

計畫編號：DOH94-DC - 2033

行政院衛生署疾病管制局九十四年度自行研究計畫

三麻撲滅計畫

自行研究成果報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研檢中心

研究主持人：陳豪勇

研究人員：顏哲傑, 王聖予, 王明琴, 鄭雯月, 高銘鎡

執行期間：94年1月1日至94年12月30日

目錄

中文摘要

所謂三麻指的是小兒麻痺、麻疹及先天性德國麻疹。其中以小兒麻痺造成的生命威脅及對倖存者造成的肢體殘障後遺症最為嚴重，故在這三者中第一優先成為全球撲滅對象，麻疹則列為其次，在疫苗尚未普及的年代與醫療照護不佳的地區常成為嬰幼兒的主要死因，一般人若能於此疾病中康復，則較無明顯的後遺症存在，而先天性德國麻疹則是主要起因於懷孕婦女於前三個月內感染德國麻疹病毒造成發育期胎兒感染而導致的先天性畸型，影響程度由耳聾、白內障、先天性心臟病等不一而足，由於德國麻疹病毒感染症狀不太嚴重甚至有人根本無症狀，這也使得其在防治工作上產生相對的困難。在疫苗現世後，這三種疾病已得到有效的控制，台灣在疫苗的全面施打與公共衛生情形改善下，也隨著全球的脚步逐漸進入疾病根除或消除階段。

西元 2000 年 10 月 31 日，小兒麻痺在西太平洋區已宣佈根除，但奈及利亞及印度卻仍有野生株小兒麻痺病毒存在，為防範境外移入及疫苗衍生株傳播（海地及埃及均出現小兒麻痺病毒疫苗的危害），因此小兒麻痺防治現階段的重點工作為肢體無力患者的監視作業。其方法乃採 15 歲以下急性肢體麻痺症（Acute Flaccid Paralysis）患者及接觸者之糞便進行病毒培養鑑定。並依世界衛生組織之規定以 RD、HEP-2C 及 L20B 細胞分離病毒，分離到之病毒先以螢光抗体法篩檢小兒麻痺病毒，陽性檢體用 RT-PCR 檢驗分型，最後以小兒麻痺病毒株核酸片段易變區核酸定序以鑑定疫苗株或野生株，以防止疫苗病毒株的擴散流行。

而步入消除階段的麻疹，此階段做法則是對每一病例進行實驗室確認，同時進行病毒分離與建立分子流行病學監測機制，本研究即針對此點將 1992-2003 年的陽性個案進行分子流行病學的分析探討。依 WHO 於 1998 年公布的標準株及基因分型的依據，針對麻疹核蛋白基因羧基端 456 個核苷酸定序作為分型基礎。

而對於先天性德國麻疹的撲滅目標，首先即是對德國麻疹個案發生率的監測及確認，現階段亦是針對每一通報個案進行採檢確認，而主要賴以判定的血清學方法，則因較易有偽陽性的發生，故除傳統 IgM 陽性來判定個案外，希望再

經由 IgG 親和性試驗的建立來輔助診斷。本研究搜集 1992-2005 年的德國麻疹血清學 IgM 陽性個案，以不同廠牌試劑組重覆 IgM 試驗及 IgG 親和性試驗來比較其結果。

在小兒麻痺部份本研究結果分析本年度監測分離的 30 株小兒麻痺病毒株，結果皆為疫苗株。

在麻疹部份本研究結果發現由 1992-2003 年定序所得 50 名麻疹個案 N 基因序列比對顯示，在台灣曾出現的麻疹基因型別有 H1, H2, D3, D5, D9 和 G2，其中以 H1 型佔最多，且自 1992-2003 年間皆可發現其存在，1994 年桃園縣的小流行及 2001 年竹東鎮的聚集個案與 2002 年台中縣的流行主要皆為 H1 型，而 1997 年台中縣的聚集個案則顯示主要型別為 G2, 1998 年嘉義縣的流行型別則為 H2。

在德國麻疹部分本研究結果共分析 362 件德國麻疹血清學診斷的陽性個案，若用改用 IgG 呈現低親和性試驗結果為判定標準，則只有 347 為陽性（佔 95.85 %），在 15 件判定結果不一致檢體中有 11 件為 2001 年以後的檢體，其中 7 件無臨床症狀表現，突顯出疾病發生率降低下德國麻疹僅以 IgM 判定所造成偽陽性機率上升的問題。

在疾病走向根除階段的麻疹，病毒株的分離及分子流病學的監測應持續進行，以瞭解全球麻疹分佈及傳遞情況，向全球根除目標邁進。

針對先天性德國麻疹的消除議題，則是先掌握德國麻疹的發生情況，礙於現前檢驗技術的瓶頸，建議將現階段由單一廠牌德國麻疹 IgM 檢驗結果作判定標準的方式，改為綜合至少二家不同應用原理的 IgM 檢驗試劑，並配合 IgG 低親和性試驗結果者為真陽性，如此應能較貼近實際的發生率。

關鍵詞：小兒麻痺、麻疹、先天性德國麻疹、IgG 親和性試驗

Abstract

“San-ma,” an often-heard Chinese term used by healthcare workers, refers to three diseases, i.e. poliomyelitis, measles, and congenital rubella syndrome. Among these three, poliomyelitis is more life threatening and its sequel of lower limbs disability much more serious than those of the other two if any, so it was chosen to be the first of the three as global eradication target. Measles is going to be the second one. In the pre-vaccine era, it used to be the leading cause of infant mortality and still is in some poor sanitation areas. A good thing is, there is almost no sequel after the recovery from measles. The major cause of congenital rubella syndrome is rubella virus infection in a pregnant woman with developing fetus during the first trimester of gestation, and thereafter often comes out an abnormal baby. The degree of abnormality of the baby varies from deaf, cataracts to congenital heart disease. Because the symptom in a woman infected by rubella virus is rarely serious and may even be asymptomatic so it's very difficult to interrupt the transmission of the disease in time. Fortunately, the successful development of vaccine for each of them has put these three diseases under control. After mass vaccination campaigns and improvement of overall sanitation in Taiwan societies, we were ready for the eradication or elimination phase of these three diseases and able to be part of the global eradication program.

Poliomyelitis was declared eradicated in Western Pacific Region on October 31, 2000, but some wild types of poliovirus are still active in Nigeria and India. In order to prevent the wild type virus from entering Taiwan from abroad and the transmission of vaccine-derived poliovirus (which endangers people in Haiti and Egypt), the surveillance of acute flaccid paralysis is a major task for preventing poliomyelitis during this post-eradication phase. The method is sampling the feces of acute flaccid paralysis patients under fifteen and their contacts to culture virus and make identification. We use RD, HEP-2C and L20B cells to isolate virus following a guideline announced by WHO, the isolated virus was first screened with a specific fluorescence poliovirus antibody, and the positive one was further processed with a RT-PCR method to determine its type. Finally, we sequence the most hyper variable region of the gene to discriminate the vaccine and wild type strains and thus prevent the outbreak of vaccine strain polio.

The method used for preventing measles in the elimination phase is to laboratory confirm each and every suspected case and try isolate virus and set up molecular surveillance at the same time. In this study we collected all positive measles cases between 1992 and 2003 and analyzes the data with a well-defined molecular epidemiological method. With the help of some standard reference strains and a guideline for genotyping of measles virus announced by WHO in 1998, we have chosen the carboxyl terminal 456 base pair sequence in the measles nucleoprotein as the basis for genotyping.

To reach the goal of eradicating congenital rubella syndrome, the first priority is surveillance and confirmation of suspected rubella cases, and we have to collect specimen from every suspected case. Because the major serological method used in

the suspected case confirmation has a rather high rate for false positive, we ended up to set up a new IgG avidity method to assist the traditional IgM positive criteria to confirm rubella case. In this study, we collected rubella IgM positive sera in the period of 1992-2005 and repeated the IgM test with kits of different brands and the IgG avidity test to compare the results.

In the result we obtained in the analysis of polio virus portion, we found that 30 polio virus strains we got from surveillance system were all belongs to vaccine strains.

In the results we obtained in the analysis for the measles portion, we found that the N gene sequence we got from 50 measles cases during the 1992-2003 period in Taiwan belong to H1, H2, D3, D5, D9 and G2 genotypes, and the H1 was predominant and lasted throughout 1992-2003, which was responsible for the endemic outbreaks in Tao-Yuan County in 1994, the small outbreak in Chu-Dong Township in 2001, and the endemic outbreaks of Tai-Chung County in 2002. G2 turned out to be the cause for small outbreaks in Tai-Chung in 1997, and H2 that of small outbreaks in Chia-Yi County in 1998.

As to the rubella portion, we have analyzed a total of 362 serological confirmed rubella cases. If we change the criteria of confirmed case from IgM positive to low IgG avidity, then only 347 cases (95.85%) were positive. We found 11 of the 15 discordant serum samples were collected after 2001 and 7 cases were asymptomatic, and thus the false positive rate rises according to the IgM results, albeit it would be a problem only when the incidence is low.

In the process of advancement into the eradication phase for measles, collecting virus strains and the surveillance in molecular epidemiological field should be actively kept on going in order to find out the distribution and transmission pathway of measles virus in the preparation for global eradication goal.

The issue for congenital rubella syndrome elimination includes that we should ascertain the morbidity of rubella in the first place. However, restricted to the technical limitations that we are not able to surmount at present, we recommend a change in the criteria for confirming a rubella case from only one positive IgM result to at least two IgM positive results matching each other using two different kits of varied principles, and get the low IgG avidity result at the same time to find out a true positive, it will be rather close to the real morbidity.

Keyword : polio, measles, CRS, IgG avidity test

前言

台灣於 1991 年開始持續推動三麻根除計畫,以五年為一期程,至今已進入第三期,其中小兒麻痺已於 2000 年 10 月 31 日於西太平洋區宣佈根除。依 WHO 的統計資料指出,通報至 WHO 的小兒麻痺的病例數由 1988 年的 35252 例降至 1996 年 4074 例,在這八年時間內大幅下降 88 %¹。美洲區則早已於 1994 年證實根除小兒麻痺,最後一名病例為 1991 年 9 月由秘魯所通報²。目前全球小兒麻痺仍在地方性傳播的區域主要為非州區,尤以剛果共和國及奈及亞為主要野生株小兒麻痺病毒傳播地,另一野生株的主要貯區則在東南亞,以阿富汗,巴基斯坦,印度,孟加拉,尼泊爾等國家為主¹。而近年來由疫苗衍生株引起的流行也不容忽視,埃及³,多明尼加共和國及海地⁴,馬達加斯加⁵,菲律賓及泰國^{6,7}皆有相關報導。而台灣在 2001 年亦發現首例小兒麻痺衍生株引起的小兒麻痺,最後發現個案本身有免疫不全的情況,屬於單一個案,疫情並未擴散⁸。

小兒麻痺雖在台灣已宣佈除,但全球並未完成根除,在交通往來便捷的情形下,根除後的保全作業相當重要。實驗室急性無力肢體麻痺監視為保全作業中很重要的一環,依據世界衛生組織指南,每年 15 歲以下兒童十萬人口 AFP 報告率大於等於 1,至少 80 % 之 AFP 報告病例在報告後 48 小時內展開病例調查,至少 80 % 在發病後十四天內採檢適當糞便檢體,並採取 5 名以上接觸者適當糞便檢體,28 天內完成檢驗報告,若 AFP 個案及接觸者分離到小兒麻痺株病毒,則進一步以 VP1 基因定序為準則與疫苗株小兒麻痺病毒(OPV)比較,以區分為類似疫苗株、疫苗衍生株或野生株。居住鄰里則需疫調口服疫苗完成率,擴大採檢研判病毒株是否流傳到社區,遏止疫情聚集擴大發生。本研究目的有關小兒麻痺的子題即是針對根除後的保全期 AFP 監視系統的實驗室運作。

麻疹是一種急性且具高傳染力的病毒性疾病,雖然活性減毒疫苗早在西元 1963 年問世,但在低接種率的開發中國家,麻疹仍然是兒童的主要殺手,WHO 的資料顯示,在西元 2000 年因疫苗可預防疾病而造成的兒童死亡人數約 1,700,000 人次,而其中高達 770,000 人(46 %)的死因為麻疹,而以地理區域分佈來

看,這 77 萬人中佔 58 % (435,000 人)發生在非洲地區, 26 % (202,000 人)發生在東南亞地區⁹。麻疹是可藉由疫苗而得以良好控制的疾病,在 1991-2001 年間,WHO 估算全球麻疹的接種率在 69 %-76 %之間,因區域性與國家而有很大差異,美洲、歐洲、西太平洋區的接種率在 82 -94 %之間,東地中海區估計在 67 -73 % 之間,東南亞區域在 50 -72 %之間,而非洲區接種率最低,僅在 51 -60 % 之間。為了提高至少一劑麻疹疫苗的接種率,世界衛生組織(WHO)與聯合國兒童基金會(UNICEF)建議至少提供第二次的接種機會以加強個人及群體的免疫,即若兒童因故錯過第一次的接種或第一次接種卻未產生免疫力者可藉此機會補強其免疫情形,在 1997-2001 年,191 個國家中有 156 國(佔 82 %)經由常規的健康照護提供第二次接種的機會⁹。

台灣地區從 1968 年開始引進麻疹疫苗,並於 1978 年實施全面麻疹疫苗接種之後,麻疹死亡病例數逐漸從數百例減少為數十例,1983 年更進一步降低到只有一例。於 1985 年及 1988-9 年曾發生兩次全島性流行¹⁰,在 1985 年的流行甚至造成 97 例死亡,而後在 1994 年桃園地區¹¹及 2002 年台中地區¹²各有地區性流行發生,確定病例數分別為 32 人及 27 人,主要年齡層分別在 3-9 歲與 9-14 歲,其原因主要皆因預防接種率不夠高導致易感人口累積所致。

WHO 建議收集麻疹聚集或散發散個案的鼻咽或尿液檢體進行基因分析以瞭解流行的病毒型態¹³,並於 1998 年公布一致的命名方法與基因型別比對的標準株序列^{14,15},經由全球於麻疹流行區域所得的病毒株分析,可發現不同的基因型別有其區域性的分布特性,近年的麻疹疫情報導除了時間,地點,年齡層,疫苗接種情形分析外,通常還會加上基因型別的探討,綜合全球各地的基因型別出現時間與地點,來追蹤病毒傳遞路徑,加拿大¹⁶、美國¹⁷、澳洲¹⁸等地皆有針對國內長時間內收集的病毒株型別作進一步探討分析,並證明已成功阻斷內生性麻疹的傳遞,麻疹防治已達消除階段。亞洲地區國家在這方面的研究較缺乏。故本研究目的即收集歷年來本土麻疹陽性個案檢體加以分析基因型別的變化,一方面驗證麻疹控制成效,也提供全球研究麻疹傳遞路徑的資訊。

德國麻疹的症狀為主要為發燒、出疹,少有併發症出現,除非是在懷孕前三

個月的婦女感染會導致胎兒流產，死產或先天性德國麻疹症候群的嬰兒。要單以臨床症狀來診斷德國麻疹是不可信的，因許多疾病也主要以發燒、出疹症狀來表現¹⁹(表一)，故實驗室診斷在德國麻疹疑似個案的確認上是不可或缺的。

在疾病的控制進入消除階段，會要求針對每一名疑似個案做疫情調查及採樣確認¹⁹(表二)，目前確認個案的實驗室診斷方法主要以血清中德國麻疹 IgM 陽性為判斷標準，在實際的業務執行中，常會遇到的問題則是德國麻疹 IgM 偽陽性的問題，常遇到不同廠牌的試劑產生不同的結果，而造成判定的困擾，更麻煩的是懷孕婦女驗出德國麻疹 IgM 抗體結果，在不同廠牌試劑檢測下呈現相反的解讀，一般若有臨床症狀且在適當時間點採檢，實驗診斷上並不困難，但因德國麻疹的症狀輕微甚至無自覺症狀，而使得檢驗診斷產生困難，因德國麻疹的防治主要乃是針對先天性德國麻疹症候群，現今的做法則是針對這種情形的婦女，持續追綜至生產，並抽取新生兒血液做檢驗確認及臨床醫師診斷排除先天性德國感染為止。德國麻疹 IgM 偽陽性的問題在文獻中有許多探討²⁰⁻²⁴。針對初次感染與再次感染的區分方法-IgG 親和性試驗 (IgG Avidity test) 在文獻中也有許多討論²⁵⁻²⁷。本研究的目的是希望得知在常規的實驗診斷上，我們可以如何改進現有方法，如需加做那些鑑別診斷試驗以能更正確的排除偽陽性個案。

材料與方法

本研究依三項疾病設定不同的主題，研究的實施方法與步驟將隨之不同，茲分項陳述如下：

一、深入了解小兒麻痺病毒目前在台灣殘存之情況，以落實小兒麻痺病毒根除計畫：

壹、檢體收集

台灣全省各醫療院所，醫師發現急性無力肢體麻痺(acute flaccid paralysis)徵狀病患，立刻通報所在地衛生局急性無力肢體麻痺承辦人員，衛生局於病患發病日 14 天內採取二次糞便檢體，此二次檢體至少相隔 24 小時。同時並採取個案 15 歲以下接觸者 5 名檢體，每一檢體裝一個夾鏈袋內附 3M.10 I 溫度監測片，放置檢體運送箱，以低溫運輸於 72 小時內送達本局腸病毒實驗室，進行病毒培養與分離及分子生物學分型鑑定。檢體預估件數 600 件。

貳、檢體前處理

取適量糞便檢體，PBS 溶液作成 10% 懸浮液，移到垂直振盪器上振盪 30 分鐘後，2000g 離心 15 分鐘，取上清液加入 1/10 量冰冷氯仿，充分混合振盪再次離心，吸取上清液裝於保存瓶中。

參、病毒分離

前處理之檢體 0.2ml 接種於 RD, Hep-2, L20B 三種細胞株之培養管中，輕輕搖勻，置 37°C，5%CO₂ 培養箱，每天在顯微鏡下觀察並紀錄結果，若出現細胞病變(CPE)，培養管置-80°C 冷凍後於 37°C 解凍，重複二次，在 2,000g 離心 15 分鐘收取上清液做小兒麻痺病毒分型鑑定及分子生物學分型。接種細胞觀察至第 7 天無病變，則於冷凍、解凍處理二次收集細胞及培養液 4°C，2,100 xg 離心 15 分鐘。取上清液再接種一次，觀察至第 7 天仍無細胞病變則判定為病毒分離陰性。細胞培養管中細胞病變(CPE)呈現陽性約 3 價，進行免疫螢光鑑定；並收集上清液進行分子生物實驗。

肆、分子生物學方法取得小兒麻痺病毒基因序列

由分離到的小兒麻痺病毒株將 VP1 基因定序，完整 VP1(nucleotides 2480 to 3385) Q8: AAG AGG TCT CTR(A) TTC CAC AT (3508-3527), S1A(S2-3009A) :TTG CCA AGT GTA GTC GTC CCA,S2S (S2-2854S): TTC ACC TAT TCT AGA TTT GA, Y7(S2-2401S)(2399 to2421): GGT TTT GTG TCA GCG TGT AAT GA

以 RT-PCR 方法將整個序列分段作出，使用的引子(primer), 方法為由 140ul 培養液將病毒 RNA 用 Qiamp viral RNA Kit (Qiagen)抽取出來，於同一管子內加入 5ul 的 RNA，每個引子(primer)10 uM，0.2mM 的 d-NTP，2 mM 氯化鎂，Tris-HCl，10 U 的核酸抑制酶，5 U 的聚合酵素總量 50ul，以 42°C，15 min 然後 95°C，3min 先合成 cDNA，再 35 個循環的 94°C，30 秒，50°C，30 秒和 70°C，1 分鐘的增量，RT-PCR 的產物以 1.5% agarose gels 分析，此 VDPP 序列從所得到的各片段的 DNA，用 Prism Ready Reaction Dyedexoxy Terminator Cycle sequencing kit 含 fluorescent dye-labeled dideoxynucleotides (Applied Biosystem, Foster City, California)作定序循環，以自動定序儀(model 3730, Applied Biosystem)雙向定序所有基因。所得之基因序列以 DNASTAR 套裝軟體進行排列比序，以 PHYLIP 或 MEGA 等有關 maximum likelihood 軟體架構分析小兒麻痺病毒株基因樹圖譜。

二、台灣地區麻疹病毒分子流行病學研究

壹、檢體收集

1992-2003 年血清學確認為麻疹陽性個案血清，咽喉拭子，尿液等原檢體預估數 200 件。1992-2003 分離到的病毒株共 10 株。

貳、檢體前處理

- (一) 將咽喉拭子置入 2 ml 含 2x 抗生素(200 unit/ml penicillin, 200 ug/ml streptomycin)的 DMEM 培養基攪拌後，靜置一小時，取出咽喉拭子，收集培養液。
- (二) 含抗凝劑的血液 2 ml 與 2 ml HBSS 混合後，緩緩注於含 3 ml Ficoll-Paque 的離心管上方，以 400 xg，18°C-20°C 下離心 40 分鐘，以無菌的吸管深入

吸取夾於 Ficoll-Paque 及血清中間的一小圈模糊區域(淋巴球)，加三倍體積量的 HBSS 吸放數次，充份清洗後，以 100 x g，18°C-20°C 下離心 10 分鐘，去除上清液，再重複一次清洗步驟，最後以 2 ml 含 2x 抗生素的 DMEM 培養基與沉澱混合，收集培養液。

(三) 尿液以 1500 rpm、4°C 下離心 10 分鐘後、棄上清液、將沉澱與 2 ml 含 2x 抗生素的 DMEM 培養基充份混合後，收集培養液。

參、分子生物學實驗：

1. 引子對設計：利用國家衛生研究院 (NHRI) 提供的 PDA (primer design assistant-<http://dbb.nhri.org.tw/primer/>) 找出 H 與 N 基因之引子對。

甲、H 基因：截取含 H 基因的麻疹病毒株部分序列 5800 bps，將此序列丟入 sequence input 區塊，設定引子長度為 21 mer，PCR 產物長度為 600 bps，勾選 Dimer check 及 Hairpin check 下去搜尋，共找出 53 對引子組，H 基因位相對 5800 bps 的位置在 1671-3524，故選取 4 組引子，重疊組合後能將 H 基因全長含概其中。其詳細資訊如下表：

基因	引子對	序列	GC %	Tm	offset	rank	產物長度
H	H1F	gtcatcaagcaaccaccgca c	57.14	51.19	1557	30	600
	H1R	gagctcttcagcagccacatc	57.14	51.19	2156		
	H2F	gtgtatcaaccgcccagaga g	57.14	51.19	2084	5	600
	H2R	gggaccagattgcatgtc g	61.90	53.14	2683		
	H3F	actcgcagccctttgtcaegg	61.90	53.14	2555	28	600
	H3R	tggcagtcttcgcctgcttc	61.90	53.14	3154		
	H4F	acacacgggttcagggatgga c	57.14	51.19	2976	3	600
	H4R	tgggtatgcctgatgtctggg	57.14	51.19	3575		

乙：N 基因：引子對選用如分析 2002 年病毒株基因型所用¹²，即 MV59 與 MV64 為第一次 PCR 引子對而 MV60 與 MV63 則為巢式 PCR(nested PCR)之引子對。詳細資訊如下：

基因	引子對	序列	GC %	Tm	產物長度
N	MV59	GATATGTGACATTGATACATATAT	25.0%	46.1	874
	MV64	TATAACAATGATGGAGGGTAG	38.1	48.8	
	MV60	GCTATGCCATGGGAGTAGGAGTGG	58.3	62.3	590
	MV63	GGCCTCTCGCACCTAGTCTAG	61.9	59.4	

2. 培養的病毒株或臨床檢體以 QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) 抽取 RNA。取檢體 140 ul 加入 560 ul Buffer AVL 室溫作用 10 分鐘，再加入 560 ul 絕對酒精充份混合，將混合液通 QIAamp spin column，column 以 Buffer AW1&AW2 清洗後，以 60 ul elution buffer 將 RNA 溶出。
3. 以 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 進行 PCR 試驗。其反應條件設定如下：取步驟 2 製備的 RNA 模版 5 ul 與最終濃度各 0.6 uM 的引子對、0.4 mM dNTP、8 unit Rnase inhibitor、2.0 ul 的 RT-PCR enzyme mix 與 10 ul 試劑組所附 5X OnesStep RT-PCR buffer(成份為 12.5 mM MgCl₂、Tris. HCl、KCl、(NH₄)₂SO₄、DTT 等)最終反應體積為 50 ul，於 50°C 反應 30 分鐘，95°C 反應 15 分鐘，35 個循環 94°C,30 秒、51°C,30 秒(針對 N 基因)、[61°C,30 秒(針對 H 基因)]、72°C, 1 分鐘，最後 72°C 反應 10 分鐘增量。
4. 以 Fermentas 2X PCR master mix 進行 Nested PCR 反應，反應條件如下：取步驟 3 製備的 DNA 模版 5 ul 與最終濃度各 0.2 uM 引子對(MV60 與 MV63)配合 25 ul 2X PCR master mix buffer(成份為 0.05U/ul Taq DNA polymerase、4mM MgCl₂、0.4 mM dNTP 及其他 PCR 反應所需成份) 最終反應體積為 50 ul，於 95°C 反應 2 分鐘，35 個循環 94°C,30 秒、63°C,30 秒、72°C, 1 分鐘，最後 72°C 反應 10 分鐘增量。

5. 將 PCR 陽性結果的產物定序，利用 DNASTAR 軟體截取 N 基因-COOH 端 456 bps 核酸與接合 H 基因成 1854 bps 核酸，再由 Genbank 抓取各基因型參考病毒株的相對應序列，經由 MEGA 3.1 版軟體進行演化分析。

三、德國麻疹血清學 IgM 之偽陽性探討及分子生物學診斷方法的建立

壹、檢體來源：

甲：歷年來收件之德國麻疹疑似個案之血清。預估 IgM 陽性與 IgM 陰性血清各 300 支。

乙：94 年傳染病系統通報之疑似德國麻疹個案

貳、血清學試驗：

甲、 德國麻疹 IgM 抗體：以 Behring anti-rubella IgM (indirect EIA 原理) 及 DSL rubella virus IgM (capture IgM EIA 原理) 測血清抗體 IgM 情形。

乙、 德國麻疹 IgG 抗體：以 Behring anti-rubella IgG 及 DSL rubella virus IgG 測血清抗體 IgG 情形。

丙、 IgG avidity 試驗：取德國麻疹 IgG 陽性血清，以 8 M urea 及 35 mM DEA(diethylamine)為親和性實驗試劑，修正 Behring anti-rubella IgG 及 DSL rubella virus IgG 試劑組部分流程進行親和性試驗。其步驟如下：將血清依試劑組說明書建議的濃度稀釋後，加入含抗原的微量孔盤 3 重複，37°C 下作用一段時間後（時間依各試劑組建議），分別以含 8 M urea、35 mM DEA 的 wash solution 及 normal wash solution 清洗微量孔盤，讓其浸泡孔盤 5 分鐘後，再吸出，如此重複三次，而後加入含酵素的抗人類 IgG 抗體，37°C 下作用一段時間（時間依各試劑組建議），再以 normal wash solution 清洗孔盤，最後加入受質於室溫下作用一段時間後（時間依各試劑組建議），再加入反應終止劑，並以 450 nm 波長測定吸值。抗體親和性係數值(Avidity Index)的計算方式如下：(親和性試劑作用的孔盤所測吸光值/正常操作程序下所測得的吸光值) × 100。當親和性係數值 < 30 為低親和性抗體-代表初次感染，> 30 為高

親和性抗體-代表非初次感染。

丁、 Parvo B19 IgM 檢測：以 Biotrin parvovirus B19 IgM ELISA 試劑組檢驗。步驟依試劑組指示說明操作之。

戊、 RF IgM 檢測：以 Cambridge Life Sciences plc Autozyme RF IgM ELISA kit 檢驗，步驟依試劑組指示說明操作之。

己、 CMV IgM 檢測：以 DSL CMV IgM kit 檢驗，步驟依試劑組指示說明操作之。

庚、EBV 抗體檢測：選取 VCA IgM 及 EBNA IgG 為標記測定是否有 IM (infectious mononucleosis) 情形。以 DSL 廠牌測試之。步驟依試劑組指示說明操作之。

參、檢驗結果分析：

以呈現低抗體親和性或有兩次採檢抗體呈顯著上升的檢體，視為德國麻疹陽性確定案例，比較其與 IgM 陽性但 IgG 非低親和性抗體或其他 IgM 抗體陰性血清，其他諸如 RF、B19、CMV、EBV 標記的陽性發生率，是否有顯著不同。

肆、分子生物學實驗：

一、引子對選擇：

參考文獻探討「20-22」，主要的引子設計皆是針對 E1 蛋白，擇定如下三組進行實驗條件測試，詳細序列及產物大小如下：

引子		序列	產物大小	註
First round	R2	5' CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC 3'	185 bps	REF 20
	R7	5' CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA 3'		
Nested	R11	5' CTC GAG GTC CAG GTC CCG CC 3'	143 bps	
	R8C	5' GAA TGG CGT TGG CAA ACC GG 3'		
First round	Rub 1F	5' CGT CTG GCA ACT CTC CGT 3'	381 bps	REF 21
	Rub 1R	5' CGT ATG TGG AGT CCG CAC T 3'		

Nested	Rub 2F	5' CAC GCC GCA CGG ACA ACT 3'	289 bps	REF 22
	Rub 2R	5' GAG AGC CTA TGA CAG GCG TGA 3'		
First round	RE1.1a	5' GTT CCA TAC AGA GAC CAG GA 3'	581 bps	
	RE1.2Ra	5' ACT GGT AGC ACC CGG TCA CA 3'		
Nested	RE1.3	5' ACC GTC TGG CAA CTC TCC GT 3'	553 bps	
	RE1.4R	5' ACC CGG TCA CAC GCA CAT TG 3'		

二、VERO 培養後的疫苗株以 QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) 抽取

RNA，以 RNase free H₂O 將抽出的 RNA 作 10 倍序列稀釋。

三、以 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 進行 PCR 試驗，配合可設溫度梯度的

核酸增殖儀，找出可測得最低濃度的反應黏合溫度。

四、血清學陽性檢體檢測。

結果：

本結果依三種不同病毒設定的研究子題分別敘述：

深入了解小兒麻痺病毒目前在台灣殘存之情況，以落實小兒麻痺病毒根除計畫：

94年1月至94年12月中旬，共收集個案檢體161件及接者檢體380件及由合約實驗室寄回之小兒麻痺病毒株29件。其中檢出小兒麻痺病毒3株，經分析屬於沙賓沙賓疫苗第二型，腺病毒3株，非小兒麻痺之腸病毒株17株。而合約實驗室寄回之小兒麻痺病毒株分析確認27株小兒麻痺病毒株核酸變異區VP1比對均小於1%，為疫苗病毒株。

台灣地區麻疹病毒分子流行病學研究

自1992-2003年間收集的麻疹IgM陽性個案血清(漿)共102件其中21件呈現PCR陽性結果；麻疹IgM與IgG陰性的血清(漿)共69件，有7件呈現PCR陽性結果；經Ficoll-Hypaque自全血中分離之周邊血液單核球9件，有5件呈現PCR陽性結果；尿液共12件，有9件呈現PCR陽性結果；咽喉拭子10件，有9件呈現PCR陽性結果。(表三)

經比對個案資料顯示，此47件PCR陽性檢體分別屬於33名個案，分別為1992年3名，1993年2名，1997年2名，1998年1名，2000年2名，2001年5名，2002年14名，2003年4名。另有10株歷年分離自10名個案的病毒株，包括1994年5株，2001年3株，2002年2株，與原檢體PCR陽性檢出的33名個案比對共新增6名個案，故自1992-2003年間共取得39名個案之基因定序資料。(表四)

由NCBI網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下載WHO公布的麻疹病

毒株基因型參考株 N 基因序列(表五)，截取-COOH 端 456 個核苷酸位置與 39 名個案之 N 基因-COOH 端 456 個核苷酸序列比對，再以 Mega 3.1 軟體繪製演化樹圖，可歸類出 39 名個案的基因型別(表六)。其中 28 名個案屬 H1 基因型、5 名個案屬於 D3 基因型、2 名個案屬於 D5 基因型、D9 與 G2 基因型各一名個案、而另兩名個案屬於 H2 基因型。針對 28 名 H1 基因型的 N 基因序列 (456 b.p.) 比對，發現實驗編號 81-92、82-11、82-26、89-20 序列完全相同；實驗編號 Gu、In、Chen、Tseng 序列完全相同；實驗編號 90-9、90-10 完全相同；實驗編號 90-18、90-29 完全相同；實驗編號 91-39、91-47、91-50、91-50D35、91-50D37、91-53、91-54、91-56 完全相同 (圖一)。為免依 39 名個案資料同時繪製演化樹圖，而致圖型太過龐雜，我們將同一年份分離而 N 基因序列完全相同者僅取其中之一為代表繪製演化樹圖 (圖二) 探討不同年份間病毒株彼此間的相關性。另分析 10 株病毒株 H 基因全長 1854 核苷酸序列，並將其與麻疹病毒基因型參考株之 H 比對，以 Mega 3.1 繪製的演化圖(圖三)，發現其所屬基因型別與以 N 基因序列分析所得相同。針對檢出最多個案的 H1 基因型，其 N 基因 456 b.p. 的差異位置與標準株比較如圖四所示。

德國麻疹血清學 IgM 之偽陽性探討及分子生物學診斷方法的建立

(一)、不同廠牌試劑組檢驗差異性的探討

Dabe Behring 廠牌德國麻疹 IgM 檢驗試劑組應用的原理主要為 Indirect-IgM(圖五)，DSL 廠牌德國麻疹 IgM 檢驗試劑組應用的原理主要為 capture- IgM(圖六)。本研究共搜集歷年以 Dade Behring 廠牌檢驗結果為德國麻疹 IgM 陽性與 IgG 陽性血清共 366 支，以 DSL 重覆德國麻疹 IgM 結果，有 362 支為陽性，4 支為陰性。一致性達

98.9 %；而 129 支 Dade Behring 廠牌檢驗結果為德國麻疹 IgM 陰性與 IgG 陽性血清，以 DSL 廠牌德國麻疹 IgM 檢驗試劑組重複試驗，結果也皆為陰性，一致性達 100 %，而 6 支 Dade Behring 廠牌檢驗結果為 Equivocal 者，以 DSL 廠牌德國麻疹 IgM 檢驗試劑組重複試驗，結果 2 支為陽性、2 支為陰性、2 支為 Equivocal。以全部總數 501 支血清而言，此二廠牌試劑的一致性為 98.4 %。(表七)

(二)、德國麻疹 IgM 陽性與 IgG 低親和性判定陽性個案的差異

以 366 件原 Behring rubella IgM 試劑組檢測陽性的檢體做 IgG 親和性試驗，以低親和性(即 Avidity Index < 30)為陽性個案判定標準，並以 8 M urea 及 35 mM DEA 做為親和性試驗之試劑，發現以 Behring 廠牌 IgG 試劑組配合 8 M urea 及 35 mM DEA 親和性試劑檢測判定陽性個案數各為 350 件，而以 DSL 廠牌 IgG 試劑組配合 8 M urea 及 35 mM DEA 親和性試劑判定之陽性個案數各為 351 件，即與原檢驗判定之陽性個案(德國麻疹 IgM 陽性)的一致性僅 95.6 %

(Behring 廠牌)與 95.9 %(DSL 廠牌)，而原 366 件 Behring rubella IgM 試劑組檢測陽性的檢體中有 4 件為 DSL rubella IgM 陰性，此 4 件 IgM 結果不一致的檢體，進行 IgG 親和性試驗的結果，不論是 Behring 或 DSL 廠牌 IgG 檢測試劑配合 8M urea 或 35mM DEA 之親和性試劑，皆未呈現親和性試驗判定之陽性標準(Avidity Index < 30)。(表八)

(三)、德國麻疹 IgM 陰性檢體之親和性試驗對照

129 件經 Behring 與 DSL 二種德國麻疹 IgM 檢驗皆為陰性的血清，測試其 IgG 親和性試驗結果發現以 Behring 廠牌 IgG 試劑組配合 8M urea 與 35 mM DEA 的親和性試劑有 3 件呈現低親和性，而以 DSL 廠牌 IgG 試劑組配合親和性試劑 8M urea 測試結果有 20 件呈

現低親和性而以 35 mM DEA 為親和性試劑者則有 15 件呈現低和性。(表九)

(四)、德國麻疹 IgM equivocal 檢體之親和性試驗對照

有 6 件以 Behring rubella IgM 試劑組檢測結果為 equivocal 者，經另一廠牌 DSL rubella IgM 檢測結果呈現 2 件陽性，2 件陰性，2 件為 equivocal，而進一步進行 IgG 的親和性試驗，則發現一例 DSL rubella IgM 檢測結果為陰性者，其在 2 種廠牌及 2 種不同親和性試劑的檢測中皆呈現低親和性，而另一例在 Behring 及 DSL 兩種廠牌 rubella IgM 皆為 equivocal 者，僅在 DSL 廠牌 IgG 親和性試驗中呈現低親和性結果。(表十)

(五)、德國麻疹 IgM 陽性的檢體 parvoB19 IgM 檢測陽性機率

在 362 件以 Behring 與 DSL rubella IgM 試劑皆為陽性的檢體中有 2 件(0.55%) 同時 parvoB19 IgM 檢測亦呈現陽性，而 129 件 Behring 與 DSL rubella IgM 試劑皆為陰性的檢體中則有 11 件為 parvoB19 IgM 陽性(8.5%)。

(六)、RF 對德國麻疹 IgM 檢測的影響

在 366 件德國麻疹 IgM 陽性血清檢體中，有 32 件 RF IgM 檢測為陽性(8.74%)，而對照組(德國麻疹 IgM 陰性)中 94 件檢體有 5 件為 RF IgM 陽性(5.32%)。

(七)、德國麻疹 IgM 陽性的檢體 CMV IgM 檢測陽性機率

在 366 件 Behring rubella IgM 檢驗陽性的血清中有 2 件同時 CMV IgM 亦為陽性(0.55%)，而其中 1 件在 DSL rubella IgM 結果為陰性。

(八)、德國麻疹 IgM 陽性的檢體 EBV 檢測結果

代表 EBV 陽性感染之 VCA IgM 僅一例為陽性，但其 EBNA IgG 的

檢測因為陰性，試劑的敏感度與專一性需有臨床相關病人檢體做進一步證實。

(九)、分子生物學診斷條件測試

經德國麻疹疫苗株抽出的 RNA 稀釋 10^{-5} 次方後測試三組文獻上的引子對後發現 RE1.1a、RE1.2Ra 與 RE1.3F、RE1.4R 的引子對專一性不佳，未出現預期大小的產物。

Rub 1F、Rub 1R 與 Rub 2F、Rub 2R 的引子對在 Rub 1F、Rub 1R，溫度 54.6°C 下進行第一次 PCR、Rub 2F、Rub 2R，溫度 60°C 下進行第二次 PCR，可得到較佳的專一性產物，可測得的 RNA 為經 10^{-6} 稀釋。

R2、R7 與 R11、R8C 引子對在 R2、R7，溫度 62°C 下進行第一次 PCR 及 R11、R8C，溫度 58°C 下進行第二次 PCR，可測得 RNA 為經 10^{-7} 稀釋，且產物濃度較高。

討論：

台灣地區麻疹病毒分子流行病學研究

麻疹在疾病控制階段(Control Phase)主要採症狀認定，通常未採檢，在疫苗控制下，個案數銳減，偶有爆發流行時，才會採檢以確認感染源。台灣地區有記載全島大流行發生在民國 74 及 77-78 年間，而民國 83 年及 91 年則有地區性的流行。在民國 81 年以前無任何檢體留下，故無法由分子生物學的方式進行探討，而民國 90 年以前亦未針對個案留下詳細的疫調資料，故也無法得知是否可能有境外移入的可能。本研究即針對 81-92 年間收件之麻疹疑似個案檢體共計 146 名所採得的 202 件含血清、全血、咽喉拭子、尿液等檢體進行檢測，結果共 33 名個案 47 件檢體之分子生物學呈現陽性結果，另有 5 株 83 年的病毒分離株及 3 株 91 年及 2 株 92 年的分離株，總共代表 39 名個案的檢體做分子流行病學分析。

由表六的基因型別列表可知，此 39 名個案有 28 名屬於 H1 基因型、5 名屬於 D3 基因型、2 名個案屬於 D5 基因型、D9 與 G2 基因型各一名個案、而另兩 2 名個案屬於 H2 基因型，因為我們缺乏 67 年疫苗施打以前的分離株或相關檢體也無民國 74 年或民國 77-78 年間的檢體可供研究，故我們無法確切認定原來的本土性麻疹病毒株為何種基因型別，但由 H1 基因型別佔多數且自 81 年起即出現，並在 83 年桃園地區的流行及 91 年台中地區的流行中所分離的病毒株皆屬於 H1 且其中並未有相關境外移入的證據，加上依 WHO 公布各基因型別全球地理區的分佈情況²⁸指出中國大陸為 H1 基因型的主要分佈地理區推斷，台灣本土性株很可能屬 H1 基因型，但另也有文獻將台灣歸於 D3 基因型分佈的地理區

^{29,30}，由我們的分析資料顯示，D3 型共 5 名個案是第二多的型別，但除民國 81 及 89 年個案無法得知疫調結果外，91 年 1 名及 92 年 2 名個案皆有明顯的境外移入史(發病前 10-20 天內不在台灣本土)，且皆由菲律賓傳入。而菲律賓在全球地理區的基因型別分佈正是 D3 型。不過依衛生統計資料顯示(表十一)民國 81-88 年間的通報個案數與檢驗室收件個案顯示推估除民國 83 年及 87 年的採檢率達 80 % 外，其他採檢率皆在 60 % 左右，此數字還可能高估，因為早期監測與防治未如目前這般完善時，有許多通報個案未採檢，而採檢個案並未通報的情形發生；再加上主要都是血清檢體，由表三的統計結果可知，血清(漿)檢體並不是做分子流行病學分析的適當檢體，且又經過近十年的保存，在保存條件不當的情形下都可能影響檢出率。通常在還有地方性麻疹流行的區域，病毒的基因型別會呈現單一型態，而在進入消除階段(Elimination Phase)的地區，只要能維持人口數九成以上具免疫力，通常可阻斷流行，且因無易感人口的累積而致感染人數較少，基因型多因境外移入造成反而呈現多樣化。當易感人口數夠多時，是有可能同時支撐兩種不同型別病毒的傳遞³¹。以民國 81 年檢出的 3 名個案基因型別分別為 2 名 H1 與 1 名 D3，而以當年的通報病例數三百多名，而血清檢體一百多件來看，不排除可能也有 D3 基因型的病毒株同時在傳遞。

而民國 82 年 2 件 PCR 檢驗陽性檢體一件來自麻疹 IgM 與 IgG 皆為陰性的血清(82-26)，另一件則為麻疹 IgM equivocal 而 IgG 陰性的血清(82-11)，且原檢驗單上還備註麻疹及 MMR 接種日期，但個案為民國 79 年生，以現今的預防接種查詢系統能查到較完整的疫苗接種記錄僅在民國 81 年以後，故也無法進一步查證，查看此二名個案發病日相距 3 個月左右，彼此間應無直接關聯，分子流行病學的特徵之一即是在發病初

期採檢而在 3 週內又有施打麻疹疫苗者，可以藉由分子生物學的方法來區分為疫苗引起或野生株引起，這是傳統血清學方法所無法做到的，比對此 2 名 H1 基因型個案的序列，發現完全相同，我們雖無法得知這 2 名個案的地理區分布，但不排除同一病毒持續在環境中傳遞但卻有個案未被通報或採檢的可能。

民國 83 年的五名 PCR 陽性檢體皆來自病毒株，有 4 例為 H1 基因型，1 例為 H2 基因型(Chi)，個案彼此間有地理位置及時間上的關聯性，其他檢驗室收集到的麻疹 IgM 陽性血清檢體 14 件 PCR 檢測結果皆為陰性，但由基因型別顯示，此次地區性流行應不是單一感染源引起。

民國 86 年 5 月下旬到六月初，檢驗室收件 4 件麻疹 IgM 陽性血清檢體，地理區在台中，僅有一名檢出 PCR 陽性，屬於 G2 基因型(86-18)，而 8 月下旬另一名陽性個案(也是下半年收件檢體血清學中唯一陽性個案)檢出 H1 基因型(86-36)，故此波小疫情應有即時控制，只是我們無法找到相關的記載，依 WHO 公布各基因型別全球地理區的分佈 G2 基因型的分佈區在印尼與馬來西亞²⁸。

民國 87 年 3 月下旬到 4 月初檢驗收件 4 名麻疹血清學陽性個案，地理區皆在嘉義，經 PCR 檢驗一件為陽性，基因型屬於 H2 型，依 WHO 公布各基因型別全球地理區的分佈 H2 基因型的分佈區在印尼與馬來西亞越南。

民國 89 年 3 月收件 2 名麻疹血清陽性個案，彼此間無地理關聯(台北-花蓮)或境外移入史，其中一例檢出 PCR 陽性，屬於 D3 基因型，同年 5 月下旬另一名個案為成人，檢出基因型別為 H1 亦查不出境外移入史。

民國 90 年 2 月初一名 PCR 陽性個案(90-6)，有境外移入史(中國大

陸)，而後於竹東鎮於3月初到3月下旬陸續收件4名麻疹血清學陽性個案，經檢驗結果2名為PCR陽性(90-9、90-10)且皆為H1基因型，感染源不明，基因序列完全一致，顯示應為共同感染源傳遞引起。另2名PCR陽性個案分別在4月(90-18)及7月(90-29)檢出，彼此無關聯且其中一例有境外移入史，但2者的基因序列顯示完全相同。但與3月初竹東檢出的H1型在N基因的序列上則有4個b.p.的差異。

民國91年3月初檢出一名D3基因型個案(91-10)，有菲律賓的境外移入史，而4月下旬檢出的D5基因型(91-23)則未查出感染源也僅限於此單一個案，另12名H1基因型個案中有8名基因序列完全相同，彼此間也有地理上(台中縣)及時間上(9月中至10月中)的關聯性但無境外移入的證據，傳統疫情調查結果也顯示個案彼此有同兄弟或同學的關係，而同在9月初採檢的2名同樣為H1基因型的個案，其中一例有境外移入史(中國大陸,91-42)，則與此8名outbreak個案的基因序列差異達14b.p.，其與H1基因型標準株的差異達2.4%，在演化樹圖上也獨立於H1與H2基因型間而自成一分支，依WHO對新基因型的區分標準¹⁵，N基因456bps.的差異與標準株至少達2.5%，H基因1854bps則需達至少達2%，因此2名個案並無病毒分離株，原本想藉由Cloning的方法將基因產物接到Vector中大量繁殖，但clone後挑選之菌落抽出的Plasmid產物經定序發現，不同菌落挑出的Clone成功的產物定序結果仍有1-2個bps的差異，剛好藉於新基因型產生的臨界點，因PCR試驗每1000bps的轉譯可能有1-2bps錯誤率，我們的實驗由原檢體開始又是經nested PCR的產物，想到補正的方法是採用可修正轉譯錯誤的Pfu聚合酶重新試驗，但受限於計劃時間與所剩檢體不知足夠與否，故未能完成。

民國 92 年共有 6 名麻疹血清學確定個案，其中 2 名檢出 D3 基因型，為菲律賓來台準備進行移植手術的連體嬰，而 1 名 D5 基因型也有境外移入史(泰國)，1 名 H1 基因型個案則有中國大陸之境外移入史，1 名 D9 基因型則是 11 月初有到日本的旅遊史，雖然日本非 D9 基因型的分佈區域，但在 2004 年 1-2 月間，Yamagata 的中學生卻有 D9 基因型麻疹爆發流行的記載³²。但其中並未描述確切境外移入可能性，僅就在日本不曾出現 D9 基因型推斷應是由境外移入造成。由演化樹圖中可發現雖然 H1 基因型出現時間很廣，幾乎有陽性個案檢出的年份皆有其蹤影，但仔細比較基因序列相似度可發現除 81-82 年(81-92、82-11、82-26) 序列完全相似外，與 83 年及 91 年的地方性流行株 N 基因 456 bps 有 0.7 %-0.9 %(3-4 bps)的差異。而由細部序列中也發現所有的 H1 基因型與原來的標準株比較第 178 位置的核苷酸序列皆由原標準株的 A 轉成 G、253 位置由 T 轉成 G，此核苷酸情形的變化代表的含意值得進一步探討，而顯著核苷酸差異較大的 91-42、91-44 二株 H1 型也值得往後進一步收集分子流行病學的資料來觀查其野生株的演化情形。

德國麻疹血清學 IgM 之偽陽性探討及分子生物學診斷方法的建立

針對實務上常遇到德國麻疹血清檢驗結果不一致的困擾及常有懷孕婦女在無症狀下，意外檢驗得到德國麻疹 IgM 抗體陽性而引起在前三個月的感染是否需擔心德國麻疹病毒造成胎兒的先天性畸型而以優生保健的觀點來進行中止懷孕，故設定此一子題針對文獻中常見的可能會因其他疾病引發的德國麻疹 IgM 偽陽性產生建立實驗的實證基礎。

我們根據原檢驗資料記載挑出以 Behring 廠牌德國麻疹 IgM(應用 indirect ELISA 原理)進行檢測結果呈現陽性與陰性的檢體，分別代表陽性與

陰性的診斷，配合以第二家不同廠牌，應用原理不同的 DSL 廠牌德國麻疹 IgM 試劑(capture-IgM ELISA)組檢測，比較市售試劑檢驗結果的一致性(表)，發現一致性達 99 % (扣除 equivocal 不計)。而文獻提及利用 IgG 親和性來區分初次感染與二次感染的方法，則同時進行比較。IgG 親和性是應用免疫學上抗體反應是隨著感染時間而與抗原的親和性逐漸增加的原理³³來進行疾病初次感染的判斷。通常在第一個月內，抗體親和性不高，約在一年後成熟³⁴。通常在實驗室收件的檢體皆在發病後一個月內採檢，故可藉此輔助診斷。由表八檢驗結果可知在兩廠牌德國麻疹 IgM 皆呈陽性的檢體中，以 IgG 親合性試驗檢測，則只有 96.7 % - 97 %，由於實驗搭配兩廠牌試劑及兩種親和性試劑(8 M urea 及 35mM DEA)測試，我們挑出不同組和下親和性試驗結果一致但與 IgM 檢測結果不符的檢體進行分析(表十二)。其中懷孕者 4 名(Ru-94-13A、Ru-93-29A、Ru-91-67A、Ru-90-56A)，有 3 名無症狀，2 名有接種德國麻疹疫苗，個案 Ru-94-13A 有三次採檢，與第一次採血間隔 62 天及 137 天，德國麻疹 IgM 皆呈現陽性 IgG 抗體無顯著變化，同時 parvo B19 的 IgM 抗體亦為陽性但 IgG 抗體三次皆為陰性，顯然是 IgM 抗體的非特異性反應。個案 Ru-93-29A 有五次採檢記錄，採血間隔分別為 4、11、43、70、174 天，血清中的德國麻疹抗體一直呈現陽性反應，且最終生出的嬰兒檢驗並無 CRS，個案 Ru-91-67A 除德國麻疹 IgM 抗體陽性外，麻疹、CMV、RF IgM 檢測亦呈現陽性，應為不明原因的免疫系統產生的非特異性反應。個案 Ru-90-56A 則有症狀但在 3 個半月前曾接種德國麻疹疫苗，疫苗引起副作用的時間一般沒有這麼長，在疫苗接種後 3 個多月抗體仍呈現低親和性也是可能³⁴，而其他可能引起德國麻疹 IgM 偽陽性因素，如

EBV、CMV、B19、RF 等因子檢測皆為陰性，故此案例最終難以由檢驗數據做最後判定。個案 Ru-90-42B 有典型症狀且為確定個案(因為兩次採檢除 IgM 陽性反應外，IgG 亦現陰轉陽現象)唯採樣時間已超過 3 個月，此時 IgG 的親和性已增強。另二例無症狀個案 Ru-91-1A 因列為 CRS 個案接觸者採檢、Me-91-63C2 則是實驗中無意發現，其他可能造成偽陽性的其他感染檢測亦無結果，而個案 Ru-93-16A 有發燒但未出疹且有疫苗接種，除德國麻疹 IgM 外也無其他可能感染的陽性結果，而個案 Ru-93-28A 有臨床症狀及 6 個月前的 MMR 接種史，其他可能造成偽陽性的其他感染檢測亦無結果，但個案為 2 歲以下幼兒，其他可能引起發燒、出疹症狀的腺病毒或腸病毒應有進一步探討的空間。

在兩廠牌德國麻疹 IgM 檢測的 362 名陽性個案中，同時出現 parvo B19 IgM 陽性反應者有 2 名，CMV IgM 陽性者 1 名，EBV VCA IgM 陽性與 EBNA IgG 陰性的疑似 EBV 感染則未發現，在我們的實驗中證實的發生機率在 1% 以下，或許下次應收集 CMV 與 EBV 感染患者的血清反向檢測德國麻疹 IgM 抗體，應可得到更好的分析結果。而 RF IgM 對德國麻疹 IgM 檢測是否有造成偽陽性的困擾，除 Ru-91-67A 個案因為檢測值超高(>600 U/ml，>15.3 U/ml 判為陽性)可能造成干擾外，另有名個案檢驗值較高 99.17 U/ml，為確定個案(符合 IgM 陽性、IgG 陽轉、低親和性 IgG 等條件)，其他德國麻疹 IgM 陽性個案、低親和性 IgG 診斷標準下個案發現 RF IgM 亦為陽性者檢驗值皆在 35 U/ml 以下，未造成偽陽性的疑慮。

結論與建議

台灣地區小兒麻痺根除的結果得來不易，但在全球小兒麻疹正式絕跡一如天花的根除境界之前，持續的監測工作不可怠忽，提供經費維持必要人力從事急性無力肢體麻痺通報與實驗監測的工作不可輕忽，一但懈怠引起疾病反撲，結果將得不償失。

麻疹在台灣地區的防治已達消除階段，分子流行病學的監測已成全球共同的趨勢，藉由基因型別的分析追蹤病毒在全球分佈與傳遞情形，除目前公佈的已知型別外，亦不斷有新型別的發現³⁵，除本研究目前已分析的 2003 年以前的檢體外，往後的檢體應持續性的探討，有關全球的麻疹根除工作，除必要的疫苗施打政策外，病毒基因的演化監測被視為重要的一環，以開發國家自許的我們自然不應缺席。

德國麻疹根除因為 MMR 的全面施打是有可能的，其監測可併同麻疹一起，因在疾病發生率下降後，新一代的醫生可能已無法如疾病盛行年代的醫生那般有經驗可由臨床診斷，而德國麻疹血清學診斷的偽陽性問題一直被探討，但在疾病控制進程上，應將疑似個案儘量掌握，同時也著手進行病毒培養及分子生物學診斷以為疾病走入消除階段做準備。

參考文獻

1. Global Disease Elimination and Eradication as Public Health Strategies. *Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48 (Supl) :1-216
2. Robbins FC, de Quadros CA. Certification of the eradication of indigenous transmission of wild poliovirus in the Americas. *Journal of infectious diseases*, 1997, 175 (Suppl. 1): S281–S285.
3. Circulation of a type 2 vaccine-derived poliovirus-Egypt, 1982-1993. *Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50(03) : 41-42,51
4. Public health dispatch: Outbreak of poliomyelitis-Dominican Republic and Haiti, 2000. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49(48):1094,1103
5. Public health dispatch: poliomyelitis---Madagascar. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51: 622.
6. Public health dispatch: Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus-Philippines, 2001. *Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50(40): 874-5.
7. Piyanit Tharmaphornpilas. Vaccine derived poliovirus -Thailand, 2003. *Emerging Infectious Disease* 2005;11(5):777-8
8. 孫蕙芝,楊志元,曾燦璋等.台灣首例疫苗衍生小兒麻痺病毒引起麻痺個案. *疫情報導* 2003;19(11):571-586.
9. Update: Global measles control and mortality reduction-worldwide, 1991-2001. *Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52(20):471-475.
10. Lee, M.S., King, C.C., Chen, C.J., Yang S.Y., Ho, M.S. Epidemiology of measles in Taiwan: dynamics of transmission and timeliness of reporting during an epidemic in 1988-9. *Epidemiology of Infection* 1995;114: 345-359.
11. Lee, M.S., Lee, L.L., Chen, H.Y, Wu, Y.C., Horng C.H. Post

mass-immunization measles outbreak in Taoyuan county, Taiwan:
Dynamics of transmission, vaccine effectiveness, and herd immunity.
International Journal of Infectious Diseases 1999;3:64-69.

12. 鄭雯月,王聖帆,楊志元等.2002年麻疹病毒株基因型分析.疫情報導
2003;19(10):521-539.
13. Mortality reduction and regional elimination: strategic plan 2001–2005;
global measles. Geneva: World Health Organization, **2001**:1–31.
14. World Health Organization. Standardization of the nomenclature for
describing the genetic characteristics of wild-type measles virus. *Wkly
Epidemiol Rec* **1998**; 73:265–72.
15. World Health Organization. Nomenclature for describing the genetic
characteristics of wild-type measles viruses (update). Part I. *Wkly
Epidemiol Rec* **2001**; 76:242–7.
16. Tipples, G.A., Gray, M., Garbutt, M., Rota, P.A., 2004. Genotyping of
measles virus in Canada: 1979-2002. *The Journal of Infectious Diseases*
2004;189 (Suppl 1) , S171-6.
17. Rota JS, Heath JL, Rota PA, et al. Molecular epidemiology of measles
virus: identification of pathways of transmission and the implications for
measles elimination. *J Infect Dis* **1996**; 173:32–7.
18. Chibo D, Birch CJ, Rota PA, Catton MG. Molecular characterization of
measles viruses isolated in Victoria, Australia, between 1973 and 1998. *J
Gen Virol* **2000**; 81:2511–8
19. Guideline for surveillance of congenital rubella syndrome and rubella.
Geneva: World Health Organization, **1999**:1–3144.
20. Kurtz JB, Anderson MJ: Cross-reactions in rubella and parvovirus
specific IgM tests. *Lancet* 1985 ; 2 : 1356

21. Suzanne M. Donovan: False-positive results of an enzyme immunoassay for rubella IgM in a case of measles. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24:271-272
22. Morgan-Capner P, Tedder RS, Mace JE: Rubella-specific IgM reactivity in sera from cases of infectious mononucleosis. *Journal of Hygiene (Cambridge)* 1983;90:407-413
23. Thomas HJT, Emma Barrett, Hesketh LM et al: Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *Journal of Clinical Virology* 1999; 14:107-118
24. Thomas HJT, Morgan-Capner P, Roberts A et al: Persistent rubella-specific IgM reactivity in the absence of recent primary rubella and rubella reinfection. *Journal of Medical Virology* 1992; 36:188-192
25. Thomas HJT and Morgan-Capner P: Rubella-specific IgG1 avidity: a comparison of methods. *Journal of Virological Methods* 1991; 31:219-228
Thomas HJT and Morgan-Capner P: Rubella-specific IgG1 avidity: a comparison of methods. *Journal of Virological Methods* 1991; 31:219-228
26. Hedman K and Rousseau SA: Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *Journal of Medical Virology* 1989; 27:288-292
27. Böttiger B, Jensen IP: Maturation of rubella IgG avidity over time after acute rubella infection. *Clinical and Diagnostic Virology* 1997;8: 105-111
28. World Health Organization. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). Part II. *Wkly Epidemiol Rec* **2001**; 76:249–51.
29. Rota PA and Bellini WJ. Update on the global distribution of genotypes of

- wild type measles viruses. *J Infect Dis* **2003**; 187(Suppl 1):S270-S276.
30. Trout AT, Mulders MN, Gautam DC et al: Genetic analysis of Asian measles virus strains-new endemic new genotype in Nepal. *Virus Research* 2001; 76:71-78.
31. Hanses F, Truong AT, Ammerlaan W et al : Molecular epidemiology of Nigerian and Ghanaian measles virus isolates reveals a genotype circulating widely in western and central Africa. *J Gen Virol* 1999; 80:871-877.
32. Mizuta K, Abiko C, Murata T et al. An outbreak of measles virus infection due to a genotype D9 at a junior high school in Yamagata, Japan in 2004. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58:98-100
33. Nossal GJV: The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell* 1992; 68:1-2.
34. Hedman K, Hietala J, Tiilikainen A et al: Maturature og immunoglobulin G avidity after rubella vaccination studied by enzyme linked immunosorbent assay (Avidity-ELISA) and by haemolysis typing. *J Med Virol* 1989; 27:293-298
35. Muwonge A, Nanyunja M, Rota PA et al: New measles genotype, Uganda. *Emerg Infec Dis* 2005; 11:1522-1526

表一、其可能引起發燒、出疹的病原體列表(摘自 WHO 文件)

Table 2: Features of some of the diseases causing febrile illness with generalized rash
(Benenson 1995, Frieden & Resnick 1991, Remington & Klein 1995)

Disease	Rubella	Measles	Dengue fever	Erythema infectiosum ¹	Roseola infantum ²
Causative agent	rubella virus	measles virus	dengue virus	parvovirus B19	human herpes virus 6
Incubation period (days)	14-23	7-18	2-12	4-20	10
Fever	yes	yes	yes	yes	yes
Rash	yes	yes	yes	yes	yes
Conjunctivitis	yes	yes	yes	yes	no
Coryza	yes	yes	yes	yes	no
Joint symptoms	yes (especially adult women)	no	yes	yes (especially adults)	no
Postauricular adenopathy	yes	no	no	no	yes
Diagnostic test	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM
Result of infection during pregnancy stillbirth birth defects	yes yes	yes no	yes ³ no	yes no	no no
Vaccine-preventable	yes	yes	no	no	no

¹ Also known as fifth disease.

² Also known as sixth disease, or exanthem subitum.

³ Three fetal deaths reported following onset of dengue fever in mothers between weeks 17 and 24 of pregnancy (Carles et al. 1999).

表二、德國麻疹疾病控制各階段的工作建議方針

Table 4: Recommended surveillance activities, by stage of rubella immunization programme

	Stage of rubella immunization programme		
	Stage 1	Stage 2	Stage 3
Surveillance activities	Not using rubella vaccine but want to assess CRS disease burden	CRS prevention rubella vaccine used in national immunization programme	Rubella elimination
CRS surveillance	<ul style="list-style-type: none"> • Conduct case-based CRS surveillance in infants 0-11 months. • Report total number of CRS cases per year. • Report number of CRS cases per 1000 live births per year. 		
Rubella surveillance		<ul style="list-style-type: none"> • Report number of suspected rubella cases each month, by district. 	<ul style="list-style-type: none"> • Conduct case-based surveillance for febrile rash illness; investigate every case including laboratory tests.
Outbreak investigation	<ul style="list-style-type: none"> • During outbreak, investigate 5 to 10 rash illness cases per month (with laboratory tests) to confirm rubella as cause of outbreak. • During outbreak, investigate all rash illnesses in pregnancy. • During outbreak (and nine months after) conduct active surveillance to detect suspected CRS cases in infants 0-11 months. 		
Serosurveillance		<ul style="list-style-type: none"> • If resources permit, establish serosurveillance at selected antenatal clinics to monitor susceptibility in women of childbearing age. 	
Rubella vaccine coverage		<ul style="list-style-type: none"> • Monitor rubella vaccine coverage in target groups. • Conduct coverage surveys, if needed. • Conduct missed opportunity surveys. 	

表三、檢體種類與檢驗結果統計表

檢體種類	麻疹血清學結果	件數	PCR 陽性件數
血清(漿)	IgM +/±	102	21
	IgM-,IgG-	69	7
周邊血液單核球	N	9	5
尿液	N	12	9
咽喉拭子	N	10	5
總計		202	47

表四、1992-2003 PCR 陽性個案數分佈情形

	1992	1993	1994	1997	1998	2000	2001	2002	2003
原檢體 PCR 陽性個案	3	2	0	2	1	2	5	14	4
病毒株個案	0	0	5	0	0	0	0	3 [※]	2 [¥]
總個案數	3	2	5	2	1	2	5	14	5

註：※ 此 3 個病毒株分離個案與原檢體 PCR 陽性個案重疊

¥ 此 2 名病毒株分離個案有 1 名與原檢體 PCR 陽性個案重疊,另 1 名為新個案

表五、麻疹病毒株基因型別參考株資訊

Genotype	Status[a]	Reference strain(MVi)[b]	H gene Accession	N gene Accession
A	Active	Edmonston-wt.USA/54	U03669	U01987
B1	Active	Younde.CAE/12.83"Y-14"	AF079552	U01998
B2	Active	Libreville.GAB/84"R-96"	AF079551	U01994
B3	Active	New York.USA/94 Ibadan.Nie/97/1	L46752 AJ239133	L46753 AJ232203
C1	Active	Tokyo.JPN/84/K	AY047365	AY043459
C2	Active	Maryland.USA/77"JM" Erlangen.DEU/90"WTF"	M81898 Z80808	M89921 X84872
D1	Inactive	Bristol.UNK/74(MVP)	Z80805	D01005
D2	Active	Johannesburg.SOA/88/1	AF085198	U64582
D3	Active	Illinois.USA/89/1"Chicago-1"	M81895	U01977
D4	Active	Montreal.CAN/89	AF079554	U01976
D5	Active	Palau.BLA/93 Bangkok.THA/93/1	L46757 AF009575	L46758 AF079555
D6	Active	New Jersey.USA/94/1	L46749	L46750
D7	Active	Victoria.AUS/16.85 Illinois.USA/50.99	AF247202 AY043461	AF243450 AY037020
D8	Active	Manchester.UNK/30.94	U29285	AF280803
E	Inactive	Goettingen.DEU/71"Braxator"	Z80797	X84879
F	Inactive	MVs/Madrid.SPA/94 SSPE	Z80830	X84865
G1	Inactive	Berkeley.USA/83	AF079553	U01974
G2	Active	Amsterdam.NET/49.97	AF171231	AF171232
G3	Active	Gresik.INO/17.02	AY184218	AY184217
H1	Active	Hunan.CHN/93.7	AF045201	AF045212
H2	Active	Beijing.CHN/94/1	AF045203	AF045217

[a] : Active 表示為近15年來之分離株

[b] : WHO命名，其他文獻中所引用名稱以括弧表示

表六、麻疹PCR陽性個案基因型別列表

實驗編號	標準命名	個案年齡 (歲/月)	基因型別
81-92	MVs/Taiwan/18.92	4/2	H1
81-124	MVs/Taiwan/19.92	0/10	D3
81-137	MVs/Taiwan/22.92	1/9	H1
82-11	MVs/Taipei.TWN/11.93	2/10	H1
82-26	MVs/Keelung.TWN/23.93	1/9	H1
Tsen	Mvi/Taoyuan.TWN/21.94	3/10	H1
Chen	Mvi/Taoyuan.TWN/22.94	5/10	H1
In	Mvi/Taoyuan.TWN/24.94/1	2/10	H1
Chi	Mvi/Taoyuan.TWN/24.94/2	3/8	H2
Gu	Mvi/Taoyuan.TWN/24.94/3	3/10	H1
86-18	MVs/Taichung.TWN/21/97	0/5	G2
86-36	MVs/Taipei.TWN/36.97	1/2	H1
87-5	MVs/Chia Yi.TWN/13.98	1/7	H2
89-7	MVs/Taipei.TWN/11.00	0/10	D3
89-20	MVs/Taitung.tWN/21.00	27/7	H1
90-6	MVs/Taipei.TWN/7.01	28/9	H1
90-9	MVs/Hsinchu.TWN/11.01/1	0/9	H1
90-10	MVs/Hsinchu.TWN/11.01/2	0/8	H1
90-18	MVs/Taipei.TWN/16.01	22/0	H1
90-29	Mvs/Taoyuan.TWN/29.01	0/10	H1
91-10	Mvs/Taichung.TWN/10.02	1/0	D3
91-23	MVs/Kaohsiung.TWN/16.02	29/4	D5
91-31	MVs/Taipei.TWN/27.02	0/10	H1
91-39	Mvs/Miaoli.TWN/34.02	27/4	H1
91-42	MVs/Taichung.TWN/36.02/1	0/7	H1
91-44	MVs/Taipei.TWN/36.02/2	26/1	H1
91-47	MVs/Taipei.TWN/38.02	14/10	H1
91-50	MVs/Taichung.TWN/40.02/1	9/11	H1
91-50D35	MVi/Taichung.TWN/40.02/2	13/2	H1
91-50D37	MVi/Taichung.TWN/40.02/3	9/11	H1
91-51	MVs/Hsinchu.TWN/39.02	0/1	H1
91-53	MVi/Taichung.TWN/40.02/4	13/3	H1
91-54	MVs/Taichung.TWN/40.02/5	29/0	H1
91-56	MVs/Taichung.TWN/41.02	13/11	H1
92-22	MVs/Hwalian.TWN/18.03/1	0/10	D3
92-23	MVi/Hwalian.TWN/18.03/2	0/10	D3
92-27	MVi/Taoyuan.TWN/20/03	0/11	H1
92-53	MVs/taichung.TWN/45.03	28/10	D5
92-56	MVs/Yilan.TWN/48.03	25/1	D9

表七、Behring 及 DSL 廠牌德國麻疹 IgM 檢測結果比較

		Behring Rubella IgM		
		+	-	±
DSL Rubella IgM	+	362	0	2
	-	4	129	2
	±	0	0	2

表八：德國麻疹 IgM 陽性檢體之 IgG 親和性試驗結果比較

				Behring Rubella IgM positive			
				366			
DSL Rubella IgM positive				DSL Rubella IgM negative			
362				4			
Behring IgG avidity low 8M urea	Behring IgG avidity low 35mM DEA	DSL IgG avidity low 8M urea	DSL IgG avidity low 35mM DEA	Behring IgG avidity low 8M urea	Behring IgG avidity low 35mM DEA	DSL IgG avidity low 8M urea	DSL IgG avidity low 35mM DEA
350	350	351	351	0	0	0	0

表九：德國麻疹 IgM 陰性檢體之 IgG 親和性試驗結果比較

				Behring Rubella IgM negative			
				129			
				DSL Rubella IgM negative			
				129			
Behring IgG avidity low 8M urea		Behring IgG avidity low 35mM DEA		DSL IgG avidity low 8M urea		DSL IgG avidity low 35mM DEA	
3		3		20		15	

表十：德國麻疹 IgM equivocal 檢體之 IgG 親和性試驗結果比較

				Behring Rubella IgM equivocal			
				6			
		DSL Rubella IgM positive		DSL Rubella IgM equivocal		DSL Rubella IgM negative	
		2		2		2	
Behring IgG avidity low 8M urea		Behring IgG avidity low 35mM DEA		DSL IgG avidity low 8M urea		DSL IgG avidity low 35mM DEA	
1		1		2		2	

表十一、1985-2003 麻疹個案通報數

西元年	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991
通報數	2219	14	5	1386	1060	44	34
西元年	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
通報數	303	71	98	42	47	63	49
西元年	1999	2000	2001	2002	2003		
通報數	23	48	50	79	59		

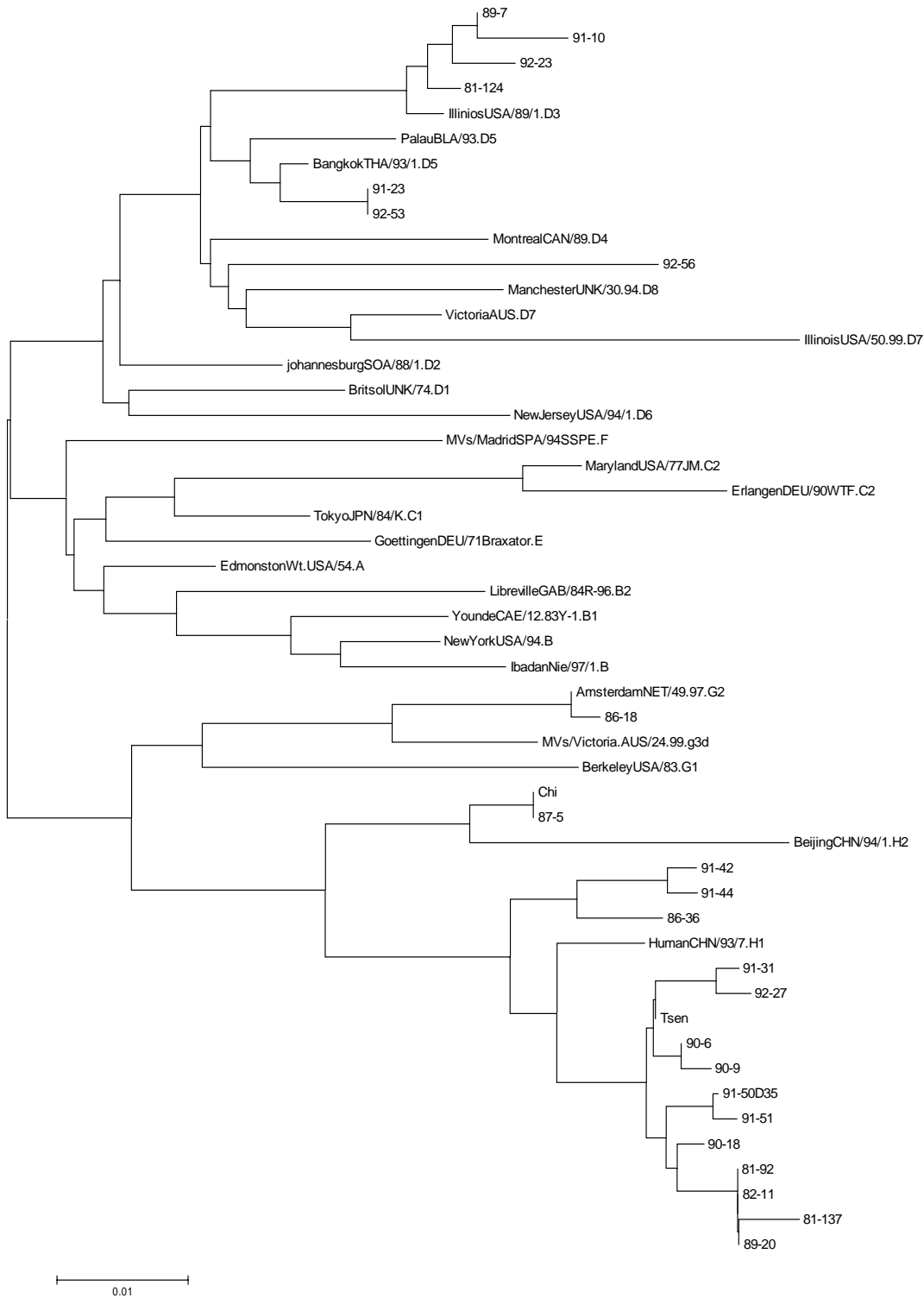
表十二、德國麻疹 IgM 陽性但非低親和性檢體列表

檢體編號	Behring		DSL		臨床資料			
	8M urea	35 mM DEA	8M urea	35 mM DEA	發燒	出疹	疫苗	懷孕
Ru-94-13A	84.676	84.837	46.204	52.928	No	No	Unknown	Yes
Ru-93-16A	52.519	50.886	30.576	44.862	Yes	No	Yes(RV)	No
Ru-93-28A	47.474	49.96	68.49	41.565	Yes	Yes	Yes(MMR)	No
Ru-93-29A	54.96	64.271	61.92	36.794	No	No	Yes(RV)	Yes
Me-93-11A	50.947	50.886	48.633	51.962	Yes	Yes	Yes(MMR)	No
Ru-91-1A	51.388	58.371	69.54	42.16	No	No	Unknown	No
Ru-91-67A	98.226	97.404	121.7	89.21	No	No	Unknown	Yes
Me-91-63C2	60.026	54.406	46.911	53.486	No	No	Unknown	No
Ru-82-101A	44.681	32.965	51.05	18.291	No record	No record	No record	No record
Ru-90-42B	49.32	31.69	55.11	22.08	Yes	Yes	No	No
Ru-84-2A	38.8	43.516	16.563	30.856	No record	No record	No record	No record
Ru-90-56A	25.361	24.8	38.75	14.85	Yes	Yes	Yes(RV)	Yes
Ru-274	34.314	22.722	25.999	15.812	No record	No record	No record	No record
Ru-80-35A	3.0389	29.326	26.172	54.525	No record	No record	No record	No record

圖一、麻疹 N 基因 456 bps 相似度分析

		Percent Identity																														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
Divergence	1	█	99.6	100.0	100.0	99.3	99.3	99.3	99.3	97.1	100.0	99.1	98.9	98.9	99.3	99.3	98.7	99.1	96.5	96.5	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	98.7	98.0	1	81-92.seq
	2	0.4	█	99.6	99.6	98.9	98.9	98.9	98.9	96.7	99.6	98.7	98.5	98.5	98.9	98.9	98.2	98.7	96.1	96.1	98.7	98.7	98.7	98.7	98.5	98.7	98.7	98.7	98.2	97.6	2	81-137.seq
	3	0.0	0.4	█	100.0	99.3	99.3	99.3	99.3	97.1	100.0	99.1	98.9	98.9	99.3	99.3	98.7	99.1	96.5	96.5	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	98.7	98.0	3	82-11.seq
	4	0.0	0.4	0.0	█	99.3	99.3	99.3	99.3	97.1	100.0	99.1	98.9	98.9	99.3	99.3	98.7	99.1	96.5	96.5	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	98.7	98.0	4	82-26.seq
	5	0.7	1.1	0.7	0.7	█	100.0	100.0	100.0	97.8	99.3	99.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.3	99.3	97.1	97.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	98.7	5	Gu.seq
	6	0.7	1.1	0.7	0.7	0.0	█	100.0	100.0	97.8	99.3	99.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.3	99.3	97.1	97.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	98.7	6	In.seq
	7	0.7	1.1	0.7	0.7	0.0	0.0	█	100.0	97.8	99.3	99.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.3	99.3	97.1	97.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	98.7	7	Chen.seq
	8	0.7	1.1	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	█	97.8	99.3	99.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.3	99.3	97.1	97.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	98.7	8	Tsen.seq
	9	2.9	3.4	2.9	2.9	2.2	2.2	2.2	2.2	█	97.1	97.6	97.4	97.4	97.8	97.8	97.6	97.1	98.5	98.5	97.1	97.1	97.1	97.1	96.9	97.1	97.1	97.1	97.1	98.2	9	86-36.seq
	10	0.0	0.4	0.0	0.0	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	█	99.1	98.9	98.9	99.3	99.3	98.7	99.1	96.5	96.5	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	98.7	98.0	10	89-20.SEQ
	11	0.9	1.3	0.9	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	2.5	0.9	█	99.8	99.8	99.3	99.3	99.1	99.1	96.9	96.9	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	99.1	98.5	11	90-6.SEQ
	12	1.1	1.6	1.1	1.1	0.4	0.4	0.4	0.4	2.7	1.1	0.2	█	100.0	99.1	99.1	98.9	98.9	96.7	96.7	98.9	98.9	98.9	98.9	98.7	98.9	98.9	98.9	98.9	98.2	12	90-9.SEQ
	13	1.1	1.6	1.1	1.1	0.4	0.4	0.4	0.4	2.7	1.1	0.2	0.0	█	99.1	99.1	98.9	98.9	96.7	96.7	98.9	98.9	98.9	98.9	98.7	98.9	98.9	98.9	98.9	98.2	13	90-10.SEQ
	14	0.7	1.1	0.7	0.7	0.4	0.4	0.4	0.4	2.2	0.7	0.7	0.9	0.9	█	100.0	99.3	99.3	97.1	97.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	98.9	98.2	14	90-18.SEQ
	15	0.7	1.1	0.7	0.7	0.4	0.4	0.4	0.4	2.2	0.7	0.7	0.9	0.9	0.0	█	99.3	99.3	97.1	97.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	98.9	98.2	15	90-29.SEQ
	16	1.3	1.8	1.3	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	2.5	1.3	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	█	98.7	96.9	96.9	98.7	98.7	98.7	98.7	98.5	98.7	98.7	98.7	99.6	98.0	16	91-31.seq
	17	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	█	96.5	96.5	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	98.7	98.0	17	91-39.SEQ
	18	3.6	4.1	3.6	3.6	2.9	2.9	2.9	2.9	1.6	3.6	3.2	3.4	3.4	2.9	2.9	3.2	3.6	█	99.6	96.5	96.5	96.5	96.5	96.3	96.5	96.5	96.5	96.5	97.6	18	91-42.SEQ
	19	3.6	4.1	3.6	3.6	2.9	2.9	2.9	2.9	1.6	3.6	3.2	3.4	3.4	2.9	2.9	3.2	3.6	0.4	█	96.5	96.5	96.5	96.5	96.3	96.5	96.5	96.5	96.5	97.6	19	91-44.seq
	20	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	0.0	3.6	3.6	█	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	98.7	98.0	20	91-47.SEQ
	21	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	0.0	3.6	3.6	0.0	█	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	98.7	98.0	21	91-50.SEQ
	22	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	0.0	3.6	3.6	0.0	0.0	█	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	98.7	98.0	22	91-50D35.SEQ
	23	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	0.0	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	█	99.8	100.0	100.0	100.0	98.7	98.0	23	91-50D37.SEQ
	24	1.1	1.6	1.1	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9	3.1	1.1	1.1	1.3	1.3	0.9	0.9	1.6	0.2	3.8	3.8	0.2	0.2	0.2	0.2	█	99.8	99.8	99.8	98.5	97.8	24	91-51.SEQ
	25	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	0.0	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	█	100.0	100.0	98.7	98.0	25	91-53.SEQ
	26	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	0.0	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	█	100.0	98.7	98.0	26	91-54.SEQ
	27	0.9	1.3	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	0.9	0.9	1.1	1.1	0.7	0.7	1.3	0.0	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	█	98.7	98.0	27	91-56.SEQ
	28	1.3	1.8	1.3	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	2.9	1.3	0.9	1.1	1.1	1.1	1.1	0.4	1.3	3.6	3.6	1.3	1.3	1.3	1.3	1.6	1.3	1.3	1.3	█	98.0	28	92-27.SEQ
	29	2.0	2.5	2.0	2.0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.8	2.0	1.6	1.8	1.8	1.8	1.8	2.0	2.0	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.2	2.0	2.0	2.0	2.0	█	29	H1 AF045212.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29			

圖二、麻疹陽性個案 N 基因序列之演化樹圖



備註：1.82-11 與 82-26 序列完全相同,僅以 82-11 代表繪演化樹圖

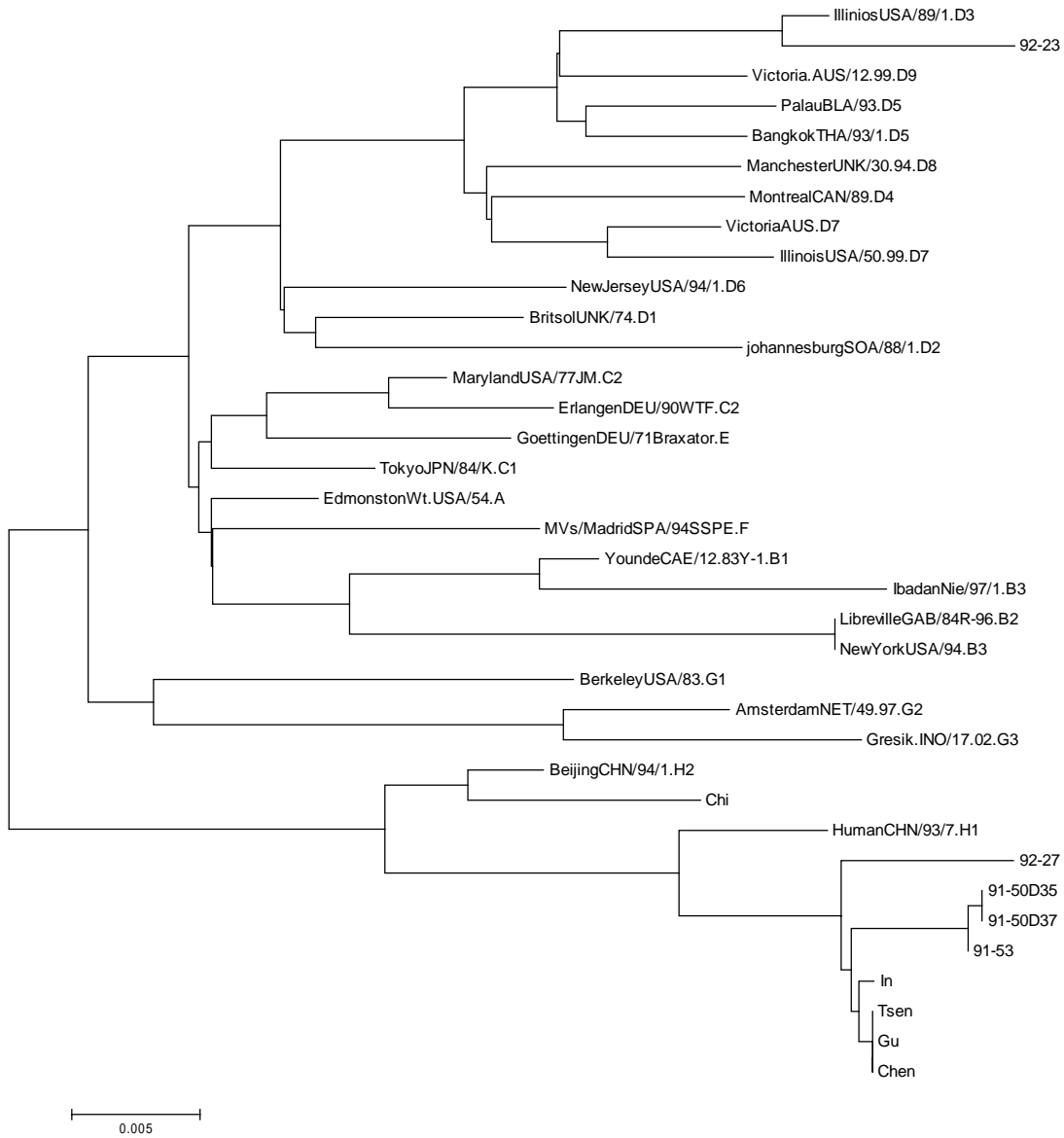
2.Tsen、Chen、In、Gu 序列完全相同,僅以 Tsen 代表繪演化樹圖

3.90-9 與 90-10 序列完全相同,僅以 90-9 代表繪演化樹圖;90-18 與 90-29 序列完全相同,僅以 90-18 代表繪演化樹圖

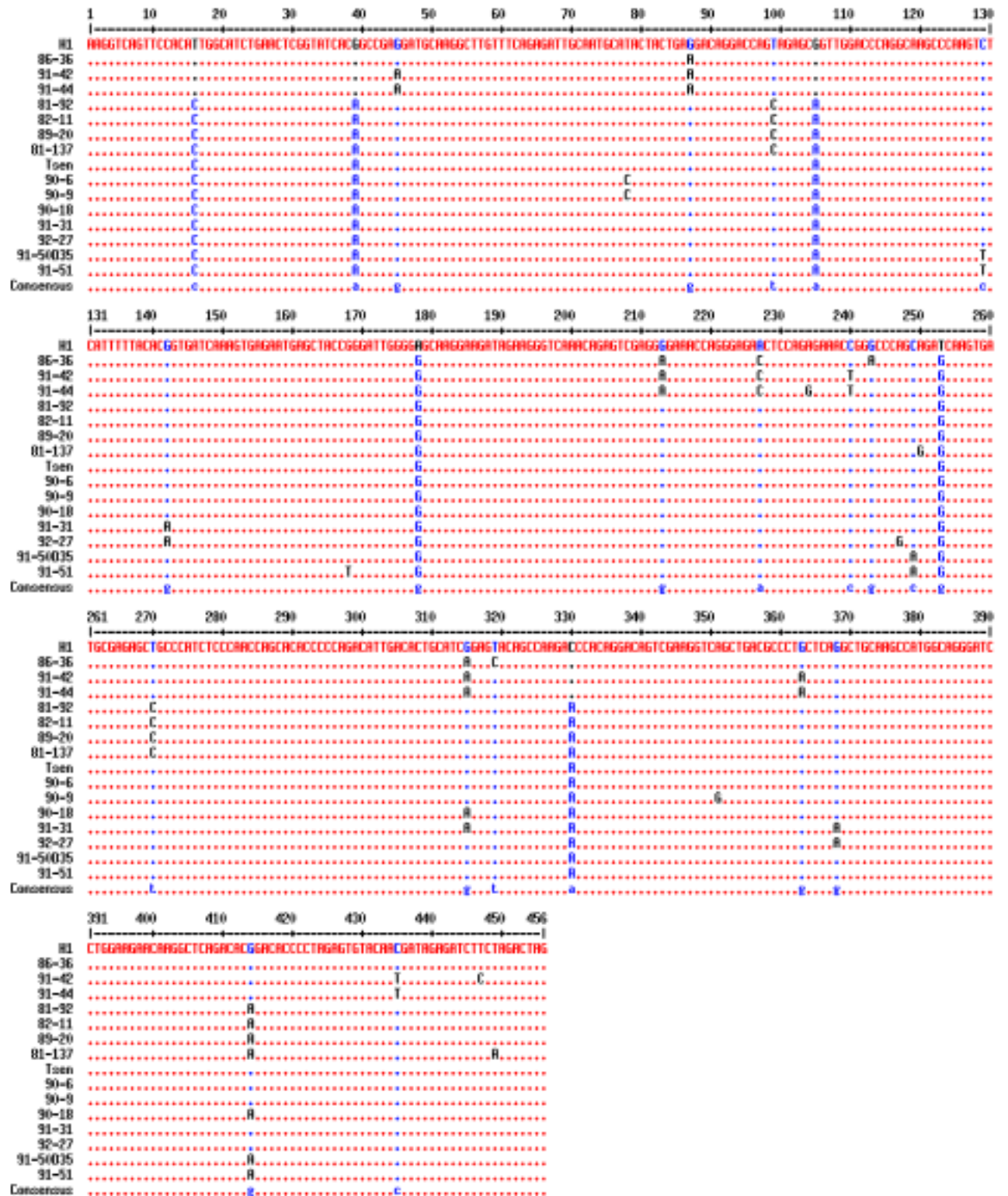
4.91-39、91-47、91-50、91-50D35、91-50D37、91-53、91-54、91-56 序列完全相同,僅以 91-50D35 代表繪演化樹圖

5.92-22 與 92-23 序列完全相同,僅以 92-23 代表繪演化樹圖

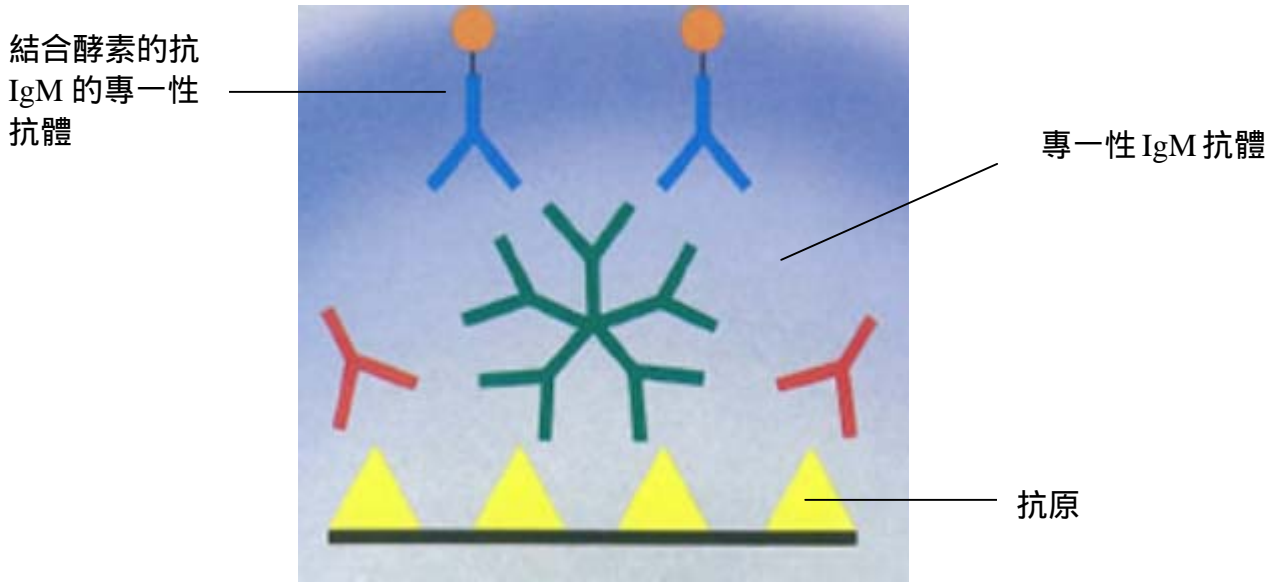
圖二、麻疹分離株 H 基因之演化樹圖



圖四、麻疹 N 基因 456 bps 序列比對圖



圖五、Indirect IgM ELISA 原理圖示



圖六、Capture IgM ELISA 原理圖示

