



## สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

การพัฒนาวิธีทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัส  
เพื่อการคัดกรองสำหรับการเตรียมความพร้อมสำหรับการเตรียม IVIG

Development of flow-based assay to screen antibody dependent enhancement (ADE) to  
EV71 for hyperimmune-IVIG preparation

บุญรัตน์ ทศนียไทรเทพ

Boonrat Tassaneetrithep

อาทิตย์ วงศ์ษา

Artit Wongsas

ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านการถ่วงดุลย์ทางอิมมูโนโลยี  
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

“โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)”

ความเห็นและข้อเสนอแนะที่ปรากฏในเอกสารนี้เป็นของผู้วิจัย มิใช่ ความเห็นของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

พฤศจิกายน 2560

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยและอาสาสมัครในโครงการทุกท่าน อาจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ จงกลวัฒนา หัวหน้าภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด อาจารย์แพทย์หญิง กุลวรา กิตติสาราศ คุณสมบุรณ์ เล็กมาก คุณสุภาต จิตจำนงชัย คุณเอกราช รุ่งเรือง คุณสมาพร ถ้ำเพชร คุณอำพร วงศ์ภัทรนนท์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัคร

รวมทั้งคุณทองคุณ เพียงพรม และคุณชิตชนก ฤทธิ์คำรพ ที่ได้ช่วยบริหารจัดการ และประสานงานการเก็บตัวอย่าง และช่วยดำเนินการทางห้องปฏิบัติการตลอดโครงการให้ประสบผลสำเร็จตามเป้าหมายอย่างดียิ่ง

## บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อไวรัสมือเท้าปาก (Hand-foot-mouth disease, HFMD) เป็นโรคที่พบบ่อยในเด็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งอายุต่ำกว่า 5 ปี โดยเชื้อที่เป็นสาเหตุหลัก คือ coxsackie A6 และ 16 (CA6, 16) และ enterovirus71 (EV71) อาการเริ่มด้วยอาการไข้ อ่อนเพลีย มีผื่นแดงหรือตุ่มน้ำใสขึ้นบริเวณเพดานปาก ลิ้นและกระพุ้งแก้ม ฝ่ามือ ฝ่าเท้า แล้วจะแตกเป็นแผลอย่างรวดเร็ว อาการเหล่านี้มักจะหายได้เองภายใน 5-10 วัน แต่ผู้ป่วยบางรายมีอาการติดเชื้อที่มีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและมักเกิดจากเชื้อ EV71 ได้แก่ เยื่อหุ้มสมอง สมองส่วนกลางอักเสบ ภาวะกล้ามเนื้ออ่อนแรงเฉียบพลัน ภาวะบวมในปอด และภาวะระบบหายใจและหัวใจล้มเหลวเฉียบพลัน ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่มีอัตราการตายสูงมาก และยังไม่มียาหรือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคนี้ การติดเชื้อโดยธรรมชาติมักกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สร้างภูมิคุ้มกันที่เฉพาะที่สามารถจดจำเชื้อชนิดนั้นได้ ได้แก่ แอนติบอดี และ/หรือ เซลล์ลิมโฟไซต์ที่จำเพาะต่อเชื้อโรคนั้นได้ หากแยกและนำแอนติบอดีหรือเซลล์ลิมโฟไซด์ดังกล่าวมาให้ผู้ที่ไม่มียุติภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคนั้นอาจจะป้องกัน หรือบรรเทาความรุนแรงของโรคติดเชื้อนั้นได้ (passive immunization/transfer) ซึ่งเป็นหนทางหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อมือเท้าปากที่มีอาการรุนแรง ซึ่งเป็นภาวะที่มีอัตราการตายสูงและยังไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะและมีประสิทธิผลทางคลินิกในปัจจุบันเคยมีรายงานว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัสและมีฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสได้ (antibody-dependent enhancement, ADE) เพื่อยืนยันปรากฏการณ์ดังกล่าวในประเทศไทย การศึกษานี้มุ่งพัฒนาวิธีการตรวจประเมินแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัสด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรี ในอาสาสมัครผู้ใหญ่ที่มาบริจาคเลือดเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าการเตรียมและให้ hyperimmune plasma ในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อเอนเทอโรไวรัส71และมีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงจะไม่มีผลอันไม่พึงประสงค์ โดยผลการดำเนินการทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อตรวจประเมินภาวะดังกล่าวได้สำเร็จ และได้ทำการทดสอบตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน 100 ราย ต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัสจำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่าตัวอย่างเกือบทั้งหมดตรวจไม่พบภาวะส่งเสริมการติดเชื้อต่อสายพันธุ์ B5 มีเพียงตัวอย่างจำนวนน้อยมากที่พบภาวะดังกล่าวต่อสายพันธุ์ C4a ซึ่งไม่พบการระบาดในประเทศไทยนานแล้ว และ CA16 ซึ่งไม่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง

### Abstract

Hand foot mouth disease is infectious disease epidemic worldwide especially in Asia and Southeast asia. This disease usually affects children under 5 years old. Coxsackie A 16 (CA16) and enterovirus 71 (EV71) are the common causing agents. Clinical presentation is usually mild and self-limited. In some cases, severe and fatal conditions may develop including aseptic meningitis, brainstem encephalitis, pulmonary edema, and cardiac failure. Currently, there are no specific therapy and available effective vaccine. Natural infection induces specific immune responses including antibody and cell-mediated immunity. Our previous study in six severe EV71 infected patients who received hyperimmune plasma to EV71; all of them had good clinical responses and no any neurological sequelae. There some reports suggested that antibody-dependent enhancement (ADE) could be detected in some samples and would limit the usage of hyperimmune plasma. This preliminary study would develop method to detect ADE of EV71 by flow cytometry. We successfully developed flowcytometric-based ADE assay, however we could not identify any samples showing ADE phenomenon to CA16 and EV71. This assay maybe used as screening assay to identify potential plasma would have adverse effect for hyperimmune plasma and also apply for screening plasma for hyperimmune intravenous immunoglobulin (hyperimmune-IVIG).

Key words: EV71, CA16, hyperimmune plasma, neutralization assay, antibody-dependent enhancement (ADE)

## สารบัญ

| เรื่อง                                                         | หน้า |
|----------------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                                                | I    |
| บทคัดย่อ                                                       | II   |
| Abstract                                                       | III  |
| สารบัญรูปภาพ                                                   | V    |
| สารบัญตาราง                                                    | VI   |
| ส่วนเนื้อหา                                                    |      |
| หลักการความเป็นมา และเหตุผล                                    | 1    |
| บทบทวนวรรณกรรม                                                 | 2    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย                                        | 3    |
| ระเบียบวิธีวิจัย วิธีการประมวลผล ผลวิเคราะห์ข้อมูล             | 3    |
| ผลการศึกษา                                                     | 8    |
| สรุปและข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย และหัวข้อการวิจัยที่ควรทำเพิ่มเติม | 8    |
| บรรณานุกรม                                                     | 9    |
| ภาคผนวก                                                        | 11   |

## สารบัญรูปภาพ

| รูปที่ | ชื่อ                                                               | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | แสดงการแยกเซลล์ที่ติดเชื้อ EV71                                    | 4    |
| 2      | ผลการทดสอบ ADE แบ่งกลุ่มตามผล NT titer ต่อไวรัส EV71 สายพันธุ์ B5  | 5    |
| 3      | ผลการทดสอบ ADE แบ่งกลุ่มตามผล NT titer ต่อไวรัส EV71 สายพันธุ์ C4a | 6    |
| 4      | ผลการทดสอบ ADE แบ่งกลุ่มตามผล NT titer ต่อไวรัส CA16 สายพันธุ์ B1a | 7    |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ | ชื่อ                                                                                                                    | หน้า |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | ระดับแอนติบอดีที่ยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71 สายพันธุ์ C4a, B5 และคอกซากีไวรัส เอ 16 โดยวิธี microneutralization | 4    |

## หลักการ ความเป็นมา และเหตุผล

โรคติดเชื้อไวรัสมือเท้าปาก (Hand-foot-mouth disease, HFMD) เป็นโรคที่พบบ่อยในเด็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งอายุต่ำกว่า 5 ปี และมีแนวโน้มการระบาดเพิ่มมากขึ้นทุกปี ส่วนใหญ่อาการไม่รุนแรงและมักจะหายได้เองภายใน 5-10 วัน แต่ผู้ป่วยบางรายมีอาการติดเชื้อที่มีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและมีอัตราการตายสูง อีกทั้งยังไม่มียาหรือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคนี้ การติดเชื้อโดยธรรมชาติ ระบบภูมิคุ้มกันผู้ที่ติดเชื้อถูกกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ ได้แก่ แอนติบอดีที่จำเพาะและป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ หากนำแอนติบอดีที่จำเพาะนั้นมาให้กับผู้ที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน ต่อเชื้อโรคนี้อาจป้องกันหรือบรรเทาความรุนแรงของโรคได้ (passive immunization/transfer) การเตรียมพลาสมาที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะและมีปริมาณสูง (hyperimmune plasma) และจากการศึกษาโดยคณะผู้วิจัยในโครงการศึกษานำร่องการให้พลาสมาต่อเชื้อ EV71 ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง พบว่าการให้ hyperimmune plasma ต่อเชื้อ EV71 ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ภายหลังการให้พลาสมาดังกล่าวผู้ป่วยมีการตอบสนองทางคลินิกดีขึ้นอย่างชัดเจนทุกราย การคัดกรองพลาสมาดังกล่าวใช้วิธีมาตรฐาน microneutralization assay (unpublished data, P. Puthavathana) มีการศึกษาพบว่า การให้ hyperimmune-IVIG ต่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ที่มีอาการรุนแรงสามารถลดอัตราการตายได้ดีกว่าการให้ IVIG ปกติอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ในหลายการศึกษา

นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาบางฉบับพบว่า มีแอนติบอดีบางส่วนมีฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71 ได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง (antibody dependent enhancement, ADE) ซึ่งเป็นความเสี่ยงที่จำเป็นต้องมีการพัฒนาการตรวจประเมินแอนติบอดีชนิดดังกล่าวในอาสาสมัครก่อนนำไปพัฒนาเพื่อเตรียม hyperimmune-IVIG ต่อไป

ดังนั้น การศึกษานี้จะมุ่งพัฒนาวิธีการประเมินภาวะส่งเสริมการติดเชื้อ EV71 (ADE) โดยวิธีโพลีไซโตเมตรี ซึ่งสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว และสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีไปสู่ภูมิภาค เพื่อเตรียม hyperimmune plasma สำหรับผู้ติดเชื้อ EV71 ที่มีอาการรุนแรงได้อย่างปลอดภัยมากขึ้นต่อไปได้ อีกทั้งสามารถใช้ในการเฝ้าระวังและ/หรือรองรับประเมินการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อวัคซีน EV71 ในอนาคต และเป็นการเตรียมความพร้อมในด้านความมั่นคงด้านสาธารณสุขของประเทศต่อไป



### บททวนวรรณกรรม

โรคมือเท้าปากเป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดโดยเฉพาะในกลุ่มเด็ก และเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข ในหลายประเทศ ในเอเชียรวมทั้งประเทศไทย โรคมือเท้าปากเกิดจากการติดเชื้อไวรัสในกลุ่ม เอนเทอโรไวรัส (Human Enterovirus, HEV) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Picornaviridae ไวรัสในกลุ่ม HEV สามารถแบ่งตามพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ Human Enterovirus A (HEV-A) เช่น Coxsackievirus A2 (CA2), CA5, CA16, Enterovirus 71 (EV71) และ EV89 เป็นต้น Human Enterovirus B (HEV-B) เช่น Coxsackievirus B1 (CB1), CB3, CB5, Echovirus 1 (E1), E9, EV69, EV73 เป็นต้น Human Enterovirus C (HEV-C) เช่น Poliovirus 1 (PV-1), PV-2, PV-3, CA1, CA13, EV96 และ EV102 เป็นต้น และ Human Enterovirus D (HEV-D) เช่น EV68 และ EV120 เป็นต้น โดยเชื้อไวรัส HEV-A ได้แก่ CA16 และ EV71 เป็นสาเหตุสำคัญ ที่ก่อโรคมือเท้าปาก โดย CA16 มักก่อให้เกิดอาการของโรคที่ไม่รุนแรง แต่ EV71 ในบางรายมักก่อให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรง และสามารถทำให้เกิดความพิการหรือการเสียชีวิตโดยเฉพาะ ในผู้ติดเชื้อที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี (1) เชื้อ EV71 มีลักษณะเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก สายเดี่ยว (positive-sense, single-stranded RNA) ขนาดประมาณ 7,500 นิวคลีโอไทด์ ไม่มีเปลือกที่เป็นไขมันห่อหุ้ม (nonenveloped virus) โดยมี viral protein (VP) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (capsid protein) โดยแบ่งเป็น 4 ส่วนย่อย ได้แก่ VP1, VP2, VP3 และ VP4 ซึ่ง VP1-VP3 ซึ่งจะอยู่ภายนอกของไวรัส และ VP4 อยู่ภายใน โดยโปรตีน VP1 เป็นโปรตีนที่สำคัญในการนำเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ และมีความสำคัญในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (2, 3) นอกจากนี้สามารถใช้ลำดับรหัสพันธุกรรมในส่วน VP1 จำแนก genotype ของไวรัสในวงศ์ Picornaviridae เป็นกลุ่มย่อย (4) อาการทางคลินิกในผู้ป่วยโรคมือเท้าปากที่เกิดจากเชื้อ EV71 พบได้หลากหลาย ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ อาการไม่รุนแรง จนถึงมีอาการรุนแรง โดยอาการของโรคมือเท้าปากที่รุนแรง มักมีอาการแสดงของเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (aseptic meningitis), ก้านสมองอักเสบ (brainstem encephalitis), ภาวะปอดบวมน้ำที่เกี่ยวเนื่องจากระบบประสาท (neurogenic pulmonary edema) และระบบหัวใจล้มเหลว (cardiopulmonary failure) (5)

สายพันธุ์ของ EV71 ที่ระบาดในแต่ละประเทศ จะทำให้เกิดอาการของโรคมือเท้าปากที่แตกต่างกัน เช่น EV71 subgenotype C4a ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคมือเท้าปากในประเทศจีนแผ่นดินใหญ่ แต่มีอัตราการตายที่ไม่สูงมากนัก ในประเทศเคนยา EV71 subgenotype C4a เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคมือเท้าปากที่รุนแรงได้ EV71 subgenotype B5 มีการระบาดมากในประเทศมาเลเซีย และ ไต้หวัน ซึ่งพบว่าก่อให้เกิดอาการรุนแรงได้น้อยในประเทศไต้หวัน สายพันธุ์ของ EV71 ที่ระบาดในประเทศไทยในปี 2555 นั้น พบว่า เป็น subgenotype B5 เป็นส่วนใหญ่ และพบ subgenotype C4 ได้บ้าง (6, 7) แต่ทั้งนี้ความรู้ด้านพยาธิกำเนิดทางระบบภูมิคุ้มกันต่อ การดำเนินโรคและความรุนแรงของโรคจากเชื้อ EV71 นั้น ยังไม่ชัดเจน

กลไกการติดเชื้อ EV71 ในเซลล์ เริ่มต้นด้วยการจับกับตัวรับ(receptor)ที่จำเพาะต่อเชื้อ EV71 เช่น human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1; CD162) และ human scavenger receptor class B2 (SCARB2) เป็นต้น ซึ่งตัวรับดังกล่าวล้วนมีความจำเพาะกับส่วนของโปรตีนโครงสร้าง VP1 (8) เช่น ส่วน amino acid ของโปรตีน VP1 ตำแหน่งที่ 144 และ 151 พบว่ามีความสำคัญต่อการจับกันระหว่าง VP1 และ SCARB2 บนผิวเซลล์ (9) และจากการศึกษาในระดับวิทยาเชิงโมเลกุลพบว่าการแปรผันของยีน VP1 อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมือเท้าปากร่วมกับอาการทางระบบประสาท (10)

ปัจจุบันยังไม่มีการรักษาที่จำเพาะหรือวัคซีนป้องกันโรคมือเท้าปากที่มีประสิทธิผลทางคลินิก มีรายงานการศึกษาการใช้ IVIG ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ EV71 ที่มีอาการรุนแรงสองรายในประเทศไต้หวัน พบว่าภายหลังรับการรักษาผู้ป่วยทั้งสองราย มีผลการตอบสนองทางคลินิกและระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น (11, 12) และ มีรายงานการศึกษาพลาสมาที่ได้จากผู้ป่วยโรคโปลิโอและ IVIG ที่เตรียมได้จากชาวไต้หวัน ซึ่งอาศัยในถิ่นระบาดของโรคพบว่าพลาสมาหรือ IVIG ดังกล่าว สามารถลดการติดเชื้อ EV71 ในเซลล์ได้ (13) องค์ความรู้เหล่านี้ จึงเป็นที่มาของคำแนะนำให้ใช้ซีรัมพลาสมาทางหลอดเลือดดำ (intravenous

immunoglobulin, IVIG) เป็นการรักษาสเสริมในผู้ป่วยโรคมือเท้าปากจากเชื้อ EV71 ที่มีอาการแทรกซ้อน ที่รุนแรงในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของ IVIG และ IVIG ที่ได้จากผู้ที่มีระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในระดับสูง (hyperimmune-IVIG) พบว่าการให้ hyperimmune-IVIG ในผู้ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่มีอาการรุนแรง สามารถลดอัตราการตายได้ดีกว่าการให้ IVIG ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1, 14) และมีการทดสอบประสิทธิผลของ human hyperimmune ต่อเชื้อ EV71 ในสัตว์ทดลองโดยสามารถลดอัตราการตายได้ดีเช่นกัน (15)

มีรายงานการศึกษาที่แสดงว่าแอนติบอดีบางส่วนหรือบาง subclass มีคุณสมบัติที่อาจทำให้เกิดภาวะส่งเสริมการติดเชื้อ (antibody dependent enhancement, ADE) ต่อเชื้อ EV71 ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง (16-19)

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71 ของพลาสมาจากอาสาสมัครโดยวิธีโพลไซโตเมตรี เพื่อเตรียมความพร้อมในการคัดกรองฤทธิ์ดังกล่าวเพื่อเตรียม IVIG ต่อไป

### ระเบียบวิธีวิจัย วิธีการประมวลผล ผลวิเคราะห์ข้อมูล

1. ดำเนินการขอการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยในคน  
ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (The Siriraj Institutional Review Board) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ Si678/2016
2. การเชิญชวนอาสาสมัคร  
ได้ทำการเชิญชวนอาสาสมัครผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีที่มาบริจาคโลหิต ณ ธนาคารเลือด โรงพยาบาลศิริราช จำนวน 100 ราย เพื่อเก็บซีรัมเพื่อใช้ในการคัดกรองต่อไป
3. การเพิ่มปริมาณเอนเทอโรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง  
ได้ทำการเพิ่มปริมาณเอนเทอโรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ EV71 B5, EV71 Ca4 และ CA16 และทำการตรวจเช็คปริมาณไวรัสด้วยวิธี plaque assay
4. การตรวจคัดกรองซีรัมเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัสด้วยวิธี microNT  
ได้ทำการตรวจซีรัมดังกล่าว เพื่อทดสอบแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ EV71 B5, Ca4 และ CA16 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero และได้ได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อใช้เปรียบเทียบกับฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อต่อไป

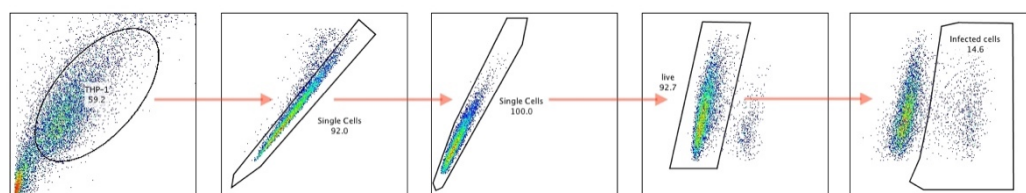
ตารางที่ 1 จำนวนระดับแอนติบอดีที่ยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71 สายพันธุ์ C4a, B5 และคอกซากีไวรัส เอ 16 (neutralizing antibody) โดยวิธี microneutralization ในอาสาสมัคร 100 ราย

| NT titer | EV71 C4a | EV71 B5 | CA16 B1a |
|----------|----------|---------|----------|
| <10      | 58       | 41      | 32       |
| 20       | 32       | 19      | 20       |
| 40       | 10       | 9       | 15       |
| 80       | 0        | 11      | 10       |
| 160      | 0        | 9       | 16       |

|        |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|
| 320    | 0   | 8   | 6   |
| 640    | 0   | 2   | 1   |
| >1,280 | 0   | 1   | 0   |
| Total  | 100 | 100 | 100 |

5. การพัฒนาวิธีการตรวจแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อโดยวิธีโพลไซโตเมทรี

ได้ทำการคัดเลือกเซลล์ที่จะนำมาพัฒนา โดยต้องมีคุณลักษณะที่สำคัญคือ มี ตัวรับต่อส่วน Fc ของแอนติบอดีมนุษย์บนผิวเซลล์ และสามารถติดเชื้อเอนเทอโรไวรัสได้ปริมาณต่ำๆ ได้ทำการคัดเลือกเซลล์ THP-1 และหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อสามารถตรวจหาภาวะ antibody-dependent enhancement (ADE) ต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัสได้ จนได้สภาวะที่เหมาะสมในเซลล์ THP-1 เท่านั้น และต้องหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัสเพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสภายในเซลล์ที่ติดเชื้อได้ ตามรูปที่ 1 และรูปที่ 2



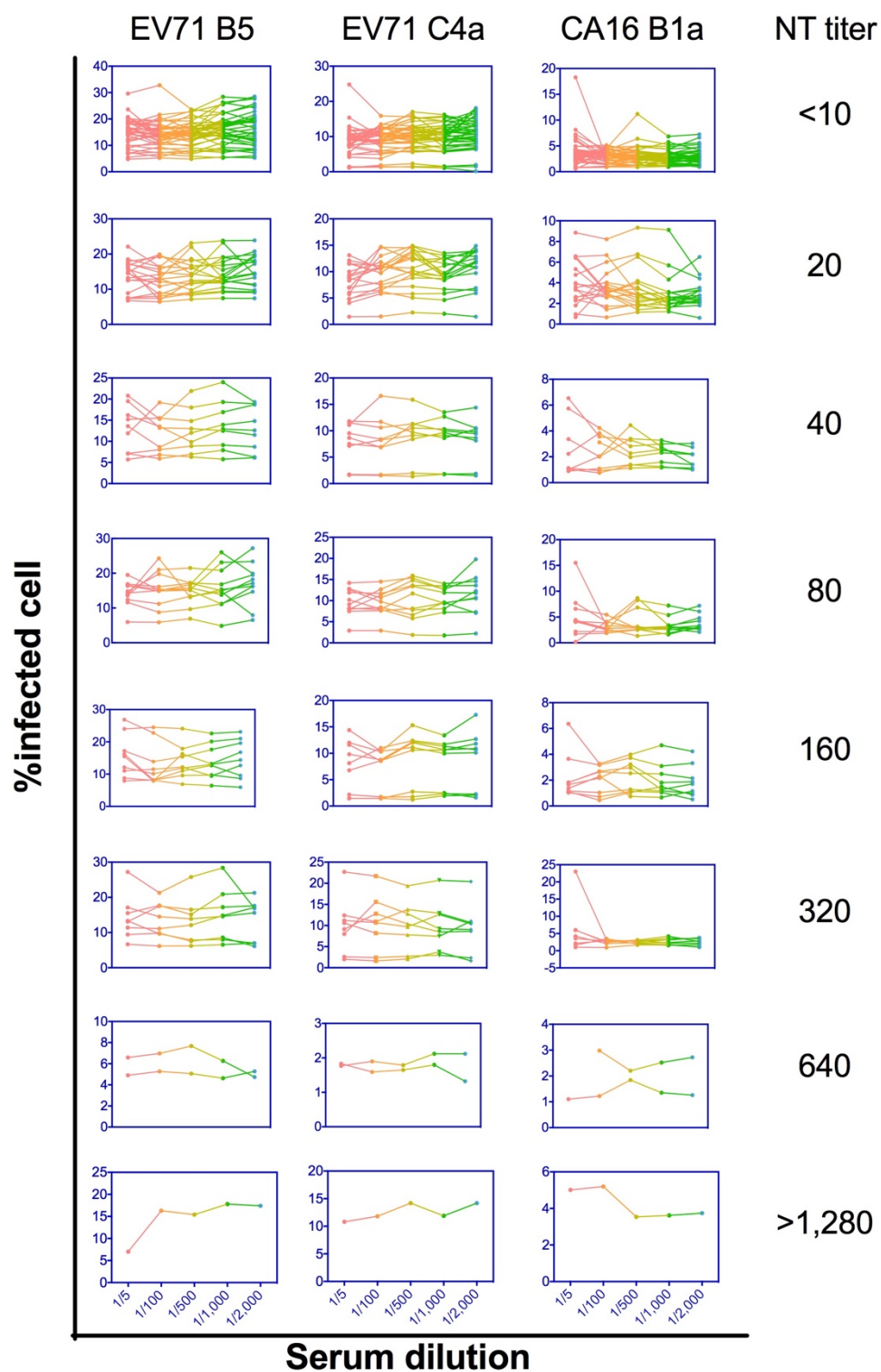
รูปที่ 1 แสดงการแยกเซลล์ที่ติดเชื้อ EV71 (gating strategy) ที่ใช้ในการทดลอง หลังจากเตรียมเซลล์โดยการกระตุ้นด้วย PMA 24 ชั่วโมง แล้ว infect ด้วย EV71 สายพันธุ์ B5 MOI เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ย้อมด้วย mouse anti pan enteroviruses antibody และ goat anti mouse IgG PE ตามลำดับ ทำการเลือก THP-1 โดยใช้ SSC-A vs FSC-A เลือกเซลล์เดี่ยว โดยใช้ SSC-A vs SSC-H และ FSC-A vs FSC-H จากนั้นทำการเลือกเซลล์เป็น จากกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ แล้วแยกเซลล์ที่ติดเชื้อ EV71 B5 จากเซลล์ที่ติดสี PE

6. การทดสอบตัวอย่างซีรัมที่เก็บได้กับวิธีการตรวจฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อที่พัฒนาได้

เพื่อทดสอบแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัสจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ EV71 B5, Ca4 และ CA16 ในเซลล์เพาะเลี้ยง THP-1

6.1 กลุ่มตัวอย่างตามผล microNT ที่ไตเตอร์ของเชื้อ EV71 B5

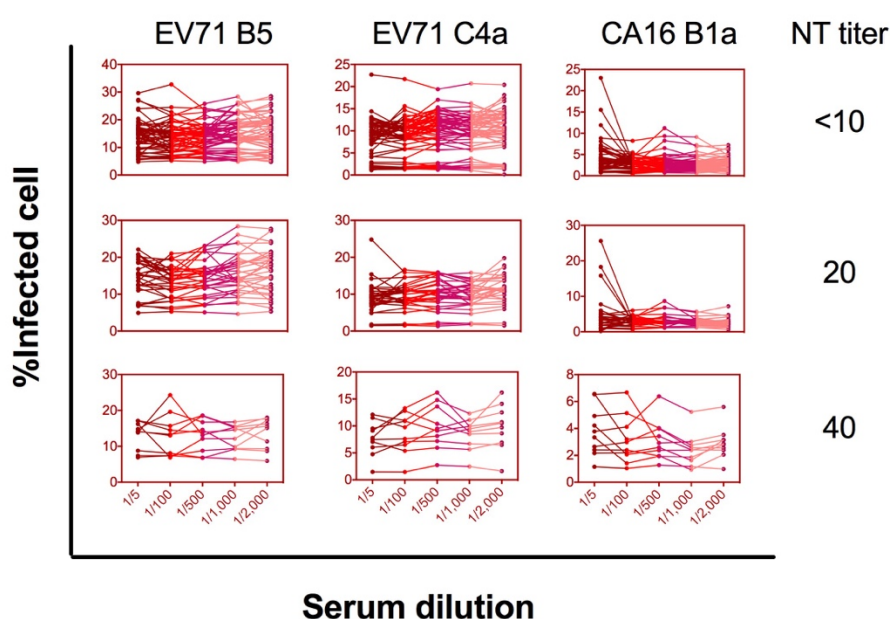
เมื่อจัดกลุ่มตัวอย่างตามผล microNT ที่ไตเตอร์ต่อเชื้อ EV71 B5 จะสามารถจัดได้ 8 กลุ่มไตเตอร์ คือ <10 20 40 80 160 320 640 และ 1,280 และเมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อมีระดับที่ไตเตอร์ต่อเชื้อ EV71 B5 พบว่าไม่มีการสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ พบว่า การติดเชื้อ EV71 B5 พบมีการเกิด ADE ในบางราย โดยไม่ได้ขึ้นกับผลไตเตอร์จากวิธี microNT และไม่ได้มีการติดเชื้อที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการติดเชื้อ EV71 C4a ที่พบว่าไม่มีการเกิด ADE แต่การทดสอบพบว่าจะมีการติดเชื้อที่สูงขึ้นผิดปกติในจำนวนน้อยรายอย่างไม่มีนัยสำคัญ และการติดเชื้อ CA16 พบว่าไม่ได้มีความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ CA16 กับระดับที่ไตเตอร์ต่อเชื้อ EV71 B5 แต่การทดสอบพบว่าจะมีการติดเชื้อที่สูงขึ้นผิดปกติในจำนวนน้อยรายในหลอดที่มีซีรัมสูงอย่างไม่มีนัยสำคัญ



รูปที่ 2 ผลการทดสอบ ADE แบ่งกลุ่มตามผล NT titer ต่อไวรัส EV71 สายพันธุ์ B5 โดยทำการเจือจางซีรัมของอาสาสมัครเป็น 1/5, 1/100, 1/500, 1/1,000 และ 1/2,000 ผสมกับไวรัส EV71 สายพันธุ์ B5 และ C4a และ CA16 สายพันธุ์ B1a เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนเติมลงในเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA บ่มข้ามคืน และวัดการติดเชื้อภายในเซลล์ด้วย antibody pan enterovirus และวัดโดยเครื่องโพลไซโตมิเตอร์

## 6.2 กลุ่มตัวอย่างตามผล microNT ที่ไตเตอร์ของเชื้อ EV71 C4a

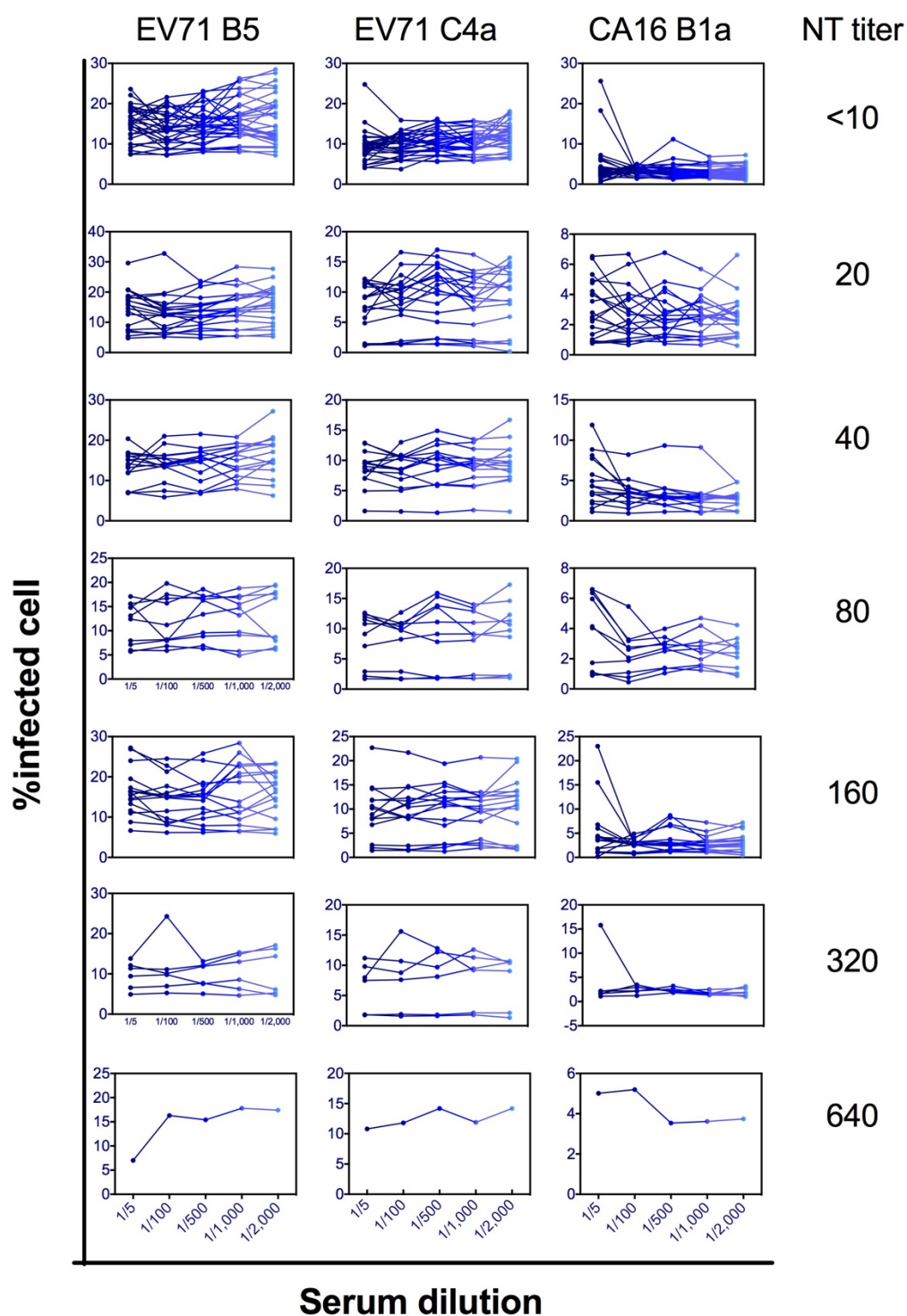
เมื่อจัดกลุ่มตัวอย่างตามผล microNT ที่ไตเตอร์ต่อเชื้อ EV71 C4a พบว่า มีเพียง 3 กลุ่มไตเตอร์ คือ <10 20 และ 40 แต่ไม่พบกลุ่มที่มี ไตเตอร์มากกว่า 40 และเมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อมีระดับที่ไตเตอร์ต่อเชื้อ EV71 C4a พบว่าไม่มีการสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ แต่การติดเชื้อที่มีแนวโน้มจากน้อยไปมากตามระดับการเจ็บจางซีรัม ในกลุ่มที่มีไตเตอร์ 20 อาจจะเนื่องจากบางรายเป็นผู้ที่มีไตเตอร์ต่อเชื้อ EV71 B5 สูงเลยทำให้เกิดการยับยั้งการติดเชื้อเมื่อมีซีรัมที่เจ็บจางต่ำ การติดเชื้อ EV71 C4a ที่พบว่าไม่มีการเกิด ADE และพบว่าการติดเชื้อ CA16 ที่สูงขึ้นผิดปกติในจำนวนน้อยรายในหลอดที่มีซีรัมเจ็บจางต่ำอย่างไม่มีนัยสำคัญ



รูปที่ 3 ผลการทดสอบ ADE แบ่งกลุ่มตามผล NT titer ต่อไวรัส EV71 สายพันธุ์ C4a โดยทำการเจ็บจางซีรัมของอาสาสมัครเป็น 1/5, 1/100, 1/500, 1/1,000 และ 1/2,000 ผสมกับไวรัส EV71 สายพันธุ์ B5 และ C4a และ CA16 สายพันธุ์ B1a เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนเติมลงในเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA บ่มข้ามคืนและวัดการติดเชื้อมาในเซลล์ด้วย antibody pan enterovirus และวัดโดยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

## 6.3 กลุ่มตัวอย่างตามผล microNT ที่ไตเตอร์ของเชื้อ CA16

เมื่อจัดกลุ่มตัวอย่างตามผล microNT ที่ไตเตอร์ต่อเชื้อ CA16 B1a จะสามารถจัดได้ 7 กลุ่มไตเตอร์ คือ <10 20 40 80 160 320 และ 640 พบว่า การติดเชื้อ EV71 B5 พบมีการเกิด ADE ในบางราย โดยไม่ได้ขึ้นกับผลไตเตอร์ต่อเชื้อ CA16 จากวิธี micron เช่นเดียวกับการติดเชื้อ EV71 C4a ที่พบว่าไม่มีการเกิด ADE แต่การทดสอบพบว่าจะมีการติดเชื้อที่สูงขึ้นผิดปกติในจำนวนน้อยรายอย่างไม่มีนัยสำคัญ ที่สัมพันธ์กับระดับไตเตอร์ต่อเชื้อ CA16 และการติดเชื้อ CA16 พบว่าไม่ได้มีความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ CA16 กับระดับที่ไตเตอร์ต่อเชื้อ CA16 แต่การทดสอบพบว่าจะมีการติดเชื้อที่สูงขึ้นผิดปกติในจำนวนน้อยรายในหลอดที่มีซีรัมสูงอย่างไม่มีนัยสำคัญ



รูปที่ 4 ผลการทดสอบ ADE แบ่งกลุ่มตามผล NT titer ต่อไวรัส CA16 สายพันธุ์ B1a โดยทำการเจือจางซีรัมของอาสาสมัครเป็น 1/5, 1/100, 1/500, 1/1,000 และ 1/2,000 ผสมกับไวรัส EV71 สายพันธุ์ B5 และ C4a และ CA16 สายพันธุ์ B1aเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนเติมลงในเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA บ่มข้ามคืน และวัดการติดเชื้อภายในเซลล์ด้วย antibody pan enterovirus และวัดโดยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

## 7. การวิเคราะห์ข้อมูล

- 7.1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) คือข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ นำเสนอเป็นค่ามัธยฐาน (median) และค่าต่ำสุด สูงสุด (range)
- 7.2 การวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม เนื่องจากข้อมูลต่อเนื่องที่มีการแจกแจงไม่ใช้การแจกแจงแบบปกติ จึงต้องใช้การทดสอบแบบ nonparametric โดยใช้ Kruskal-Wallis test สำหรับการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของข้อมูล

## ผลการศึกษา

เมื่อทำการพัฒนาวิธีการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรีในตัวอย่างซีรัมจำนวน 1 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบภาวะส่งเสริมการติดเชื้อ (ADE) ได้ ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ อาจนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างซีรัม เพื่อประเมินภาวะส่งเสริมการติดเชื้อได้ และยังไม่มียารายงานใดที่เคยพัฒนาวิธีการดังกล่าวนี้

แต่เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างจำนวน 100 ตัวอย่างที่เก็บจากผู้บริจาค ณ ธนาคารเลือด พบว่าไม่พบความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะส่งเสริมการติดเชื้อ แม้จะพบแนวโน้มกลุ่มตัวอย่างซึ่งมีความแปรผันของร้อยละการติดเชื้อในแต่ละไตรมาส แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง อาจสรุปได้ว่าภาวะส่งเสริมการติดเชื้อหรือ ADE ต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัส ไม่น่าจะก่อให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์ หากมีการนำพลาสมาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัสในปริมาณสูง (hyperimmune plasma) มาใช้รักษาผู้ติดเชื้อที่มีอาการรุนแรงได้

เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าไม่ภาวะส่งเสริมการติดเชื้อมีอยู่จริง ควรทำการทดสอบควบคู่กับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ (neutralization) หากพบว่าตัวอย่างพลาสมาสามารถตรวจพบฤทธิ์ทั้งสองอย่าง มีความเสี่ยงให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์ หากมีการใช้พลาสมาในการรักษาผู้ป่วยได้

## สรุปและข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย และหัวข้อการวิจัยที่ควรทำเพิ่มเติม

วิธีการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรี ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อได้ และเมื่อนำมาคัดกรองในตัวอย่างซีรัมจำนวน 100 ตัวอย่าง ไม่พบภาวะดังกล่าว ซึ่งอาจนำวิธีที่พัฒนาขึ้นดังกล่าวมาใช้ในการร่วมคัดกรองกับวิธีมาตรฐาน เพื่อสามารถคัดกรองตัวอย่างพลาสมาอย่างรวดเร็ว และปริมาณมาก ซึ่งสามารถนำพลาสมาที่มีคุณลักษณะที่พึงประสงค์ คือมีแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งการติดเชื้อสูง แต่มีแอนติบอดีที่ส่งเสริมการติดเชื้อต่ำ ทำการรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที และไม่ก่อให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์ได้

องค์ความรู้จากโครงการวิจัยนี้ อาจช่วยให้แนวทางในการปรับนโยบายด้านการเฝ้าระวัง การประเมิน และติดตามในขั้นตอนการรักษาผู้ป่วยโรคมือเท้าปากที่มีอาการรุนแรง สำหรับแผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ สามารถนำมาเผยแพร่ในวงกว้างผ่านสื่อต่างๆ และ/หรือ การจัดอบรมเชิงปฏิบัติการแก่แพทย์ นักวิจัย หรือนักเทคนิคการแพทย์ ที่สนใจเพื่อนำเทคนิคนี้ไปคัดกรอง และคัดแยกออกพลาสมาที่มีโอกาสส่งเสริมการติดเชื้อ ก่อนที่จะนำไปรักษาผู้ป่วย ด้วยวิธีการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรี ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถทำการทดสอบได้ในเครื่องโพลีไซโตเมเตอร์ซึ่งมีอยู่ตามโรงพยาบาลศูนย์ต่างๆทั่วประเทศ นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้อาศัยการย้อมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เพียง 1-2 สี และขั้นตอนการทดสอบใช้เวลาเพื่อ 2-3 วัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในโรงพยาบาลศูนย์ ทั่วประเทศได้

สำหรับข้อจำกัดของเซลล์ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบด้วยวิธีการนี้ จำเป็นต้อง มีการแสดงออกที่มีคงที่ของตัวรับ (receptor) ที่สำคัญที่ไวรัสใช้จับในการเข้าสู่เซลล์ เช่น SCARB-II และ PSGL-1 รวมทั้ง Fc-gamma receptor ที่สามารถจับกับ แอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อ ซึ่งข้อจำกัดเบื้องต้นอาจทำให้การทดสอบแต่ละครั้งไม่คงที่ ดังนั้นการสร้างเซลล์ที่มีการแสดงออกของตัวรับที่คงที่อาจทำให้การทดสอบมีความถูกต้อง และแม่นยำขึ้น

# บรรณานุกรม

1. Hung IF, To KK, Lee CK, Lee KL, Yan WW, Chan K, et al. Hyperimmune IV immunoglobulin treatment: a multicenter double-blind randomized controlled trial for patients with severe 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest*. 2013;144(2):464-73.
2. Tan CS, Cardoso MJ. High-titred neutralizing antibodies to human enterovirus 71 preferentially bind to the N-terminal portion of the capsid protein VP1. *Arch Virol*. 2007;152(6):1069-73.
3. Gao F, Wang YP, Mao QY, Yao X, Liu S, Li FX, et al. Enterovirus 71 viral capsid protein linear epitopes: identification and characterization. *Viol J*. 2012;9:26.
4. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*. 1999;73(3):1941-8.
5. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(11):778-90.
6. Linsuwanon P, Puenpa J, Suwannakarn K, Auksornkitti V, Vichi wattana P, Korkong S, et al. Molecular epidemiology and evolution of human enterovirus serotype 68 in Thailand, 2006-2011. *PLoS One*. 2012;7(5):e35190.
7. Linsuwanon P, Puenpa J, Huang SW, Wang YF, Mauleekoonphairoj J, Wang JR, et al. Epidemiology and seroepidemiology of human enterovirus 71 among Thai populations. *J Biomed Sci*. 2014;21:16.
8. Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S. Functional comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71. *J Virol*. 2013;87(6):3335-47.
9. Chen P, Song Z, Qi Y, Feng X, Xu N, Sun Y, et al. Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenge receptor B 2. *J Biol Chem*. 2012;287(9):6406-20.
10. Zhang B, Wu X, Huang K, Li L, Zheng L, Wan C, et al. The variations of VP1 protein might be associated with nervous system symptoms caused by enterovirus 71 infection. *BMC Infect Dis*. 2014;14:243.
11. Lin TY, Chang LY, Huang YC, Hsu KH, Chiu CH, Yang KD. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections: implications for early recognition and therapy. *Acta Paediatr*. 2002;91(6):632-5.
12. Wang SM, Lei HY, Huang MC, Su LY, Lin HC, Yu CK, et al. Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Clin Virol*. 2006;37(1):47-52.
13. Wu CY, Wang HC, Wang KT, Weng SC, Chang WH, Shih DY, et al. Neutralization of five subgenotypes of Enterovirus 71 by Taiwanese human plasma and Taiwanese plasma derived intravenous immunoglobulin. *Biologicals*. 2013;41(3):154-7.
14. Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, Cleary P, Khaw FM, Lim WS, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of



- severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis.* 2015;211(1):80-90.
15. Cao RY, Han JF, Jiang T, Tian X, Yu M, Deng YQ, et al. In vitro and in vivo characterization of a new enterovirus type 71-specific human intravenous immunoglobulin manufactured from selected plasma donors. *J Clin Virol.* 2011;51(4):246-9.
  16. Han JF, Cao RY, Deng YQ, Tian X, Jiang T, Qin ED, et al. Antibody dependent enhancement infection of enterovirus 71 in vitro and in vivo. *Virol J.* 2011;8:106.
  17. Cao RY, Dong DY, Liu RJ, Han JF, Wang GC, Zhao H, et al. Human IgG subclasses against enterovirus Type 71: neutralization versus antibody dependent enhancement of infection. *PLoS One.* 2013;8(5):e64024.
  18. Chen IC, Wang SM, Yu CK, Liu CC. Subneutralizing antibodies to enterovirus 71 induce antibody-dependent enhancement of infection in newborn mice. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202(4):259-65.
  19. Wang SM, Chen IC, Su LY, Huang KJ, Lei HY, Liu CC. Enterovirus 71 infection of monocytes with antibody-dependent enhancement. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(10):1517-23.

## ภาคผนวก

ตารางแสดงผลการคัดกรองอาสาสมัคร เพื่อทดสอบแอนติบอดีไตเตอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอโรไวรัสจำนวน 3 สายพันธุ์ จำนวน 100 ราย

| No.    | NT titer |         |          |
|--------|----------|---------|----------|
|        | EV71 C4a | EV71 B5 | CA16 B1a |
| ADE001 | <10      | 320     | 160      |
| ADE002 | <10      | 80      | 80       |
| ADE003 | 20       | 640     | 320      |
| ADE004 | <10      | 40      | 80       |
| ADE005 | <10      | 160     | 80       |
| ADE006 | 20       | 40      | 80       |
| ADE007 | <10      | 160     | 160      |
| ADE008 | <10      | 640     | 320      |
| ADE009 | 40       | 160     | 160      |
| ADE010 | <10      | 320     | 160      |
| ADE011 | <10      | <10     | 20       |
| ADE012 | <10      | <10     | 20       |
| ADE013 | 20       | 20      | 20       |
| ADE014 | 20       | 40      | 40       |
| ADE015 | <10      | <10     | 20       |
| ADE016 | <10      | <10     | <10      |
| ADE017 | 40       | 20      | <10      |
| ADE018 | <10      | 20      | <10      |
| ADE019 | 20       | <10     | 40       |
| ADE020 | 40       | <10     | 40       |
| ADE021 | 20       | 20      | 20       |
| ADE022 | <10      | <10     | <10      |
| ADE023 | <10      | <10     | <10      |
| ADE024 | <10      | 80      | 160      |
| ADE025 | <10      | 20      | 40       |
| ADE026 | <10      | <10     | <10      |
| ADE027 | 20       | <10     | <10      |
| ADE028 | 20       | 20      | 20       |
| ADE029 | <10      | <10     | <10      |
| ADE030 | 40       | <10     | <10      |
| ADE031 | <10      | <10     | 20       |
| ADE032 | <10      | <10     | <10      |
| ADE033 | <10      | 20      | 160      |
| ADE034 | <10      | <10     | <10      |
| ADE035 | 20       | 80      | 160      |
| ADE036 | 20       | 80      | 160      |
| ADE037 | <10      | <10     | <10      |

|        |     |        |     |
|--------|-----|--------|-----|
| ADE038 | <10 | 160    | 80  |
| ADE039 | 40  | 20     | 20  |
| ADE040 | 20  | 40     | 20  |
| ADE041 | <10 | 160    | 320 |
| ADE042 | <10 | 20     | <10 |
| ADE043 | <10 | 160    | 160 |
| ADE044 | 20  | 80     | 80  |
| ADE045 | 20  | 20     | <10 |
| ADE046 | <10 | <10    | <10 |
| ADE047 | 20  | <10    | 20  |
| ADE048 | 40  | <10    | 40  |
| ADE049 | 20  | 20     | <10 |
| ADE050 | 20  | 20     | <10 |
| ADE051 | <10 | <10    | <10 |
| ADE052 | <10 | <10    | 40  |
| ADE053 | <10 | 20     | 20  |
| ADE054 | <10 | <10    | <10 |
| ADE055 | <10 | <10    | <10 |
| ADE056 | 20  | 40     | 20  |
| ADE057 | 40  | 20     | 10  |
| ADE058 | 40  | 80     | 320 |
| ADE059 | 20  | 160    | 160 |
| ADE060 | <10 | 320    | 320 |
| ADE061 | <10 | 320    | 320 |
| ADE062 | <10 | 160    | 20  |
| ADE063 | <10 | <10    | 40  |
| ADE064 | 20  | <10    | 20  |
| ADE065 | 20  | <10    | 40  |
| ADE066 | <10 | <10    | <10 |
| ADE067 | <10 | >1,280 | 640 |
| ADE068 | 20  | 20     | 20  |
| ADE069 | 20  | <10    | <10 |
| ADE070 | 20  | <10    | <10 |
| ADE071 | 40  | 320    | 20  |
| ADE072 | <10 | 40     | 40  |
| ADE073 | <10 | 80     | 40  |
| ADE074 | <10 | 320    | 80  |
| ADE075 | <10 | 20     | 20  |
| ADE076 | <10 | <10    | 160 |
| ADE077 | 20  | <10    | <10 |
| ADE078 | 20  | 20     | 20  |
| ADE079 | 20  | <10    | 80  |
| ADE080 | <10 | 40     | 40  |
| ADE081 | 40  | 20     | 80  |

|        |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|
| ADE082 | <10 | <10 | 40  |
| ADE083 | <10 | 80  | 160 |
| ADE084 | <10 | 40  | <10 |
| ADE085 | <10 | 80  | 80  |
| ADE086 | 20  | 320 | 160 |
| ADE087 | <10 | <10 | <10 |
| ADE088 | <10 | <10 | <10 |
| ADE089 | 20  | <10 | 20  |
| ADE090 | 20  | 80  | 40  |
| ADE091 | <10 | 80  | 160 |
| ADE092 | <10 | 40  | 40  |
| ADE093 | 20  | 20  | <10 |
| ADE094 | 20  | <10 | <10 |
| ADE095 | <10 | <10 | <10 |
| ADE096 | <10 | 10  | 40  |
| ADE097 | <10 | 10  | 20  |
| ADE098 | <10 | 160 | 160 |
| ADE099 | <10 | 320 | 160 |
| ADE100 | 20  | <10 | <10 |

---