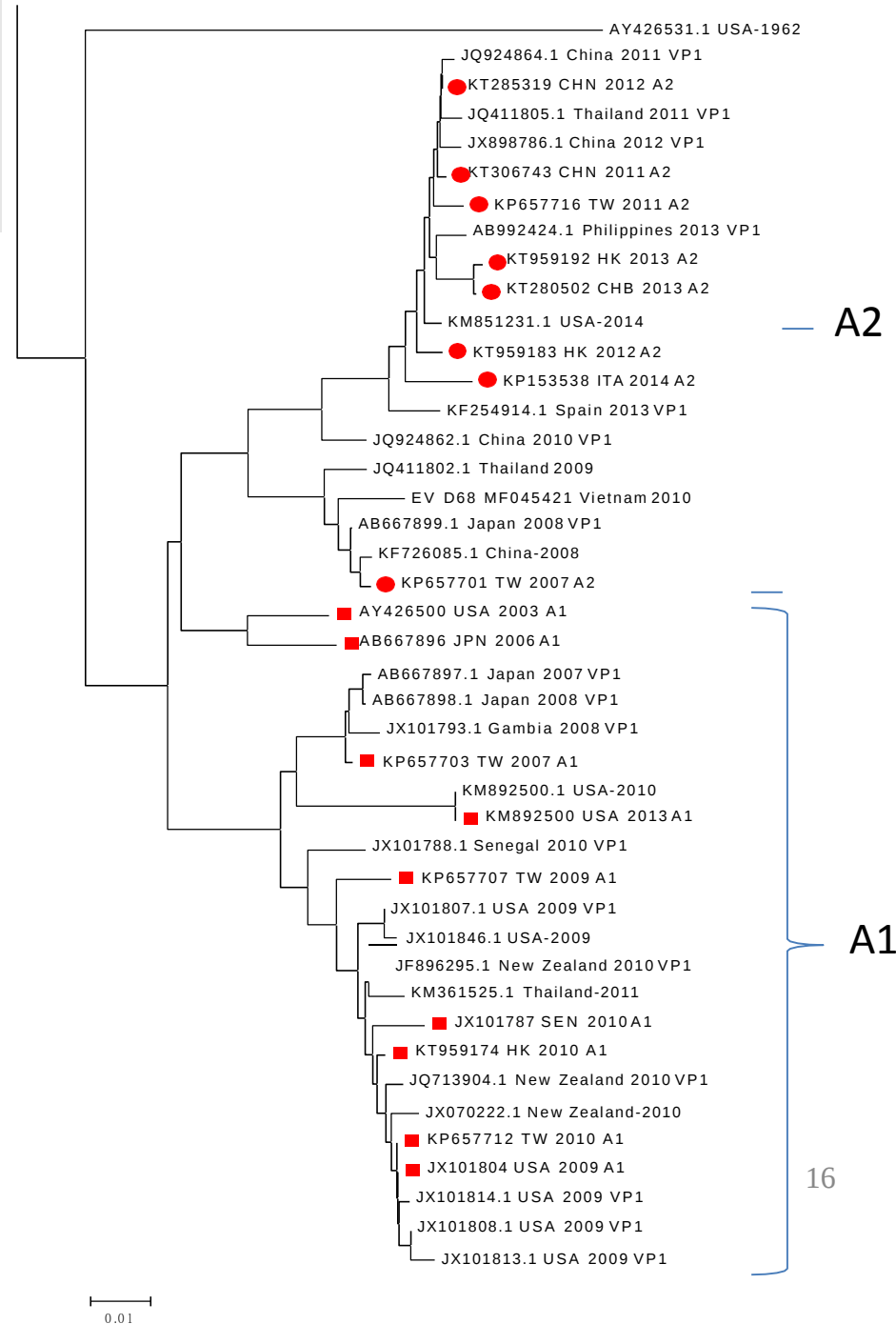
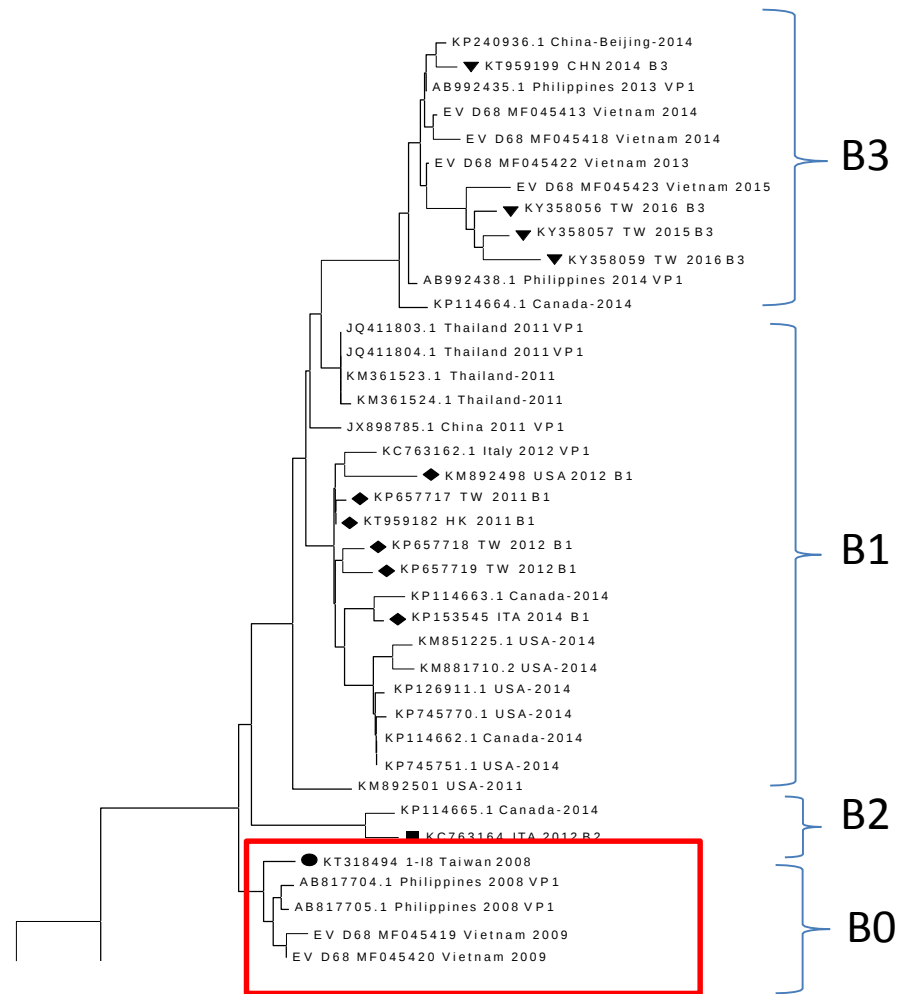
Table 1 Genotyping of Taiwan EV-D68 isolates, 2007–2016.

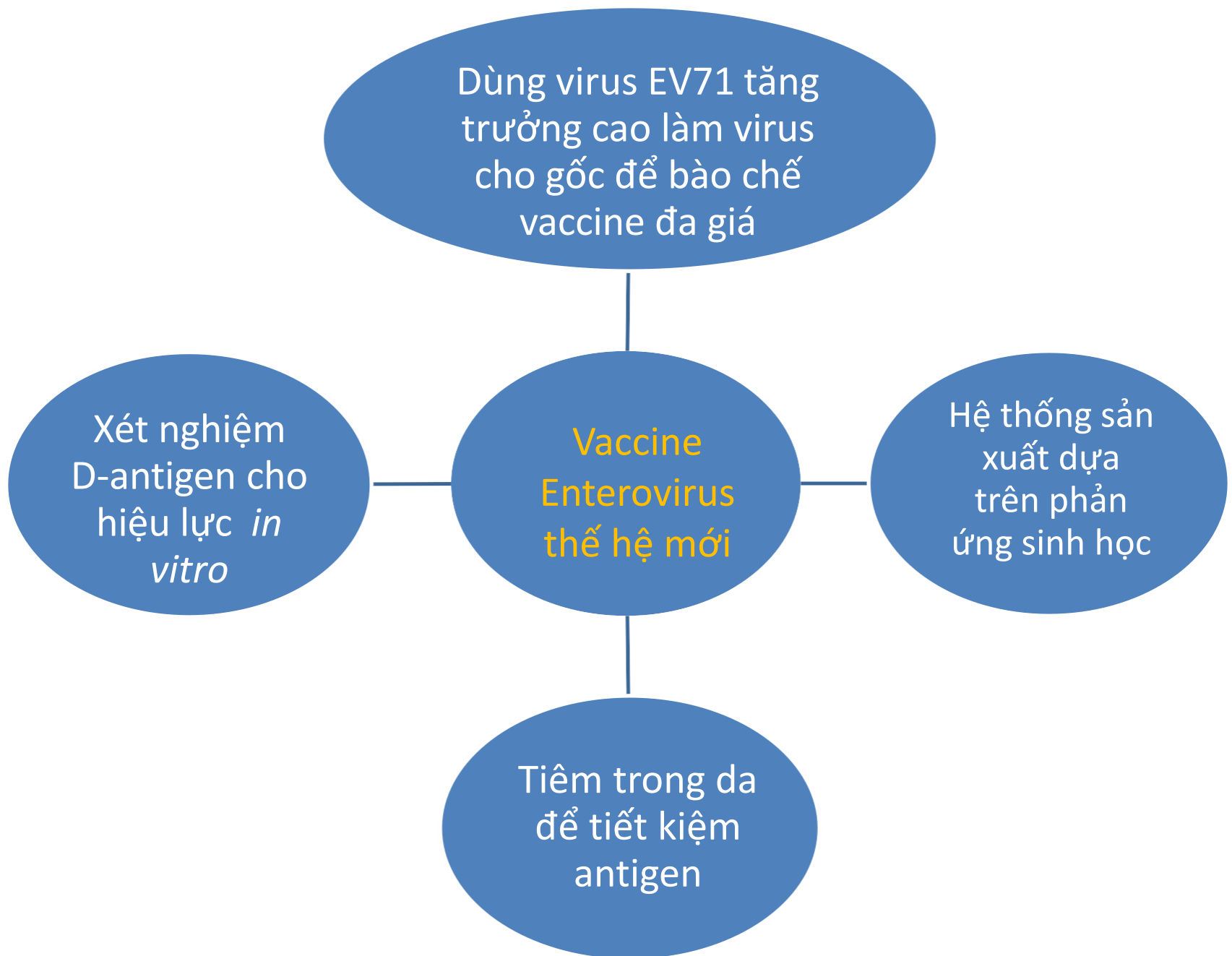
Subclade	Number of isolates by year									
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
A1	10		1	16	1		3			
A2	2		1	2	3					1
B1					7	2				
B2										
B3								8	16	11
B ^a	5	3								

^a The clade B strains before 2009 did not belong to B1, B2 or B3.

The subclades were categorized by partial VP1 sequence (340 nucleotides).

Wei HY, Yeh TK, Hsieh JY, Lin IP, Yang JY. J Microbiol Immunol Infect. 2018





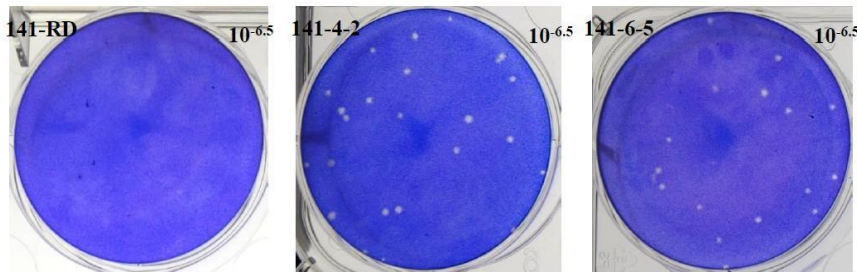
Chiến lược phát triển Vaccine Enterovirus đa giá

- Phát triển riêng lẻ nhiều tế bào Vero – tương thích với các virus vaccine tăng trưởng cao rồi sau đó kết hợp lại (tốn thời gian)
- Phát triển các virus EV71 tăng trưởng cao trong các tế bào Vero và tổng hợp nhiều virus vaccine tăng trưởng cao bằng di truyền ngược (RG)

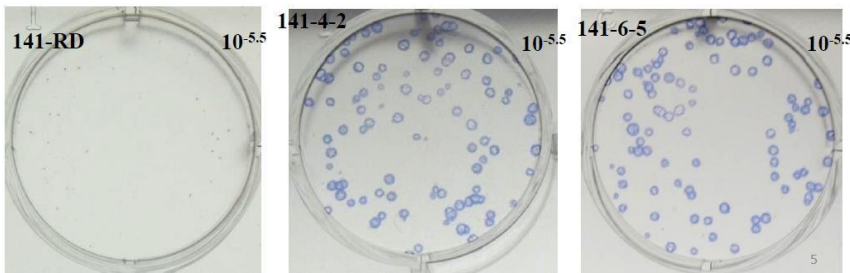
Phát triển vaccine enterovirus đa giá bằng di truyền ngược

- Phát triển virus vaccine EV71 tăng trưởng cao trong tế bào Vero (Chia MY et al. 2018)
- Thiết lập nền tảng di truyền ngược (RG) sử dụng virus vaccine tăng trưởng cao như một virus cho gốc
- Tổng hợp các virus vaccine tăng trưởng cao cho nhiều serotype của enterovirus bằng nền tảng di truyền ngược

Hiệu giá virus và hình thái mảnh bám gốc và (B5-141-R D) và tế bào Vero tương thích EV71 viruses (B5-141-4-2 và B5-141-6-5)



Immunoplaque assay in Vero cells cultured in 12-well plates using VP-SFM (6 DPI)



Chủng Virus	Hiệu giá virus (log ₁₀ PFU/mL) Xét nghiệm mảnh bám	Hiệu giá virus (log ₁₀ PFU/mL) Xét nghiệm mảnh bám- miễn dịch
B5-141-RD	Too small to count	Too small to count
B5-141-4-2	8.15	8.13
B5-141-6-5	7.97	8.09

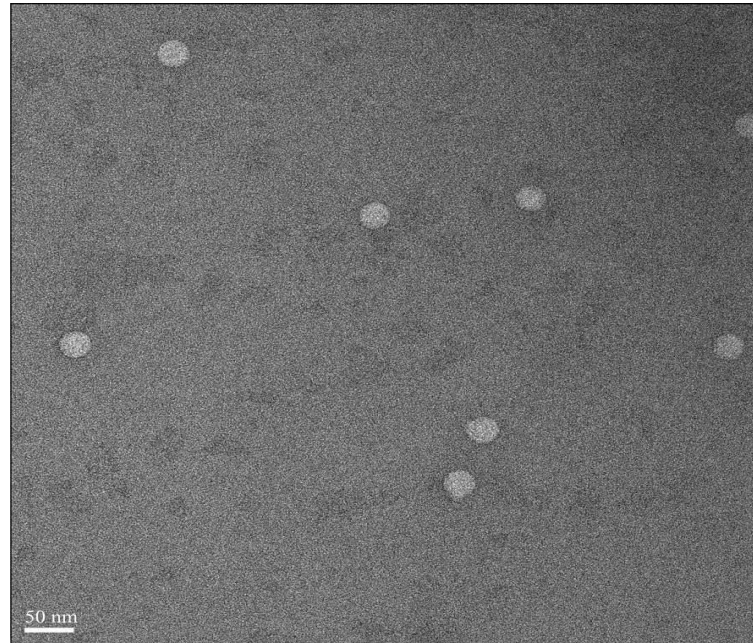
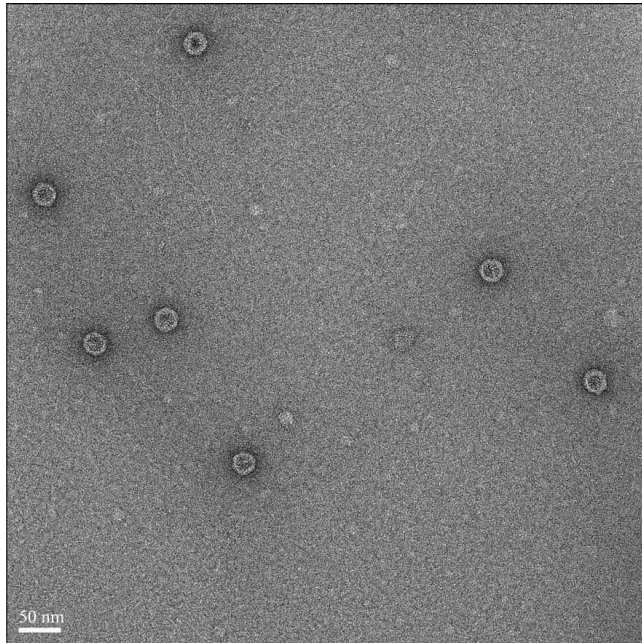
Bảng sáng chế Taiwan tháng 10, 2018; Chia MY et al. Vaccine 2018

Đỉnh hiệu giá virus của EV71 B5-141-6-5 với Hệ thống cấy tế bào Vero bằng microcarrier

	Run 1	Run 2	Run 3
Working volume	370	400 mL	380 mL
Tỷ trọng Microcarrier	5 g/mL	5 g/mL	5 g/mL
Tỷ trọng tế bào trước nhiễm	1.6×10^6 cells/ml	2.7×10^6 cells/ml	1.9×10^6 cells/ml
Thời gian thu được (ngày sau nhiễm)	5	5	6
Hiệu giá virus(Log 10 Tissue Culture Infectious Dose TCID₅₀/mL)	7.9	8.2	8.3

Bảng sáng chế Taiwan tháng 10, 2018; Chia MY et al. Vaccine 2018

Hình chụp các phần tử virus EV71 được tinh lọc bằng siêu ly tâm



Hiệu giá kháng thể trung hòa trong máu ở thỏ được tiêm 2 liều ứng viên vaccine EV71 genotype B5 kèm tá được Alum

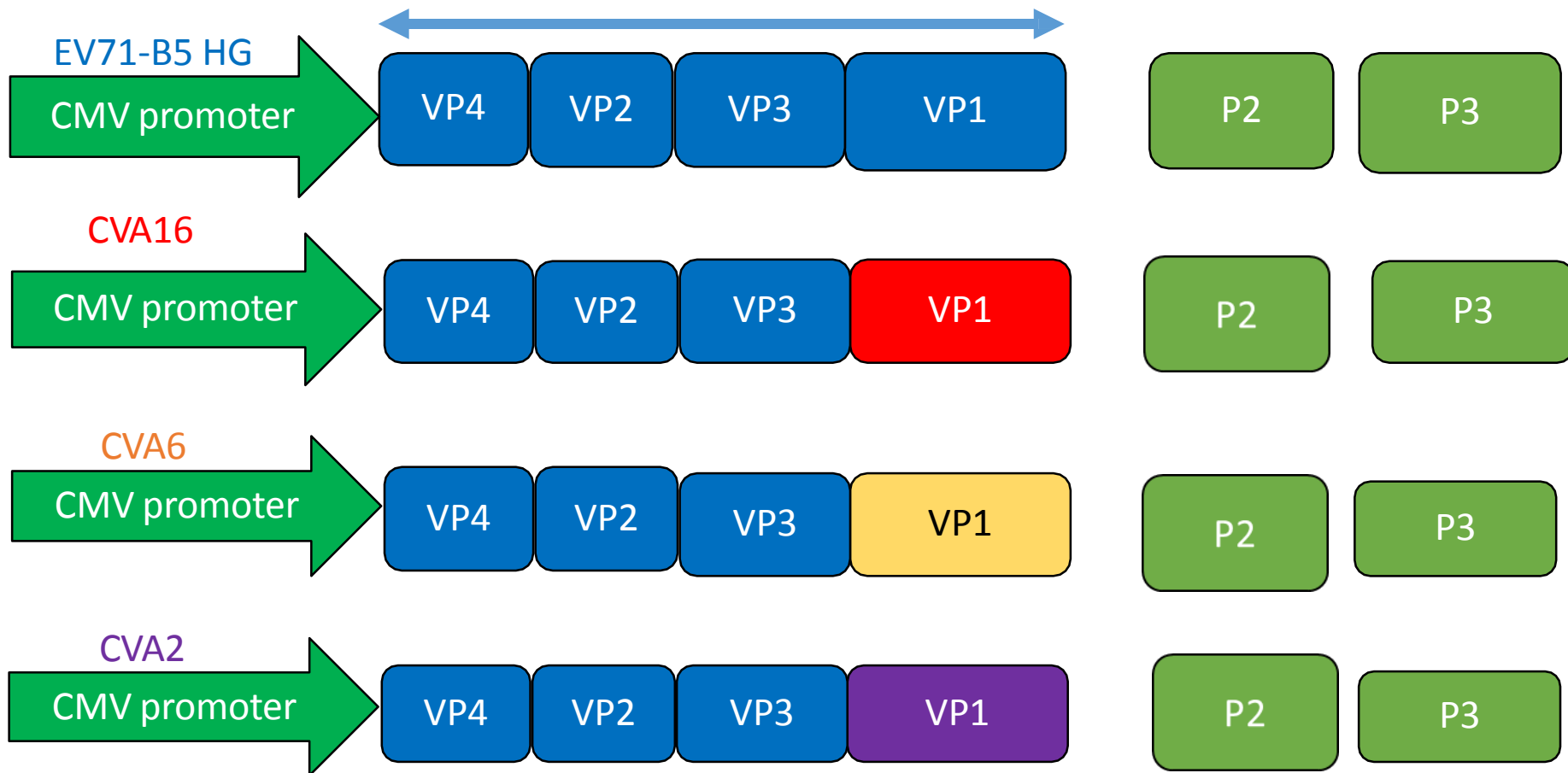
EV71 Genotype	Phần tử rỗng		Phần tử đặc	
	0.05 µg	0.25 µg	0.05 µg	0.25 µg
A	<8	<8	<8	8
B5	45	181	91	362
C4a	23	32	45	64

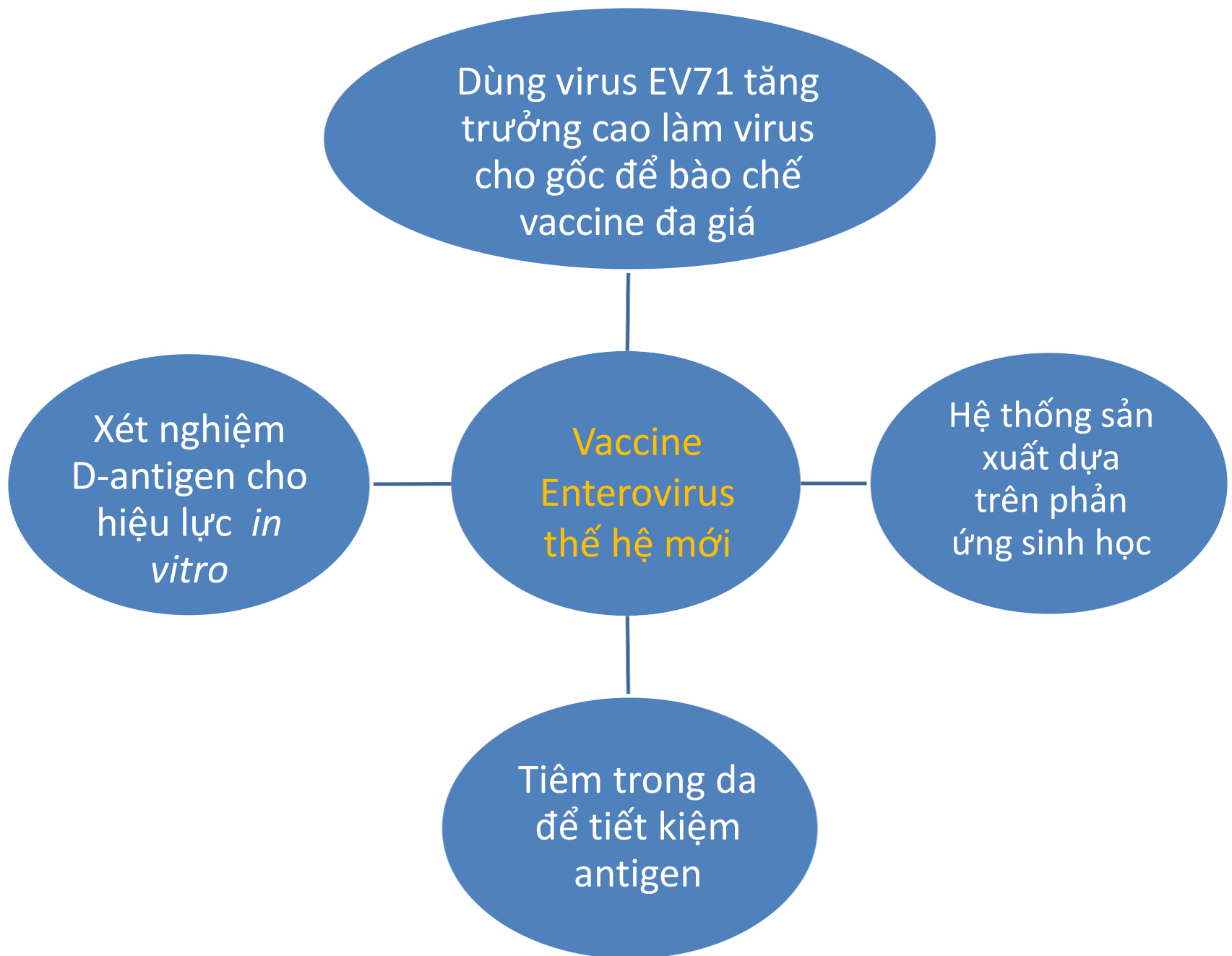
2 thỏ mỗi nhóm và liều dựa vào nồng độ protein toàn phần.

Bằng sáng chế Taiwan tháng 10, 2018; Hiệp ước hợp tác sáng chế (Patent Cooperation Treaty) với China và các nước châu Á khác; Chia MY et al. Vaccine 2018

Phát triển vaccine EV đa giá bằng di truyền ngược

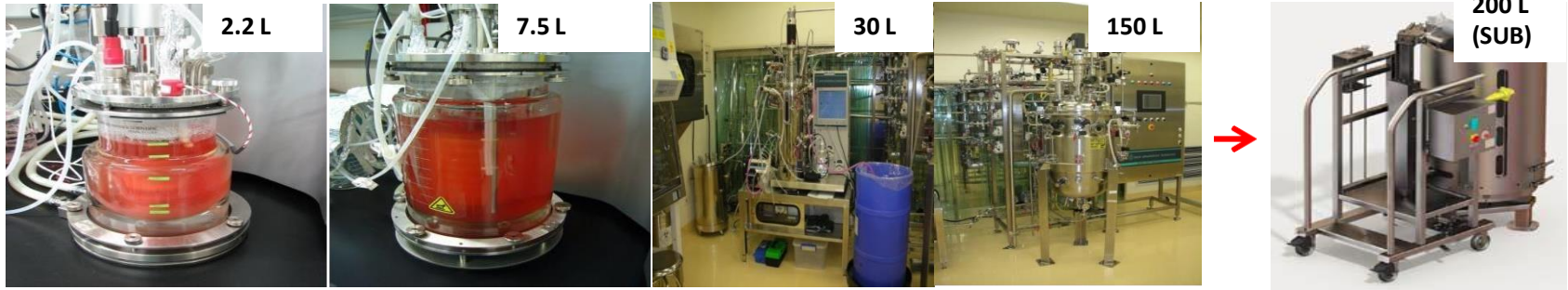
Structural Protein



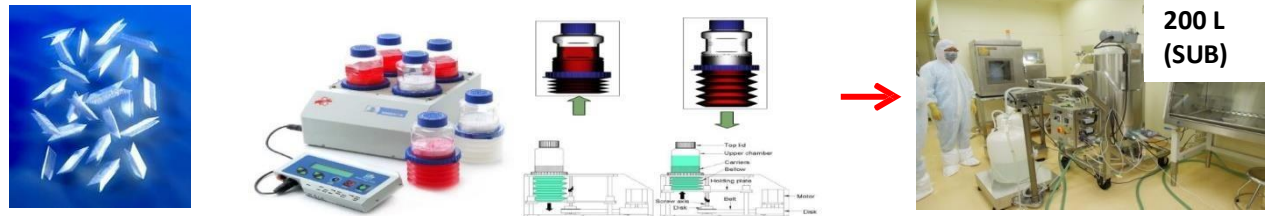


Nền tảng trước lên men (upstream) trong sản xuất vaccines virus tại NHRI, Taiwan

Microcarrier-based Bioreactor



TideCell Bioreactor (Collaboration with Medigen Vaccinology Inc.)



Roller bottle



Nền tảng tinh chế trong sản xuất vaccines virus tại NHRI, Taiwan

Ultracentrifugation (siêu ly tâm) (CP-80 and CC-40, Hitachi, Japan)

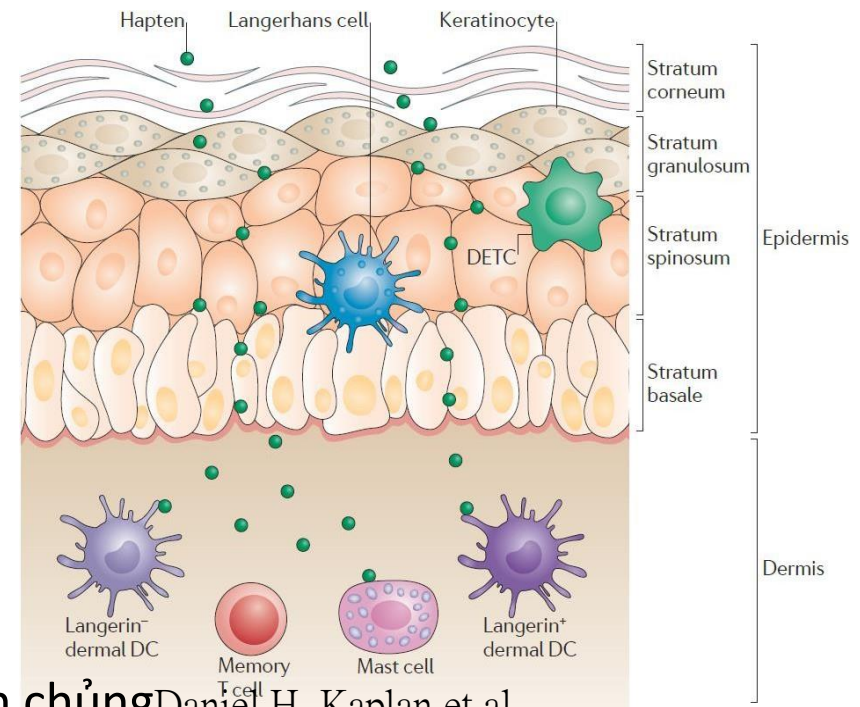


Chromatography
(sắc ký)



Tại sao tiêm trong da

- Lớp bì và thượng bì da người có nhiều **tế bào biểu hiện antigen**
- Thay vì tiêm bắp hoặc tiêm dưới da, tiêm vaccine vào những lớp này **hiệu lực cao hơn và gây đáp ứng miễn dịch bảo vệ** với lượng nhỏ antigen vaccine.
- Hiệu ứng tiết kiệm liều
- Đặc biệt ý nghĩa với chương trình tiêm chủng **ở các nước thu nhập thấp-trung bình** do có thể làm giảm giá thành
- Tăng **vaccine hiện hữu** ở những nơi có khả năng sản xuất hạn chế, Và mang lại hiệu quả chủng ngừa cao hơn.



Daniel H. Kaplan et al.,
the induction of allergic contact dermatitis,
Nature Reviews Immunology, 2012

Darin Zehrung and Debra Kristensen., Program for Appropriate
Technology in Health, 2009

Hiệu ứng tiết kiệm liều khi tiêm trong da

thường 10~20% liều chuẩn

Vaccine	Trials comparing equivalent doses delivered ID vs. IM/SC			Trials comparing reduced-dose (RD) delivered ID vs. full-dose (FD) IM/SC			Number of trials
	ID superior to IM/SC	ID equivalent to IM/SC	ID inferior to IM/SC	RD ID superior to FD IM/SC	RD ID equivalent to FD IM/SC	RD ID inferior to FD IM/SC	
Influenza (seasonal)	2	3	0	0	7	1	13
Rabies	2	2	0	1	21	8	34
Hepatitis B	1	5	0	0	9	11	26
Hepatitis A	0	0	0	0	2	1	3
Polio (IPV)	0	0	0	0	3	0	3
Measles	0	0	1	0	3	4	8
YF ^a , TBE, DTP, TT	1	0	0	0	3	0	4
TOTAL	6	10	1	1	48	25	91
	6/17	10/17	1/17	1/74	48/74	25/74	

Tiêm trong da Cúm trên thị trường:



Giảm liều tiêm trong da không kém hiệu quả hơn liều tiêm bắp chuẩn

a. YF, yellow fever; TBE, tick-borne encephalitis; DTP, diphtheria-tetanus-pertussis; TT, tetanus toxoid

Intradermal Delivery of Vaccines A review of the literature and the potential for development for use in low- and middleincome countries

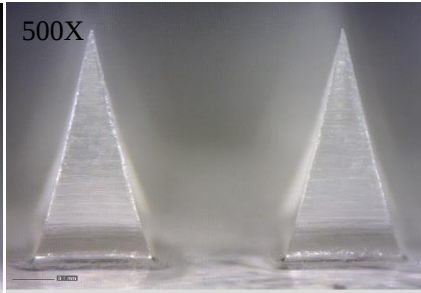
Darin Zehrung and Debra Kristensen., Program for Appropriate Technology in Health, 2009

Miếng dán da với kim siêu nhỏ được phát triển bởi WinCoat

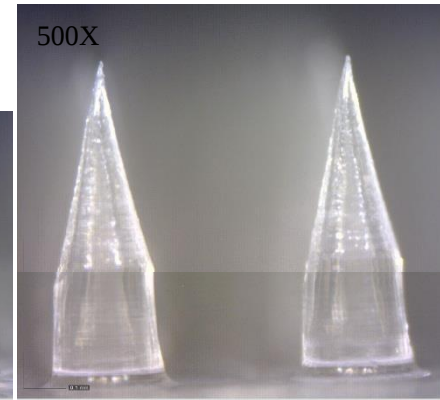
Nón



Tháp



Trụ



Ghi nhận và Cảm ơn

- NIIDV: EV71 Vaccine R&D Team and Scientific Advisors
- IPH, NHRI (Dr J-Y Lin, Dr Y-J Liao, Dr B-Y Liao, Dr C. Hsiung)
- MOHW, Taiwan
- MOST, Taiwan
- CDC, Taiwan
- FDA, Taiwan
- CDE, Taiwan
- CGCH, Taoyuan, Taiwan (Dr T-Y Lin, K-C Tsao)
- NCKU, Tainan, Taiwan (Dr Jen-Ren Wang)
- Academia Sinica, Taiwan (Dr M-S Ho, Dr W-H Chang)
- NIID, Japan (Dr Hiro Shimizu)
- CH1, HCM City, Vietnam
- NIBSC, UK (Dr Javier Martin)
- PATH, US (Dr Kutub Mahmood)

May 2016, Seattle, USA

