

計畫編號：DOH90-DC-2003

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

(計畫名稱) 腸病毒 71 型不活化和鋁鹽佐劑吸附條件之尋求  
Determination of factors for inactivation and aluminum salts adsorption  
of Enterovirus 71 serotype

## 委託研究成果報告

執行機構：血清疫苗研製中心

研究主持人：黃瑞禎

研究人員：江正榮、連偉成、吳秀鵬、呂亞蓉、羅怡雯、張瑞源、蔡浩鵬、  
郭旭英

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

	頁次
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
第一章 前言.....	3
第二章 材料與方法.....	4
第一節、試驗材料與方法.....	
1-1 腸病毒.....	
1-2 病毒之不活化.....	
1-2-1	
1-2-2	
1-3 病毒之吸附佐劑配置.....	
1-3-1 Aluminum Phosphate( $Al(PO)_4$ )的配製.....	
1-3-2 Aluminum Hydroxide( $Al(OH)_3$ )的配製.....	
1-4 Vero 細胞之製備.....	
1-5 TCID 之操作.....	
1-6 血清中和試驗之操作.....	
1-7 動物免疫之操作.....	
第二節、試驗設計.....	6
2-1 試驗一：Formalin 不活化濃縮和未濃縮腸病毒之時間探討.....	
2-2 試驗二：BPL 不活化濃縮和未濃縮腸病毒之時間探討.....	
2-3 試驗三：各種 pH 值 $AlPO_4$ 佐劑吸附腸病毒時間之比較.....	
2-4 試驗四：各種 pH 值 $Al(OH)_3$ 佐劑吸附腸病毒時間之比較.....	
2-5 試驗五：各種 pH 值 $AlPO_4$ 佐劑吸附腸病毒免疫試驗.....	
2-6 試驗六：各種 pH 值 $Al(OH)_3$ 佐劑吸附腸病毒免疫試驗.....	
第三章 結果.....	8
第一節、試驗一：Formalin 不活化濃縮和未濃縮腸病毒之時間探討.....	
第二節、試驗二：BPL 不活化濃縮和未濃縮腸病毒之時間探討.....	
第三節、試驗三：各種 pH 值 $AlPO_4$ 佐劑吸附腸病毒時間之比較.....	
第四節、試驗四：各種 pH 值 $Al(OH)_3$ 佐劑吸附腸病毒時間之比較.....	
第五節、試驗五：各種 pH 值 $AlPO_4$ 佐劑吸附腸病毒免疫試驗.....	
第六節、試驗六：各種 pH 值 $Al(OH)_3$ 佐劑吸附腸病毒免疫試驗.....	
第四章 討論.....	10
參考文獻.....	11
附錄.....	

行政院衛生署疾病管制局委託研究計畫原始數據資料庫

資料讀我檔案

計畫名稱：腸病毒 71 型不活化和鋁鹽佐劑吸附條件之尋求

計畫編號：DOH90-DC-2003

執行機構：疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：黃瑞禎

計畫主持人服務單位：血清疫苗研製中心

計畫主持人職稱：研究員

研究報告中文摘要：

將取得本土分離之腸病毒 71 型共 10 株，接種於 Vero 細胞適應生長。並以設定接種病毒濃度在 MOI=1 時，病毒生長曲線於接種 48 小時後，達到最高峰。以福馬林作為病毒不活化劑，不論 1/2000 或 1/4000 的濃度，皆可於 30 天後將病毒力價降至零。後續的免疫實驗，並證明以福馬林作為病毒不活化劑不會破壞病毒抗原的完整性，仍然可免疫產生中和抗體。磷酸鋁和氫氧化鋁，兩種鋁鹽佐劑的吸附條件都以酸鹼值等於 7.5 時最佳，所產生的中和抗體力價可高於 1：100。以交叉中和實驗尋找中和效果寬廣的病毒株，作為疫苗候選株，使未來生產的疫苗可提供較好的免疫保護。目前已有 3 株病毒產生的中和抗體力價適宜，將進一步分析之間的差異，選擇適合量產程序的病毒株，作為疫苗生產的種毒。

中文關鍵詞(至少三個)：腸病毒 71 型、鋁鹽佐劑、病毒不活化劑

Research Data Archive, Center for Disease Control, Department of Health, Taiwan, R.O.C.

Readme file

Project Title: Determination of factors for inactivation and aluminium salts adsorption of Enterovirus 71 serotype

Project Number: DOH90-DC-2003

Executing Institute: Vaccine Center, Center for Disease Control

Principal Investigator(P.I.): Jen-Ron Chiang

P.I. Position Title: Chief

P.I. Institute: Vaccine Center

Abstract:

The local isolated Enterovirus 71 (EV71) strains were adapted in Vero cells. The virus titers of the ten strains of EV71 grown in Vero cells were up to  $10^{6-7}$  50% Tissue Culture Infection Dose (TCID<sub>50</sub>). Formalin, as an inactivating agent, was good for kill viruses and preserve the immunogenicity of the viruses. The concentration of Formalin was estimated as 1/4000 or 1/2000. Aluminium adjuvants as the component of EV71 proto-vaccine, AlPO<sub>4</sub> and AlOH<sub>3</sub>, were selected to enhance the antibody generation. The proper pH values of two adjuvants were determined by neutralization antibody titers. The higher antibody titer was at least 1:100 for the pH=7.5. The suitable vaccine strain was selected by the cross-neutralization test. We found 3 strains were possible to be a good immunogen to protect from other EV71 by neutralization antibodies. The differences between the 3 strains were investigated continuously to identify the fine vaccine strain.

Keyword: Enterovirus type 71, Aluminium adjuvant, Virus inactivating agent

## 第一章 前言

疫苗研發過程中，不活化反應是決定疫苗本身去毒性及保存疫苗中和抗原決定位的關鍵步驟，而疫苗效價的高低與佐劑吸附能力的強弱有直接相關。

疫苗研發時，常採用福馬林作為病毒不活化劑。福馬林可與病毒的敏感性核酸作用，使其變性而失去感染力，然而福馬林也能和病毒蛋白的氨基作用，造成病毒的凝集(Race et al., 1995)而使福馬林無法接近病毒內層的核酸，因此病毒經福馬林不活化後，仍有殘存的可能。BPL 為一種烷化劑，其對病毒核酸之專一性，可縮短不活化反應所需之時間，且減低對病毒的特異性抗原決定位(epitope)的破壞，此外 BPL 也會改變殘餘細胞 DNA 的結構，使得細胞 DNA 無法作為各種不同 polymerase 的 template，而避免疫苗中 DNA 污染所帶來的危害(Perrin and Morgeaux, 1995; Moregeaux et al., 1993)。

佐劑的選擇，必須考慮影響抗原與佐劑間的作用力包括抗原本身的物理、化學性質，佐劑的種類及兩者間的靜電吸引力、凡得瓦力、疏水斥力、溫度等。其中以靜電吸引力影響最鉅(Gupta et al., 1995; Lindblad, 1995; Gupta, 1998; Hem and White, 1995; Aprile and Wardlaw, 1966; Edelman, 1980; Bomford, 1989; Lindblad and Sparck, 1987)，而佐劑的吸附條件，則以鋁鹽在不同的 pH 值時 adsorption onto preformed gel(Gupta et al., 1995; Lindblad, 1995; Gupta, 1998; Hem and White, 1995; Aprile and Wardlaw, 1966; Edelman, 1980)的方法，找尋最佳的吸附條件。以吸附抗原各種佐劑中則以鋁鹽佐劑最為人體所接受，其不僅安全、低價且可與各種的抗原作用(Gupta, 1998; Lindblad, 1995; Hem and White, 1995; Gupta et al., 1993; Nicklas, 1992)，所以本計劃預計利用腸病毒 71 型與  $AlPO_4$  在 pH 3 - 7 的條件下，決定最適當的吸附 pH 值。

為了生產質、量、價均宜之人用疫苗，不活化反應不僅為關鍵製程之一，佐劑的吸附條件也是不可或缺的因素，因為病毒的結構複雜，其蛋白質、醣類、核酸以三度空間組成整個病毒顆粒，若未經適當的處理則會破壞其完整性，並使其抗原性消失，無法誘發人體有效的保護性抗體，因此在疫苗製備的方法選擇上，除應考量經濟效益外，更應注意所使用不活化方法之適切性，並配合適當的鋁鹽吸附條件，才能產製有效的人用疫苗，以控制每年夏年流行的腸病毒 71 型疫情。

## 第二章 材料與方法.....

### 第一節、試驗材料與方法.....

#### 1-1 腸病毒.....

由病毒組腸道病毒科分讓腸病毒 71 型 R07, R32, R25, R41, R63, E15, E92, E43, E59, 及 CoxA16, 和 Echo9。另由中研院生醫所分讓腸病毒 71 型 YN3, 分別培養。

#### 1-2 病毒之不活化.....

##### 1-2-1 福馬林不活化

以 1/75M PBS 將福馬林溶液稀釋至濃度 1% 並將 pH 值調至 7.4, 然後將福馬林溶液分別以 1 : 2000 及 1 : 4000 的比例加入純化之病毒液中, 至最後濃度為 0.05% 及 0.025%。於 4 °C 下靜置, 進行病毒之不活化反應。並定期取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose ( TCID<sub>50</sub> ) 以觀察病毒力價的變化, 直至無病毒存活為止, 再持續靜置, 增加不活化所須時間的 14 天數, 即達不活化終點。

##### 1-2-2 - propiolactone(BPL)不活化

以 1/75M PBS 將 BPL 溶液稀釋至濃度 1% 並將 pH 值調至 7.4, 然後將福馬林溶液分別以 1 : 2000 及 1 : 4000 的比例加入純化之病毒液中, 至最後濃度為 0.05% 及 0.025%。於 4 °C 下靜置, 進行病毒之不活化反應。並定期取樣檢測 TCID<sub>50</sub> 以觀察病毒力價的變化, 直至無病毒存活為止, 再持續靜置不活化所須時間的一半天數, 即達不活化終點。

#### 1-3 病毒之佐劑吸附

##### 1-3-1 Aluminum Phosphate(Al(PO)<sub>4</sub>)的配製

配製 Aluminum chloride/Sodium acetate 溶液( AlCl<sub>3</sub>/ CH<sub>3</sub>COONa soln' ), 使最後濃度 AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 及 CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O 各為 0.0328 M、0.01 M, 過濾後以 4% NaOH 溶液將 pH 值調至 3.0 - 4.0 之間, 靜置於室溫。

配製 Disodium phosphate 溶液( Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> soln' )使最後濃度為 0.0287 M, 過濾後以 4% NaOH 溶液將 pH 值調至 8.5 - 9.5 之間, 靜置於室溫。最後於 121 °C 高壓滅菌 60 分鐘。

##### 1-3-2 Aluminum Hydroxide(Al(OH)<sub>3</sub>)的配製

配製 Aluminum chloride/Sodium acetate 溶液( AlCl<sub>3</sub>/ CH<sub>3</sub>COONa soln' ), 使最後濃度 AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 及 CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O 各為 0.0514 M、0.01 M, 過濾後以 4% NaOH 溶液將 pH 值

調至 3.0 - 4.0 之間，靜置於室溫。

配製 Sodium Hydroxide 溶液( NaOH soln' )使最後濃度為 0.0514 M，過濾後以 4% NaOH 溶液將 pH 值調至 12-14 之間，靜置於室溫。最後於 121 高壓滅菌 60 分鐘。

#### 1-4 細胞和病毒的培養

##### 1-4-1 細胞株的培養

Vero 細胞培養在含 5% 胎牛血清之 M199 培養基，溫度 37 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中。

##### 1-4-2 病毒的培養

以 MOI = 0.1 的病毒濃度感染 Vero 細胞作病毒的繁殖，培養時培養基中胎牛血清的含量下降至 1%。

##### 1-4-3 病毒的收取

將病毒所感染的 Vero 細胞，由培養盤中刮取下來，經由連續冰凍 - 解凍的方法，釋放存在細胞中的病毒，再以 3000 rpm 的離心速度去除細胞碎屑。

#### 1-5 病毒的定量 - TCID<sub>50</sub>

將病毒以系列稀釋的方法，接種於 96 well 細胞培養盤中的 Vero 細胞，經由 5-7 天的培養，觀察細胞之 CPE(細胞病理現象)，來證實細胞受病毒感染的情形，以其最高具 50% CPE 的稀釋濃度決定 TCID<sub>50</sub> 的效價。

#### 1-6 血清中和試驗之操作.....

先將欲測試的血清檢體系列稀釋，並與 100 個 TCID<sub>50</sub> 的病毒混合。在 37 作用 30 分鐘後，接種於 96 well 細胞培養盤中的 Vero 細胞，經由 5-7 天的培養，觀察細胞之 CPE 現象，並經由結晶紫染色，或免螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形。抗體之中和效價以血清在最高稀釋濃度下，仍可抑制病毒感染細胞的倍率來決定。

#### 1-7 動物免疫之操作

取 12-15 克的小白鼠，每週先以心臟抽血 10 隻 ICR 小鼠，在抽血過後各在第 1 和 4 週以腹腔免疫老鼠共 2 次，而繼續在每星期採血直到實驗結束，每次採血後將採到的血混合，離心取上清液，以 56 不活化病毒 30 分鐘，保存於 -20 。

## 第二節、試驗設計

### 2-1 試驗一：Formalin 不活化未濃縮腸病毒之時間探討

將實驗組分成 1/2000 組、1/4000 組和 Control 組三組，從福馬林加入病毒算實驗起始，於 4℃ 下靜置，進行病毒之不活化反應。並定期取樣檢測 TCID<sub>50</sub> 以觀察病毒力價的變化，直至無病毒存活為止。

### 2-2 試驗二：BPL 不活化未濃縮腸病毒之時間探討

將實驗組分成 1/2000 組、1/4000 組和 Control 組三組，從 BPL 加入病毒算實驗起始，於 4℃ 下靜置，進行病毒之不活化反應。並定期取樣檢測 TCID<sub>50</sub> 以觀察病毒力價的變化，直至無病毒存活為止。

### 2-3 試驗三：各種 pH 值 AlPO<sub>4</sub> 佐劑吸附腸病毒時間之比較

#### 2-3-1 1207-4v 與 7 種 pH 值 AlPO<sub>4</sub> 吸附分天採實驗

實驗組為將滅好菌的 AlPO<sub>4</sub> 將其 pH 調成 7 種，分別為 2.33、3、4、5、6、7、7.5，而對照組為未加入 AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O，而滅好菌後一樣將其將其 pH 調成 7 種，分別為 2.33、3、4、5、6、7、7.5，各組溶液分別以 1：8 的比例加入病毒中，各組在分別在加入後及放置於 4℃ 1 天後採樣，採樣後離心採上清液，並做 TCID<sub>50</sub> 測其值。

#### 2-3-2 1207-4v 與 7 種 pH 值 AlPO<sub>4</sub> 吸附分時採實驗

實驗組為將滅好菌的 AlPO<sub>4</sub> 將其 pH 調成 7 種，分別為 2.33、3、4、5、6、7、7.5，而對照組為未加入 AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O，而滅好菌後一樣將其將其 pH 調成 7 種，分別為 2.33、3、4、5、6、7、7.5，各組溶液分別以 1：8 的比例加入病毒中，各組在分別在加入後及放置於 4℃ 1 小時、4 小時後採樣，採樣後離心採上清液，並做 TCID<sub>50</sub> 測其值。

### 2-4 試驗四：各種 PH 值 Al(OH)<sub>3</sub> 佐劑吸附腸病毒時間之比較

#### 2-4-1 1207-4v 與 5 種 pH 值 Al(OH)<sub>3</sub> 吸附分天採實驗

實驗組為將滅好菌的 Al(OH)<sub>3</sub> 將其 pH 調成 5 種，分別為 4.5、5、6、7、7.5，而對照組為未加入 AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O，而滅好菌後一樣將其將其 pH 調成 5 種，分別為 4.5、5、6、7、7.5，各組溶液分別以 1：8 的比例加入病毒中，各組在分別在加入後及放置於 4℃ 1 天後採樣，採樣後離心採上清液，並做 TCID<sub>50</sub> 測其值。



#### 2-4-2 1207-4v 與 5 種 pH 值 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 吸附分時採實驗

實驗組為將滅好菌的  $\text{Al}(\text{OH})_3$  將其 pH 調成 5 種，分別為 4.5、5、6、7、7.5，而對照組為未加入  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，而滅好菌後一樣將其將其 pH 調成 5 種，分別為 4.5、5、6、7、7.5，各組溶液分別以 1：8 的比例加入病毒中，各組在分別在加入後及放置於 4 1 小時、4 小時後採樣，採樣後離心採上清液，並做  $\text{TCID}_{50}$  測其值。

#### 2-5 試驗五：各種 pH 值 $\text{AlPO}_4$ 佐劑吸附腸病毒免疫試驗

於免疫前一天將 7 組分別為 pH2.33、3、4、5、6、7、7.5 之  $\text{AlPO}_4$  佐劑吸附腸病毒以 1( $\text{AlPO}_4$ )：8(病毒)的比例配製，並吸附一天，每週先抽血 10 隻 ICR 小鼠，在抽血過後各在第 1 和 4 週免疫老鼠共 2 次，而繼續在每星期採血直到第 9 週，每次採血後將採到的血混合，離心取上清液，將血清做中和試驗測其抗體力價。

#### 2-6 試驗六：各種 PH 值 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐劑吸附腸病毒免疫試驗

於免疫前一天將 5 組分別為 pH4.5 5 6 7 7.5 之  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐劑吸附腸病毒以 1( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )：8(病毒)的比例配製，並吸附一天，每週先抽血 7 隻 ICR 小鼠，在抽血過後各在第 1 和 4 週免疫老鼠共 2 次，而繼續在每星期採血直到第 9 週，每次採血後將採到的血混合，離心取上清液，將血清做中和試驗測其抗體力價。

### 第三章 結果

#### 1. 病毒的特性：

Characteristics of EV71 strains

Virus strain	Year of Isolation	Location of Isolation	Virus titer in Vero cells (TCID <sub>50</sub> )	Lethality in Suckling mice
R07	1998	CH	7	-
R32	1998	TP	6.6	+
R25	1998	TC	6.67	+
R41	1998	IL	6.64	-
R63	1998	TP	7.25	-
E15	1998	CI	6.15	-
E92	2000	MC	6.25	-
E43	2000	TN	6.25	-
E59	2000	CH	7	-
YN3	1998	TP	6.75	+
CoxA16	1998	-	5.6	+
Echo9	2000	TP	6	-

#### 2. Growth kinetics of EV71 on Vero cells at MOI=1 (圖一)

設定接種病毒濃度在 MOI=1 時，病毒生長曲線於接種 48 小時後，達到最高峰。

#### 3. 試驗一：Formalin 不活化腸病毒之時間探討 (圖二)

腸病毒 71 型以福馬林作為病毒不活化劑，不論 1/2000 或 1/4000 的濃度，皆可於 30 天後將病毒力價降至零。

#### 4. 試驗二：BPL 不活化腸病毒之時間探討 (圖三)

BPL 不活化腸病毒之時間，於 7 天後將病毒力價降至零。

5. 試驗三 試驗四:各種 pH 值  $\text{AlPO}_4$  佐劑吸附腸病毒 24 小時之比較(圖四)和各種 pH 值  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐劑吸附腸病毒 24 小時之比較(圖五)

兩種鋁鹽佐劑  $\text{AlPO}_4$  和  $\text{Al}(\text{OH})_3$  皆會吸附腸病毒

6. 試驗五:各種 pH 值  $\text{AlPO}_4$  佐劑吸附腸病毒免疫試驗(圖六)

以 pH 值 7.5 的佐劑免疫力價最高,中和抗體力價 1:400

7. 試驗六:各種 pH 值  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐劑吸附腸病毒免疫試驗(圖七)

以 pH 值 7.5 的佐劑免疫力價最高,中和抗體力價 1:27

8. 試驗六:以  $\text{AlPO}_4$  為免疫佐劑的腸病毒 71 型交叉中和試驗(圖八)

以 R07、R25 和 E59 所產生的中和抗體力價最佳,可普遍中和其他腸病毒 71 型

9. 試驗六:以為  $\text{Al}(\text{OH})_3$  免疫佐劑的腸病毒 71 型交叉中和試驗(圖九)

以 R25 和 E59 所產生的中和抗體力價最佳,可普遍中和其他腸病毒 71 型

#### 第四章 討論

以不活化小兒麻痺病毒疫苗為模式，希望研究出不活化腸病毒 71 型疫苗，解決國內腸病毒 71 型傳染致害之嚴重。本計畫將取得本土分離之腸病毒 71 型共 10 株，接種於 Vero 細胞適應生長，福馬林作為病毒不活化劑，添加鋁鹽佐劑，所製備的原型疫苗，確實能免疫產生的中和抗體力價。

福馬林作為病毒不活化劑，不論 1/2000 或 1/4000 的濃度，皆可於 30 天後將病毒力價降至零。後續的免疫實驗，並證明以福馬林作為病毒不活化劑不會破壞病毒抗原的完整性，仍然可免疫產生中和抗體。磷酸鋁和氫氧化鋁，兩種鋁鹽佐劑的吸附條件都以酸鹼值等於 7.5 時最佳，所產生的中和抗體力價可高於 1 : 100。這些條件的決定，使疫苗製造的流程可以確定，將來進入量產，可加快腳步。以交叉中和實驗尋找中和效果寬廣的病毒株，作為疫苗候選株，使未來生產的疫苗可提供較好的免疫保護。目前已有 3 株病毒產生的中和抗體力價適宜，將進一步分析之間的差異，選擇適合量產程序的病毒株，作為疫苗生產的種毒。

腸病毒 71 型是把細胞裂解釋放子代病毒，對大量生產培養的純化程序不利，因此明年的研究方向將建立純化系統和 20 公升的培養規模，進入先導工廠級的製造準備。

## 參考文獻

- Aprile, M. A. and Wardlaw, A. C. (1966) Aluminum compounds as adjuvants for vaccine and toxoids in man: a review. *Can. J. Pub. Health* 57, 343-354.
- Bomford, R. (1989) Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants, in *immunological Adjuvants and Vaccines* (Gregoriadis, G., Allison, A. C., and Poste, G., eds.). Plenum, London, pp. 35-41.
- Chow, Y.-H., Huang, W.-L., Chu, Y.-D. & Tao, M.-H. Improvement of Hapatitis B Virus DNA Vaccines by Plasmids Coexpressing Hepatitis B Surface Antigen and Interleukin-2 *J.Virol.* 1997; 71, 1169-1718.
- Edelman, R. (1980) Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Dis.* 2, 370-383.
- Enterovirus Epidemic Working Group [see comments]. *N Engi J Med* 341, 929-35.
- Gupta, R. K., Rost, B. E., Relyveld, E., and Siber, G. R. (1995) Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Powell, M. F. and Newman, M. J.. eds.). Plenum, New York, pp. 229-248.
- Gupta, R. K. (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug Delivery Rev.* 32,155-172.
- Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., and Gupta, C. K. (1993) Adjuvants—a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* **II**, 293-306.
- Hem, S. L. and White, J. L. (1995) Structure and properties of aluminum-containing adjuvants, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Powell, M. F. and Newman, M. J., eds.). Plenum, New York, pp. 249-276.
- Ho, M., Chen, E. R., Hsu, K. H., Twu, S. J., Chen, K. T., Tsai, S. F., Wang, J. R., and Shih, S. R.(1999). An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *Taiwan*
- Lindblad, E. B. (1995) Aluminium adjuvants, in *The Theory' and Practical Application of Adjuvants* (Stewart-Tull, D. E. S., ed.), Wiley, Chichester, pp. 21-35.
- Lindblad, E. B. and Sparck, J. V. (1987) Basic concepts in the application of immunological adjuvants. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **14**, 1-13.
- Moregeaux, S., Tordo, N., Goniter, C. & Perrin, P. - propiolactone Treatment Impairs the Biological Activity of Residual DNA from BHK-21 Cells Infected with Rabies Virus *Vaccine* 1993; 11, 82-90.
- Montagnon, B. J., Nicolas, A. J., Fanget, B., and Peyron, L. (1981). Comparison of sensitivity of VERO cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation. *Dev Biol Stand* 47, 151-5.
- Nicklas, W. (1992) Aluminum salts. *Res. Immunol.* **143**,489-494.

- Perrin, P., & Morgeaux, S. Inactivation of DNA by  $\epsilon$ -propiolactone *Biologicals* 1995; 23, 207-211.
- Race, E., Stein, C.A., Wigg, M.D., Baksh, A., Addawe, M., Frezza, P. & Oxford, J.S. A Multistep Procedure for the Chemical inactivation of Human Immunodeficiency Virus for Use as an Experimental Vaccine *Vaccine* 1995; 16, 1567-1775.
- Rezapkin, G. V, Norwood, L. P., Taffs, R. E., Dragunsky, E. M., Levenbook, I. S., and Chumakov, K. M. (1995). Microevolution of type 3 Sabin strain of poliovirus in cell cultures and its implications for oral poliovirus vaccine quality control. *Virology* 211, 377-84.
- R.K. Gupta, V.K. Mehta, V.K. Gupta, C.N. Misra, S.N. Saxena, The Standardization of The Reverse Indirect Haemagglutination Test for The Assay of The Viral Antigen of Japanese Encephalitis Vaccine *J. of Biological Standardization* 1987; 15, 271-279.
- Salo, R.J., and Cliver, D. O. Effect of acid pH, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Arch Virol* 1976; 52, 269-282
- Taffs, R. E., Chumakov, K. M., Rezapkin, G. V., Lu, Z., Douthitt, M., Dragunsky, E. M., and Levenbook, I. S. (1995). Genetic stability and mutant selection in Sabin 2 strain of oral poliovirus vaccine grown under different cell culture conditions. *Virology* 209, 366-73.
- Wang, S. M., Liu, C. C., Tseng, H. W., Wang, J. R., Huang, C. C., Chen, Y. J., Yang, Y. J., Lin, S. J., and Yeh, T. F. (1999). Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological complications. *Clin Infect Dis* 29, 184-90.
- Wong, K. T., Chua, K. B., and Lam, S. K. (1999). Immunohistochemical detection of infected neurons as a rapid diagnosis of enterovirus 71 encephalomyelitis [letter]. *Ann Neurol* 45, 271-2.
- Wu, T. N., Tsai, S. F., Li, S. F., Lee, T. F., Huang, T. M., Wang, M. L., Hsu, K. H., and Shen, C. Y. (1999). Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis* 5, 458-6

