

102年度研究計畫 IOSH102-H315

致病菌空氣採樣方法效能評估-金黃色葡萄球菌 IOSH102-H315



勞安所研究報告

致病菌空氣採樣方法效能評估- 金黃色葡萄球菌

Assessment of Sampling Techniques for Airborne pathogenic organisms- Staphylococcus aureus



勞動部勞動及職業安全衛生研究所
INSTITUTE OF LABOR, OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH, MINISTRY OF LABOR

ISBN 978-986-04-0755-6



GPN:1010300895
定價：新台幣200元

勞動部勞動及職業安全衛生研究所

勞動部勞動及職業安全衛生研究所
INSTITUTE OF LABOR, OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH, MINISTRY OF LABOR

致病菌空氣採樣方法效能評估-金黃色
葡萄球菌

**Assessment of Sampling Techniques for
Airborne pathogenic organisms-
*Staphylococcus aureus***

致病菌空氣採樣方法效能評估-金黃色
葡萄球菌

**Assessment of Sampling Techniques for
Airborne pathogenic organisms-
*Staphylococcus aureus***

研究主持人：洪柏宸、張靜文

計畫主辦單位：行政院勞動部勞動及職業安全衛生研究所

研究期間：中華民國 102 年 4 月 15 日至 102 年 12 月 31 日

勞動部勞動及職業安全衛生研究所
中華民國 103 年 3 月

摘要

研究指出金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)可透過直接接觸或空氣傳播造成人員感染，為醫院院內感染常見且重要之病原菌；此外，在畜養家禽場所、紡織、麵粉與食品相關工作環境中亦發現 *Staphylococcus spp.*為空氣中主要菌種之一。而長期以來大量使用抗生素，也使抗藥性金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)問題日益嚴重，導致在治療此細菌感染時變得更為棘手。

有效監測此致病菌在職業場所空氣中是否存在及其濃度值，將有助於釐清勞工暴露風險；然何種採樣策略最能有效捕集空氣中的 *S. aureus*，目前仍不清楚。有鑑於此，本研究透過於實驗室建置生物氣膠產生系統，評估以培養基為介質之採樣器(Andersen 1-STG)、以收集液為介質之採樣器(BioSampler 與 AGI-30)以及以濾紙為介質之採樣器(IOM 與 Cassette)於搭配不同介質與採樣時間下對於採樣空氣中 *S. aureus* 之效能。

結果顯示 Andersen 1-STG 搭配非選擇性 TSA 之採樣效能顯著優於其他四類選擇性 MSA、BPA、CSA 與 CSM 培養基($p < 0.05$)；而四類選擇性培養基之採樣效能彼此間雖無統計上顯著差異，然以 MSA 採樣效能較佳。採樣時間方面，Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA 採樣 3 分鐘時之採樣效能顯著優於採樣 6-60 分鐘之結果，而採樣 6、15、30 與 60 分鐘之採樣效能彼此間則未達統計上顯著差異。對以收集液為介質之採樣器而言，收集液 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著優於 PBS 與 DW 之結果($p < 0.05$)，而 PBS 之採樣效能亦顯著高於 DW ($p < 0.05$)；採樣器部分則以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 具最佳採樣效能，其 R 值顯著高於 BioSampler 搭配 PBS 以及 AGI-30 之結果($p < 0.05$)，且於採樣時間大於 15 分鐘時，其 R 值隨採樣時間增加而顯著下降($p < 0.05$)。以濾紙為介質之採樣器而言，以 Tween 80 mixture 作為 IOM 與 Cassette 之濾材潤洗液並分別將樣本加熱 15 分鐘(Gelatin filter)與震盪 2 分鐘(PC filter)之樣本處理方法具最佳的 *S. aureus* 回收率($p < 0.05$)；此外，IOM 之採樣效能顯著高於 Cassette ($p = 0.0049$)，且其採樣效能隨採樣時間延長(30 至 270 分鐘)而顯著下降($p < 0.05$)。

進一步比較本研究之五種採樣器於相同採樣時間下(30 與 60 分鐘)之採樣效能，

結果顯示，兩種採樣時間下皆以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 採樣，並以 TSA 進行培養法分析時具最佳採樣效能，而以 AGI-30 搭配 PBS、IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 採樣時，則無論搭配何種培養基進行樣本分析，三者之採樣效能皆最低($p < 0.05$)且彼此間未達統計上顯著差異。

綜合上述結果並考量適當長度之採樣時間可提供具代表性的樣本，本研究認為以 BioSampler 結合 Tween 80 mixture 進行 30 分鐘採樣較為適當，唯需注意於採樣後將收集液置於 4°C 下運送回實驗室，並盡快進行樣本處理。

關鍵詞：生物氣膠、金黃色葡萄球菌、採樣效能、生物氣膠採樣器

Abstract

Previous studies have indicated that *Staphylococcus aureus* can be spread via respirable-sized aerosols and transmitted by direct contact and the airborne route. *Staphylococcus spp.* are revealed as the dominant bacteria in poultry houses and textile, flourmill, and food-related factories. It is known that *S. aureus* plays an important role in nosocomial infections. In particular, the emergence of methicillin-resistant *S. aureus* is a serious health threats in hospitals, resulting in difficult-to-treat infections.

Using appropriate sampling methods for recovering airborne *S. aureus* in the workplace will assist investigators to characterize the human exposure risk. However, research conducted to investigate the sampling methods for airborne *S. aureus* has been limited. To make up this deficiency, a bioaerosol generation system was developed for the present study to evaluate the performance of various *S. aureus* samplers with different collection media operated for a range of sampling times for.

The results with an agar-based sampler, the Andersen 1-STG, showed that the non-selective agar type (TSA) performed significantly better than the four selective agar types (MSA, BPA, CSA, and CSM) ($p < 0.05$). Of the four selective agar media, MSA performed best but with no statistically significant difference compared with the other three. The effects of sampling time on the performance of the Andersen 1-STG with TSA and MSA showed that the *S. aureus* recovery efficiency with 3 min-sampling was significantly greater than that with 6-60 min sampling ($p < 0.05$), while there was no statistical difference in the sampling performance with sampling times between 6 and 60 min. Of the collection media used in liquid-based samplers, the results showed that regardless of agar type, the Tween 80 mixture performed the best, followed by PBS and DW ($p < 0.05$). Further, the recovery efficiency of the BioSampler filled with the Tween 80 mixture was substantially superior to that of the BioSampler with PBS and AGI-30 ($p < 0.05$), and the recovery efficiency dropped with a sampling time of ≥ 15 min ($p < 0.05$). For filter-based samplers, the greatest cell recovery from gelatin filters and PC filters was obtained by using the Tween 80 mixture as the elution buffer, heating the gelatin sample for 15 min, and vortexing the PC filter for 2 min ($p < 0.05$). Moreover, the performance of IOMs equipped with gelatin filters was significantly better than cassettes with PC filters ($p < 0.05$). The recovery efficiency of IOMs and cassettes declined when the sampling time was extended from 30 min to 270 min ($p < 0.05$).

A comparison of the five samplers evaluated in this study showed that sampling by the BioSampler with the Tween 80 mixture followed by the culturing of cells on TSA had the greatest cell recovery ($p < 0.05$). In contrast, the AGI-30 filled with PBS, IOM loaded with a gelatin filter, and cassette with a PC filter resulted in the lowest recovery efficiency ($p < 0.05$). In summary, considering that a longer sampling time may provide a better chance of accurately quantifying *S. aureus* aerosols in the environment, sampling by the BioSampler filled with the Tween 80 mixture for 30 min, followed by sample transportation at 4°C and processing as soon as possible, is recommended.

Keywords: airborne, *Staphylococcus aureus*, sampling performance, bioaerosol sampler

目錄

摘要.....	i
Abstract	iii
目錄.....	v
圖目錄.....	vii
表目錄.....	ix
第一章 計畫概述.....	1
第一節 前言.....	1
第二節 研究目的.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
第一節 金黃色葡萄球菌對人體健康影響.....	3
第二節 金黃色葡萄球菌之空氣傳播.....	3
第三節 金黃色葡萄球菌之空氣採樣研究.....	4
第四節 金黃色葡萄球菌之固體培養基.....	9
第五節 生物氣膠收集液.....	12
第六節 濾紙潤洗液.....	13
第三章 研究流程與方法.....	14
第一節 研究架構.....	14
第二節 材料與方法.....	16
第三節 置備與建立金黃色葡萄球菌檢量線.....	18
第四節 金黃色葡萄球菌菌液濃度之調整.....	18
第五節 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統.....	19
第六節 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統之穩定性測試.....	21
第七節 <i>S. aureus</i> 空氣採樣方法之效能評估.....	24
第八節 資料分析.....	38
第四章 結果.....	39
第一節 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統之穩定性測試.....	39

第二節 以固體培養基為採樣介質之採樣器效能評估	55
第三節 以收集液為採樣介質之採樣器效能評估	63
第四節 以濾紙為採樣介質之採樣器效能評估	77
第五節 生物氣膠採樣方法比較	89
第五章 討論	93
第一節 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統	93
第二節 以固體培養基為採樣介質之採樣方法效能評估	93
第三節 以收集液為採樣介質之採樣方法效能評估	98
第四節 Andersen 1-STG、AGI-30、BioSampler、Cassette 與 IOM	104
第五節 實場採樣影響因子	106
第六節 研究限制	109
第六章 結論與建議	110
第一節 結論	110
第二節 建議	111
誌 謝	112
參考文獻	113

圖目錄

圖 1 研究架構流程.....	15
圖 2 <i>S. aureus</i> 生物氣膠產生系統.....	20
圖 3 選擇 <i>S. aureus</i> 最佳空氣採樣培養基之實驗流程.....	25
圖 4 探討時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能的影響之實驗流程.....	28
圖 5 <i>S. aureus</i> 採樣收集液與採樣時間之效能評估.....	30
圖 6 以濾匣式採樣器(Cassette)評估潤洗液之回收率.....	34
圖 7 以可攜式個人採樣器(Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler, IOM)評估潤洗液之回收率.....	35
圖 8 時間因子對 Cassette 與 IOM 採樣效能之影響.....	37
圖 9 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器(Nebulizer)之流量值(*0 min：開啓系統壓縮空氣時間).....	39
圖 10 暴露艙中相對濕度測試值(*0 min：開啓系統壓縮空氣時間).....	43
圖 11 Nebulizer 中 <i>S. aureus</i> 菌液濃度(*0 min：開啓系統壓縮空氣時間).....	45
圖 12 暴露艙空氣中 <i>S. aureus</i> 濃度.....	47
圖 13 Nebulizer 中 <i>S. aureus</i> 菌液濃度與暴露艙空氣中 <i>S. aureus</i> 濃度隨系統運作下降趨勢圖.....	49
圖 14 採樣效能指標(R).....	50
圖 15 以氣動粒徑分析儀 (Aerodynamic particle sizer) 所得暴露艙中 <i>S. aureus</i>	52
圖 16 五種 <i>S. aureus</i> 培養基之空氣採樣效能(R)比較.....	57
圖 17 Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA，於不同採樣時間下其採樣效能(R).....	61
圖 18 以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 採樣 60 分鐘後，將培養基置於 37°C 下培養 18 至 48 小時之 <i>S. aureus</i> 菌落圖片.....	62
圖 19 三種收集液之空氣採樣效能(R).....	65
圖 20 以 AGI-30 搭配 PBS 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer(Csusp)與暴露艙空氣中細菌濃度(Cair)(*空氣採樣時間(min)).....	66
圖 21 以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer(Csusp)	

與暴露艙空氣中細菌濃度(Cair)(*空氣採樣時間(min)).....	67
圖 22 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	71
圖 23 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R)....	75
圖 24 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能(R).....	77
圖 25 Cassette 搭配 PC filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	81
圖 26 IOM 搭配 Gelatin filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R)	88

表目錄

表 1 <i>Staphylococcus aureus</i> 與 MRSA 之空氣採樣研究.....	7
表 2 <i>Staphylococcus aureus</i> 與 MRSA 之空氣採樣培養基.....	11
表 3 生物氣膠收集液.....	12
表 4 濾紙潤洗液.....	13
表 5 濕空氣流量值(n=3).....	40
表 6 乾空氣流量值(n=3).....	41
表 7 Nebulizer 流量值(n=3).....	42
表 8 暴露艙中相對濕度測量值(n=3).....	44
表 9 Nebulizer 中 <i>S. aureus</i> 菌液濃度(n=3).....	46
表 10 暴露艙空氣中 <i>S. aureus</i> 濃度(n=3).....	48
表 11 採樣效能指標(R) (n=3).....	51
表 12 暴露艙中 <i>S. aureus</i> 之粒徑分佈(n=3).....	53
表 13 暴露艙中 <i>S. aureus</i> 之粒徑(n=3).....	54
表 14 五種 <i>S. aureus</i> 培養基之空氣採樣效能(R)與統計檢定結果.....	56
表 15 TSA 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	59
表 16 MSA 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	60
表 17 TSA 與 MSA 之採樣效能(R)統計檢定.....	61
表 18 三種收集液之空氣採樣效能(R)與統計檢定結果.....	64
表 19 AGI-30 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	68
表 20 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	70
表 21 BioSampler 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	72
表 22 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能(R).....	74
表 23 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能(R)統計檢定..	76
表 24 以 Cassette 評估 PC filter 於 Tween 80 潤洗液與 PBS 中經過不同震盪時間處理之 回收率(%)統計檢定.....	79
表 25 Tween 80 潤洗液與 PBS 之回收率(%)統計檢定.....	80

表 26 Cassette 搭配 PC filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R)統計檢定.....	82
表 27 Tween 80 潤洗液與 PBS 之回收率(%)統計檢定.....	84
表 28 以 IOM 評估 Gelatin filter 於 Tween 80 潤洗液與 PBS 中經過不同加熱時間處理 之回收率(%)統計檢定.....	85
表 29 IOM 搭配 Gelatin filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R)統計檢定.....	87
表 30 IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 之採樣效能(R)統計檢定.....	89
表 31 五種採樣器搭配不同介質於 30 與 60 分鐘採樣時間下之相對採樣效能(Relative R)與統計檢定(以 TSA 推盤).....	91
表 32 五種採樣器搭配不同介質於 30 與 60 分鐘採樣時間下之相對採樣效能(Relative R)與統計檢定.....	92
表 33 選擇性培養基之比較.....	97
表 34 細菌活性與可培養性評估指標.....	102
表 35 採樣效能評估指標.....	103

第一章 計畫概述

第一節 前言

Staphylococcus aureus (金黃色葡萄球菌)為職業場所與醫院院內感染重要之病原菌，可強勢存在於醫療院所、家禽養殖地點、紡織、食品、麵粉等工作環境，且其導致治療困難的抗藥性問題以及空氣傳播特性亦已被證實。因此，有效監測這些致病菌在環境空氣中是否存在及其濃度值，以協助決策者釐清感染源，進一步採取適當的隔離措施與醫療處置，將有助於減少感染的發生、維護空氣品質及員工健康。有效監控空氣中病原菌濃度的具體作法之一，即是進行空氣採樣，再透過適當的分析定量其病原菌之濃度。然目前針對 *S. aureus* 之空氣採樣效能研究相當有限，何種採樣策略最能有效捕集空氣中的 *S. aureus*，使其能確實呈現空氣中的細菌濃度，目前仍不清楚。

第二節 研究目的

本研究收集 *S. aureus* 空氣採樣相關文獻，了解曾應用於採樣空氣中 *S. aureus* 之生物氣膠採樣器、採樣介質與採樣時間等各種採樣條件，並彙整相關文獻作為實驗設計之參考。同時於實驗室建置一 *S. aureus* 氣膠產生系統，藉此評估不同採樣器在不同採樣條件下對 *S. aureus* 之採樣效能，以找出最佳採樣策略用於所研究之病原菌。執行工作如下：

- 一、 收集 *S. aureus* 空氣採樣相關文獻。
- 二、 評估不同培養基對於空氣中金黃色葡萄球菌之採樣效能，決定最佳空氣採樣培養基。
- 三、 評估以培養基為採樣介質之採樣器，搭配先前實驗決定具最佳採樣效能之培養基，透過培養法評估不同採樣時間對其採樣效能之影響。
- 四、 評估不同採樣液體對於空氣中金黃色葡萄球菌之採樣效能，決定最佳空氣採樣收集液。
- 五、 評估以液體為採樣介質之採樣器，搭配先前實驗決定具最佳採樣效能之收集

液，透過培養法評估採樣器種類與採樣時間對採樣效能之影響。

六、以濾紙為介質評估空氣採樣方法。

第二章 文獻回顧

第一節 金黃色葡萄球菌對人體健康影響

金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)為一種兼性厭氧的革蘭氏陽性球菌，對高溫(45°C)、高鹽分(10%)與乾燥有耐受性，一般最常聚集於鼻腔黏膜。當人體皮膚有傷口、處於免疫力低下、環境衛生條件較差或個人衛生習慣不佳時，*S. aureus* 皆可能透過手部接觸或空氣傳播造成伺機性感染[1]。加上長期以來由於醫療院所抗生素的大量使用，也導致 *S. aureus* 產生抗藥性。抗藥性金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA)可對 Methicillin 產生抗藥性，美國於 2005 年統計顯示，40% - 70% 之 *S. aureus* 院內感染係由 MRSA 造成[2]。細菌抗藥性日趨嚴重的問題已經造成感染 *S. aureus* 後治療上日益困難。

S. aureus 除存在於醫療院所外，在環境衛生條件較差之相關工作環境空氣中也可發現 *Staphylococcus* spp.。2010 年 Awad 等人於麵粉廠、紡織廠、家禽養殖場所以及食品工業等處進行空氣採樣，結果發現 *Staphylococcus* spp. 為這些工作場所空氣中主要菌種之一[3]。另外，2008 年 Moodley 等人研究獸醫鼻腔中 MRSA 帶原情形，結果發現相較於不常實際接觸動物之實習學生，獸醫具有較高之 MRSA 帶原比例，意味著獸醫具有感染 MRSA 之較高風險[4]。

暴露於 *S. aureus* 之主要感染症狀為肺囊性纖維化(Cystic fibrosis，CF)，會導致肺功能異常，呼吸困難為主要致死原因。除導致呼吸系統疾病外，*S. aureus* 亦為常見引起食物中毒的病原菌之一，人類食入受 *S. aureus* 污染之食物，可引發腹痛、腹瀉或嘔吐等腸胃症狀[5]。

第二節 金黃色葡萄球菌之空氣傳播

金黃色葡萄球菌是皮膚正常菌群，人體最常帶原 *S. aureus* 的部位為鼻腔黏膜，且諸多文獻指出此細菌可經由直接接觸或空氣傳播[1, 6-8]。1965 年 Noble 等人發現帶原者換穿衣物或鋪床時，會將帶有 *S. aureus* 之皮膚鱗狀上皮細胞散佈至空氣中；該研

究推測，當 *S. aureus* 再經人類吸入停留於鼻腔黏膜中，易透過手部接觸將 *S. aureus* 沾黏至皮膚上，*S. aureus* 會因此再次隨著皮膚碎屑散佈至空氣中[6]。1983 年 Rutala 等人於燒燙傷病房進行院內感染調查，發現在距地面較高處物體(例如：病房書櫥頂部)之表面採樣樣本中可檢出 MRSA，由於這些採樣點為醫護人員或病患較少接觸之區域，研判此結果較可能與 MRSA 經空氣傳播有關[7]。2002 年 Shiomori 等人發現，空氣中帶有 MRSA 之微粒能以小於 4 μm 之大小散佈於空氣中，此種微粒可進入人類下呼吸道，並進而引發肺部感染之可能[8]。2003 年 Beggs 等人指出，任何接觸傳播引起的感染，都可能因為空氣中的病原菌落在物體表面，再經由手部接觸引起感染，因此不能忽視 *S. aureus* 之空氣傳播之重要性[1]。

第三節 金黃色葡萄球菌之空氣採樣研究

過去針對 *S. aureus* 之空氣採樣研究(表 1)，曾使用 Andersen sampler 搭配不同培養基，於一般住家[9, 10]、醫療院所[8, 11]、雞舍[12]或實驗室[11]進行不同時間之空氣採樣。於一般住家環境中進行 *S. aureus* 空氣採樣之研究，包括了 2011 年 Perez 等人以 Andersen one stage sampler (Andersen 1-STG) 搭配 Nutrient agar (NA) 進行 3 分鐘之空氣採樣[9]，以及 2006 年 Gandara 等人以 Andersen 2-STG 搭配 Tryptic Soy Agar (TSA)，於一般住家環境進行 10 與 15 分鐘之空氣採樣[10]。上述兩者之研究目的皆欲了解一般住家環境空氣中非抗藥性與具抗藥性之 *S. aureus* 的分佈情形。

至於在醫療院所進行之 *S. aureus* 空氣採樣研究，則包含了 2012 年 Hsiao 等人以 Andersen 1-STG 搭配 CHROMagar staph aureus (CSA) 於醫學中心候診區、小兒病房與呼吸照護病房等處進行之 7 分鐘空氣採樣，以了解於實際環境中使用 CSA 時，其鑑定空氣中 *S. aureus* 之敏感性與特異性[11]；此外，2002 年 Shiomori 等人於 MRSA 帶原病患病房中，以 Andersen 6-STG 搭配 MSO agar 進行 10 分鐘之空氣採樣，以探討醫護人員整理病床前、整理病床時與整理病床後，MRSA 於病房空氣中的濃度與其氣膠粒徑之大小[8]。2013 年 Huang 等人研究指出空氣中 *S. aureus* 在訪客進入加護病房(ICU)後，濃度和檢出率有上升現象[13]。另，2012 年 Mirzaii 等人以抹拭與空氣樣本確認 ICU 地面與空氣中細菌分布情形，結果顯示空氣中 *S. aureus* 平均濃度為

12.1±8.11CFU/m³，且 *S. aureus* 污染濃度較高處為呼吸儀器與床架[14]。於醫療院所進行空氣採樣研究，除了使用 Andersen sampler 外，尚包括 MAS-100 sampler。2009 年 Gehanno 等人使用 MAS-100 sampler 搭配 Chromogenic medium，於醫院病房進行 10 分鐘之空氣採樣，以評估 MRSA 帶原病患所住病房空氣中之 MRSA 濃度[15]。

於家禽舍進行 *S. aureus* 空氣採樣之研究，則包括了 2009 年 Zhong 等人以 Andersen 6-STG 搭配 Baird-Park agarose (BPA)，於雞舍進行 1 至 5 分鐘之空氣採樣，目的係以 *S. aureus* 為該環境空氣中微生物分佈之指標細菌，以觀察雞舍室內外空氣中微生物之分佈[12]。2011 年 Schulz 等人則使用 AGI-30 搭配磷酸緩衝液 (glycerol-phosphate buffer)，於家禽養殖場進行 30 與 90 分鐘之空氣採樣，此研究目的為以葡萄球菌為指標細菌，探討具通風之養殖場其空氣中微生物分佈與逸散情形[16]。2012 年 Schulz 等人亦以 AGI-30 搭配 PBS 於豬舍中採樣，調查豬舍中 MRSA 分布之情形。其分別自每季挑選一天於豬舍鼻腔採樣，並距豬舍遠近不同之迎風處或順風處地面採集抹拭與空氣樣本，結果顯示在夏季所有來源之樣本檢出率皆高，且豬舍內外樣本之 MRSA 菌種相同，亦即 MRSA 確實存在豬舍內且會藉由空氣傳播至豬舍外，此現象於夏季時更為明顯[17]。此外，2012 年 Friese 等人以 AGI-30 與 IOM (Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler) 於豬舍進行 30 與 150 分鐘之空氣採樣，並取豬隻皮膚樣本、鼻腔抹拭樣本與豬舍地面抹拭樣本，以確認豬舍中 MRSA 之分布情形，結果顯示 AGI-30 較 IOM 採樣結果有更高的檢出率 [18]。2013 年 Friese 等人亦以相同空氣採樣方式於雞舍進行空氣採樣，以調查雞舍中 MRSA 分布之情形，分別採取雞隻鼻腔抹拭樣本、雞舍地面抹拭樣本與雞舍內外之空氣樣本，結果顯示在雞隻身上、雞舍內地面與雞舍內外空氣中皆存在同菌種之 MRSA，亦即 MRSA 不只在雞舍內傳播，亦會散佈至雞舍外[19]。

除探究工作場所空氣中 *S. aureus* 之暴露情形外，也曾出現有限之 *S. aureus* 空氣採樣方法效能評估研究。2012 年 Hsiao 等人發表的研究中，曾使用 Andersen 1-STG 與濾匣式採樣器 (Cassette) 搭配不同採樣介質 (Andersen 1-STG 使用培養基包括 LB、TSA、

BAP 與 CSA, Cassette 使用濾紙為 Polycarbonate membrane), 於採樣時間分別為 7 與 60 分鐘下, 評估兩種採樣器於不同相對濕度下之採樣效能。另外, 該研究亦於醫院環境進行實場採樣, 以評估 *S. aureus* 選擇性培養基之鑑定敏感性與特異性。結果顯示 Andersen 1-STG 有較佳的採樣效能[11]。除進行現場採樣瞭解 *S. aureus* 暴露現況或採樣效能外, 2012 年 Hsiao 等人的研究也曾於實驗室內建置生物氣膠產生系統, 透過產生空氣懸浮之 *S. aureus* 以評估 Andersen 1-STG 搭配不同採樣介質時之 *S. aureus* 回收率, 並與 Cassette 之採樣效能進行比較。結果發現, Andersen 1-STG 搭配 Luria-Bertani (LB) broth 之採樣回收率高於 CHROMagar Staph aureus Agar (CSA); 且相較於 Cassette, 其對 *S. aureus* 有較佳的回收率。後者現象推測可能與 Cassette 於採樣過程中使微生物受到之衝擊力及乾燥有關[11]。

綜觀上述研究可發現, 在調查作業現場空氣中 *S. aureus* 暴露時, 各研究常各自選用不同的採樣器搭配選擇性或非選擇性之培養基, 並以不同的採樣時間進行各自的空氣採樣。然若要確實呈現環境空氣中 *S. aureus* 濃度, 必須有適當的採樣策略以有效捕集空氣中之 *S. aureus*, 避免或降低 *S. aureus* 在採樣過程中因不當的採樣方法所造成的損失, 導致研究者低估環境中 *S. aureus* 濃度; 而上述各研究中所使用之不同採樣器、採樣介質與採樣時間等即是影響微生物捕集效率之重要因子。因此, 若能針對這三項因子進行審慎評估, 藉以釐清捕集空氣中 *S. aureus* 之最佳採樣條件, 可藉此擬定適當採樣策略以有效捕集該病原菌。然目前的研究中, 除了 2012 年 Hsiao 等人研究曾針對 Andersen 1-STG 與 Cassette 兩種採樣器之採樣效能進行比較外[11], 其他文獻則鮮少對 *S. aureus* 空氣採樣方法進行詳細的效能評估。此外, 雖然於過去 *S. aureus* 空氣採樣文獻中, 並未使用改善了氣膠化現象之 BioSampler[20]與可攜式個人採樣器(Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler, IOM)[21], 然此二種採樣器亦為常見之生物氣膠採樣設備, 其是否更有利於捕集 *S. aureus*, 亦需要進一步評估加以釐清。

表 1 *Staphylococcus aureus* 與 MRSA 之空氣採樣研究

採樣器	採樣時間	採樣介質	偵測上下限 (CFU/m ³)	採樣地點	Ref.
Andersen 1-STG	3 min	Nutrient Agar	430 / 29 5 / 1 (MRSA)	一般住家	[9]
Andersen 1-STG	7 min	CHROMagar staph aureus CMRSA (For MRSA)	8 / 2.5 7.4 / 1.7	醫學中心候診區、小兒病房與呼吸照護病房	[11]
Andersen 1-STG	2 min	TSA	4.42±11.84 / 0.88±3.9	加護病房	[13]
Andersen 1-STG	10 min	TSA	13.47±9.42 / 5.86±4.09	加護病房	[14]
Andersen 2-STG	10 min、15 min	Tryptic Soy Agar	74.79 / 0.59	一般住家	[10]
Andersen 6-STG	1-5 min	Baird-Park agarose	137 / 3	雞舍	[12]
Andersen 6-STG	10 min	MSO agar (For MRSA)	116.0±43.7 / 0.7	醫院	[8]

表 1 *Staphylococcus aureus* 與 MRSA 之空氣採樣研究(續)

採樣器	採樣時間	採樣介質	偵測上下限 (CFU/m ³)	採樣地點	Ref.
MAS-100	10min	Chromogenic medium	40 / 0.5	老人照護、小兒病房與呼吸照護病房	[15]
AGI-30	30min、90min	Glycerol– phosphate buffer	ND (Not detected)	雞舍	[16]
AGI-30	30 min	PBS	$2.3 \times 10^4 / 19$ (MRSA)	家禽舍	[19]
IOM	150 min	Polycarbonate filter	$7.4 \times 10^3 / 89$ (MRSA)		
AGI-30	-	PBS	3619 / 2	豬舍	[17]
AGI-30	30 min	PBS	257 (MRSA)	豬舍	[18]
IOM	150 min	Polycarbonate filter	802 (MRSA)		
Nuclepore filter	60 min	Polycarbonate membrane	4.6 / 2.2 2.8 / 0.6 (MRSA)	醫學中心中候診區、小兒病房與呼吸照護病房	[11]

第四節 金黃色葡萄球菌之固體培養基

一、非選擇性培養基

非選擇性培養基(non-selective medium)，為一種對微生物沒有選擇性抑制之培養基。2006年 Gandara 等人曾以 Andersen 2-STG 搭配 Tryptic Soy Agar (TSA)，進行空氣中 *S. aureus* 採樣，其後續鑑定流程如表 2 所示 [10]。由於 TSA 可提供胺基酸或氮源之豐富有機物質，加上不含抑菌物質，因此可培養大多數挑剔性(fastidious)或非挑剔性(non-fastidious)微生物，長久以來被廣泛使用於各種微生物培養實驗。然其不含抑菌物質之特點，同時亦會造成 TSA 於環境採樣與培養後，出現過多雜菌干擾現象。TSA 於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培養 *S. aureus* 18 小時以上，培養基上即會出現黃色菌落。

二、選擇性培養基

選擇性培養基(selective medium)為一種於培養基內加入特定抑菌物質，使特定微生物穩定生長，而某些微生物之生長則受抑制之培養基，因而其有利於特定微生物之分離。過去 *S. aureus* 之空氣採樣研究，曾使用之選擇性培養基包括：Mannitol salt agar (MSA)[16]、Baird-Parker agar (BPA)[12]、CHROMagar staph aureus (CSA)[11] 與 Chapman Stone Medium (CSM)[9, 10] (表 2)。

2011年Schulz等人以AGI-30搭配glycerol-phosphate buffer於雞舍進行空氣採樣，後續培養時即以MSA作為初步分離*S. aureus*之選擇性培養基[16]。MSA含有7.5%之高濃度鹽類，可抑制葡萄球菌(staphylococci)以外其他細菌的生長。且其含有醣類甘露醇(mannitol)，*S. aureus* 醱酵甘露醇後之代謝物，其酸性會使培養基中之pH指示劑-酚紅(phenol red)-轉變成黃色，使其菌落周圍形成黃色環，而大多數非致病性葡萄球菌無法醱酵甘露醇。由於MSA中含有酚紅，因此在未培養*S. aureus*前培養基呈現紅色；若於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培養*S. aureus* 18小時以上，培養基上即會出現金黃色菌落。

BPA曾於2009年為Zhong等人用於Andersen 6-STG內，在雞舍中進行*S. aureus*空氣採樣[12]。BPA成分中之鋰鹽(Lithium)與亞碲酸鹽(Tellurite)，可抑制葡萄球菌

(staphylococci)以外之雜菌生長，且因葡萄球菌可將Tellurite還原成Telluride，其反應產物會使菌落呈現黑色。而BPA中所添加之蛋黃液(Egg yolk)，使培養基外觀呈現不透明之淡黃色。若在 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培養*S. aureus* 於BPA18小時以上，可觀察到菌落周圍出現不透明之暈環，此為*S. aureus*之lecithinase分解蛋黃液中lecithin所造成。

2012年Hsiao等人曾以Andersen 1-STG搭配CSA進行*S. aureus*空氣採樣[11]。CSA為一產色性培養基，其特殊產色原(Chromogen)被*S. aureus*之特定酵素代謝後，會使*S. aureus*形成淡紫色菌落。此外，CSA中添加之抑菌物質可抑制革蘭氏陰性與其他非*S. aureus*之革蘭氏陽性球菌，因此非*S. aureus*之細菌除無法代謝Chromogen外，亦可能被CSA中所含抑菌物質所抑制，而達到篩選出*S. aureus*之目的。CSA於 37°C 下培養*S. aureus* 18小時以上，即可觀察到淡紫色菌落。

CSM 則是透過高鹽分(5.5%)篩選出 *S. aureus* 之培養基。2006 年 Gandara 等人以 Andersen 2-STG 搭配 TSA 進行空氣採樣，將 TSA 於 35°C 下培養 24 至 48 小時後，再將培養出來之菌落接種至 CSM [10]。此外，2011 年 Perez 等人亦以 Andersen 1-STG 搭配 NA 進行空氣採樣，將 NA 於 36°C 下培養 48 小時，再將培養出來之菌落接種至 CSM [9]。CSM 培養基本身呈半透明之琥珀色，成份中含有甘露醇(mannitol)，*S. aureus* 可發酵 mannitol 後產酸。CSM 於 30°C 下培養 *S. aureus* 18 至 48 小時後，可於 CSM 上觀察到黃色菌落。

表 2 *Staphylococcus aureus* 與 MRSA 之空氣採樣培養基

採樣器	培養介質	鑑定流程	觀察上下限值	Ref.
Andersen 1-STG	Nutrint agar (NA)	48hr at 36°C → Chapman Stone Medium (CSM) → 48hr at 36°C → NA → 48hr at 36°C → Coagulase plasma test → Antibiotic Susceptibility Test → 48 hr at 36°C	<i>S. aureus</i> /Total Bacteria = 98% MRSA/Total Bacteria = 56%	[9]
	CHROMagar staph aureus (CSA)	20–24hr at 37°C → Gram stain → Hemolysis test (overnight at 37°C on sheep blood agar) → Catalase test → Slide coagulase test → real time PCR (nuc Gene) → Antibiotic Susceptibility Test	SA : 8 (CFU/m ³)	[11]
Andersen 2-STG	Tryptic Soy Agar (TSA)	24–48hr at 35°C → Chapman Stone Medium (CSM) → 48hr at 35°C → Coagulase test → Antibiotic Susceptibility Test → 48 hr at 35°C	<i>S. aureus</i> /Heterotrophic organisms (%) = 37.33	[10]
Andersen 6-STG	Baird-Parker agarose (BPA)	24hr at 37°C → KOH reaction → 24hr at 37°C in BPA → API 20 Steph	SA : 137 (CFU/m ³)	[12]
AGI-30	Glycerol-phosphate buffer	Mannitol salt agar (MSA) → 24–48hr at 36°C → blood agar basis plates 24–36hr at 36°C → Gram stain → Morphology → Motility → Catalase test → Oxidase test → Lysostaphin susceptibility → Clumping factor test → 16S–23S rDNA intergenic spacer PCR	-	[16]
Andersen 1-STG	TSA	Gram stain → catalase test → tube coagulase test → Dnase test → fermentation of mannitol → PCR (<i>femA</i>)	3.1-14.2%	[14]
Andersen 1-STG	TSA	GEN III Biolog method	5-15%	[13]

第五節 生物氣膠收集液

過去生物氣膠文獻中常使用之收集液（表 3），包括經過濾之無菌水(Filtered deionized water, DW) [22-24]、磷酸緩衝液(Phosphate buffer saline, PBS) [3, 25, 26]與 Tween 80 mixture (Deionized water with 1% peptone, 0.01% Tween 80, 0.005% antifoam A, TM) [27, 28]。

表 3 生物氣膠收集液

收集液種類	測試菌種	研究類型	Reference
無菌水	<i>Bacillus subtilis</i> and <i>Cladosporium cladosporioides</i> fungal spores	Laboratory chamber	[22]
	<i>Legionella pneumophila</i> and <i>Escherichia coli</i>	Laboratory chamber	[23]
	<i>Legionella pneumophila</i>	Field sampling	[24]
磷酸緩衝液	<i>Staphylococcus</i> spp., Gram (+) and Gram (-) bacteria	Field sampling	[3]
	<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp.	Field sampling	[25]
	<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp.	Field sampling	[26]
Tween 80 mixture	<i>Bacillus subtilis</i> spores and <i>Escherichia coli</i>	Laboratory chamber	[27]
	Bacteria and fungal spores	Field sampling	[28]

第六節 濾紙潤洗液

過去生物氣膠文獻中常使用之濾紙潤洗液（表 4），包括含 0.1% peptone 與 0.01%Tween 80 之 Tween 80 潤洗液(Tween 80 elution buffer) [21, 28-30]、磷酸緩衝液 (Phosphate buffer saline, PBS) [31, 32]與經過濾之無菌水(Filtering deionized water, DW)[11, 33]。

表 4 濾紙潤洗液

收集液種類	採樣器	濾紙種類	測試菌種	Reference
Tween 80 elution buffer	80IOM	Gelatin filter	<i>L. pneumophila</i>	[29]
	Cassette	Polycarbonate filter	Bacteria	[28]
			<i>Bacillus subtilis</i> spores and <i>Escherichia coli</i>	[30]
			<i>Penicillium melinii</i> spores, <i>Aspergillus versicolor</i> spores, <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Serratia marcescens</i> vegetative cells and <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> endospores	[21]
磷酸緩衝液	IOM	Gelatin filter	<i>Legionella</i> spp., total bacteria, non-tuberculous mycobacteria (NTM)	[31]
	Cassette	Polycarbonate filter	<i>Pantoea agglomerans</i>	[32]
無菌水	Cassette	Polycarbonate filter	<i>Staphylococcus aureus</i>	[11]
			<i>Bacillus subtilis</i> spores, <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida famata</i> and <i>Penicillium citrinum</i>	[33]

第三章 研究流程與方法

第一節 研究架構

研究架構流程如圖 1 所示。空氣採樣實驗於 *S. aureus* 氣膠產生系統內進行，此系統設置於第二級生物安全櫃中，並進行其濕度、流量、生物氣膠粒徑與濃度之穩定性測試與評估。空氣採樣實驗的細菌來源係於實驗室內培養之病原性細菌 *S. aureus* (ATCC 29213)，調整其至適當濃度後，置入生物氣膠產生器(Collision three-jet nebulizer)中，使其於系統中產生生物氣膠。

採樣效能評估實驗之第一部份為評估以培養基為採樣介質之生物氣膠採樣方法，實驗設計以 Andersen one stage sampler 搭配五種不同培養基，進行相同時間之 *S. aureus* 空氣採樣，藉此評估不同培養基採集空氣中 *S. aureus* 之效能。決定最佳採樣效能之培養基後，將評估不同採樣時間對以相同培養基為採樣介質之採樣器的效能影響，方法係以 Andersen one stage sampler 搭配本研究測試具較佳採樣效能之培養基，進行不同採樣時間之實驗。第二部分為評估以液體為採樣介質之生物氣膠採樣方法，首先以 AGI-30 搭配三種不同收集液，於相同採樣時間下比較不同收集液對空氣中 *S. aureus* 之採樣效能。而後以 AGI-30 與 BioSampler 搭配本研究測試具較佳採樣效能之收集液，進行不同採樣時間之實驗，以觀察不同生物氣膠採樣器與不同採樣時間對 *S. aureus* 採樣效能的影響。

第三部分進行以濾紙為收集介質之評估，以 Cassette 與 IOM 進行不同採樣時間實驗，觀察 Cassette 與 IOM 兩種採樣器於不同採樣時間下之 *S. aureus* 採樣效能。

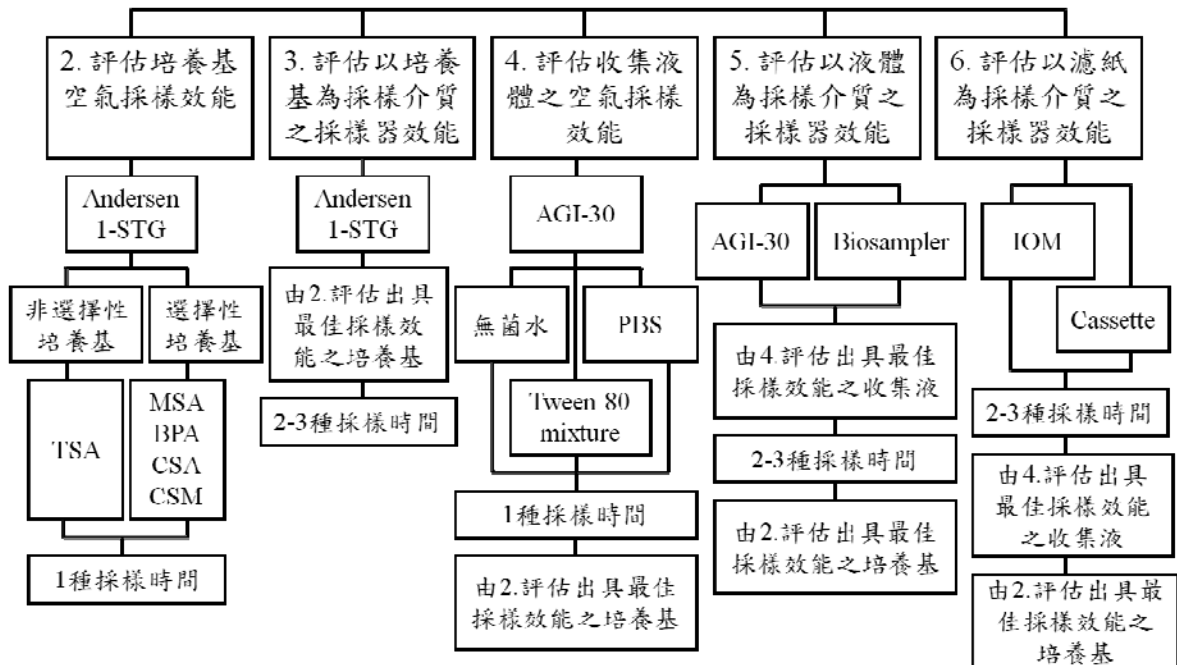
於實驗室建立具穩定流量、濕度、氣膠粒徑與濃度之
生物氣膠產生系統



S. aureus (ATCC 29213)於 50mL LB broth 在 37°C 下培養 14 小時
(2.36 xg)，建立檢量線以利後續實驗調整細菌濃度之用



經採樣測試，調整菌液至適當濃度後，將 40 mL *S. aureus* 懸浮
菌液置入生物氣膠產生器，使系統中產生穩定濃度之生物氣膠



培養法分析：培養基於 37°C 下培養 24 小時後，計數菌落數

圖 1 研究架構流程

第二節 材料與方法

一、實驗菌株

本研究所採用菌種為 *S. aureus* (ATCC 29213)。*S. aureus* 為兼性厭氧之革蘭氏陽性球菌，不產芽孢 (spore)，無鞭毛(flagella)，菌直徑為 0.5-1 μm [34]，可於 37°C 下生長良好，其氣動粒徑(aerodynamic diameter)為 0.65-0.7 μm [35]。

二、實驗用培養基、培養液與採樣收集液

(一) Tryptic Soy Agar (TSA)

將 40g TSA 粉末(Difco, Detroit MI, USA)置入 1000 mL 經過濾之去離子水 (Milli-Q Academic, Millipore, Bedford, MA, USA)，慢慢加熱至沸騰，使 TSA 粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 TSA 置於水溫 50°C 的水浴槽使之降溫，最後輕輕混合倒入無菌培養皿(20 mL/plate)。

(二) Mannitol Salt Agar (MSA)

取 111g MSA 粉末(Difco)懸浮於 1000 mL 經過濾之去離子水(Millipore)，接著慢慢加熱至沸騰，使 MSA 粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 MSA 置於水溫 50°C 的水浴槽使之降溫，最後輕輕混合倒入無菌培養皿(20 mL/plate)。

(三) Baird-Parker Agar (BPA)

取 63g BPA 粉末(Difco)懸浮於 950 mL 經過濾之去離子水(Millipore)，加熱至沸騰使 BPA 粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 BPA 冷卻至 45-50°C，其後加入 50 mL EY Tellurite Enrichment (Difco)，以體積 95:5 之比例混合均勻。培養基注入培養皿前，應搖動混合使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，最後輕輕混合倒入無菌培養皿(20 mL/plate)。

(四) CHROMagar Staph aureus Agar (CSA)

CHROMagar Staph aureus (CHROMagar Microbiology, Paris, France)為用於分離與鑑定臨床或食品樣本中 *S. aureus* 之成品培養基。

(五) Chapman Stone Medium (CSM)

取 202.5g CSM 粉末(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)懸浮於 1000 mL 經過

濾之去離子水(Millipore)，接著慢慢加熱至沸騰，使 CSM 粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 CSM 置於水溫 50°C 的水浴槽使之降溫，最後輕輕混合倒入無菌培養皿(20 mL/plate)。

(六) Luria-Bertani (LB) broth

取 25g LB Broth 粉末(Difco)懸浮於 1000 mL 經過濾之去離子水(Millipore)，加熱至沸騰，使粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 LB Broth 置於水溫 50°C 的水浴槽使之降溫，保存於 4°C 下備用。

(七) Phosphate buffer saline (PBS)

配方 / 公升	
NaCl	8.2 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g

(八) Tween 80 混合液

配方 / 公升	
Peptone (Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc, UK)	10 g
Tween 80 (J.T Backer®, USA)	100 µl
Antifoam Y-30 emulsion (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)	50 µl

將上述成分置入 1000 mL 經過濾之去離子水(Millipore)，配製成含有 1% Peptone(Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc, UK)、0.01% Tween 80 (J.T Backer®, USA)與 0.005% Antifoam Y-30 emulsion (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)之混合溶液，以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘後冷卻至室溫，保存於 4°C 環境備用。其中 Tween 80 為一介面活性劑，用於促進微生物於空氣採樣過程中均勻分散於收集液中；而 Antifoam Y-30 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)用於減緩收集液之起泡程度。

(九) Tween 80 潤洗液

配方 / 公升	
Peptone (Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc, UK)	1g
Tween 80 (J.T Backer®, USA)	100 µl

將上述成分置入 1000 mL 經過濾之去離子水(Millipore)，配製成含有 0.1% Peptone (Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc, UK)與 0.01% Tween 80 (J.T Backer®, USA)之混和溶液，以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘後冷卻至室溫，保存於 4°C 環境備用。

第三節 置備與建立金黃色葡萄球菌檢量線

在置備 *S. aureus* 菌液時，先將儲存於-20°C 之 *S. aureus* (ATCC 29213)進行活化，再將 *S. aureus* 接種至 TSA，於 37°C 下培養 24 小時後，將長出之第一代 *S. aureus* 接種至 TSA，再以相同培養條件，培養至第三代。接著將第三代 *S. aureus* 菌落接種至 50 mL LB broth 且置於 37°C 培養箱，以 2.36 ×g 震盪培養 14 小時。14 小時後將此培養液以 1000 ×g 於 4°C 下離心 5 分鐘，移除上清液後加入適量無菌水，使細菌懸浮於無菌水中。

本研究因需調整 Collision three-jet nebulizer 中細菌懸浮液至適當濃度，以利後續生物氣膠採樣，故須建立分光光度值(OD 值)與菌落數(CFU)相對應之標準檢量線。其作法係將上述之細菌懸浮液進行 2 倍序列稀釋，並將原始菌液與序列稀釋液皆進行 A600 測定，記錄 OD 值後，以推盤法分別將原始菌液與序列稀釋液塗抹於 TSA 上，放置培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後，計數菌落數，並與測定之 OD 值建立檢量線。

第四節 金黃色葡萄球菌菌液濃度之調整

在進行生物氣膠產生前，先量測備製之 *S. aureus* 懸浮液的 OD 值，再利用先前所製備之檢量線推估當次準備懸浮液內 *S. aureus* 濃度，並以無菌水調整菌液濃度至適合

於該次系統採樣之 *S. aureus* 濃度。所謂適當濃度必須視不同採樣器來調整，例如以培養基為採樣介質之採樣器，培養基之菌落數不宜過多或過少，以免影響計數穩定性。而評估以液體為採樣介質之採樣器採樣效能時，由於液體可透過稀釋調整其在培養基上的菌落數，因此相較於以培養基為採樣介質之採樣器，生物氣膠產生器中菌液濃度會較高。亦即因不同採樣器之流量不同，採樣介質不同，是否可於採樣後對樣本進行稀釋亦有所不同，為了能獲得適中的菌落數，故有不同的菌液濃度設計。

第五節 *S. aureus* 氣膠產生系統

本研究建置之 *S. aureus* 氣膠產生系統詳如圖 2。系統運作方式為先將 40 mL 之 *S. aureus* 懸浮液置於 Collision three-jet nebulizer (BGI Collision Nebulizer, BGI Inc., Waltham, USA)中，通入經 HEPA-filter 過濾且流量為 3 L/min 之壓縮空氣後，nebulizer 內之 *S. aureus* 呈氣膠化，並藉由壓縮空氣的推送通過長度一公尺之管線，而後進入系統暴露艙中。HEPA-filter 過濾之壓縮空氣同時亦進入另兩條管線，其中一條管線空氣將經過加濕器(Humidifier)以增加濕度，此管線(長度為 1.1 公尺)稱之為濕空氣，預設流量為 30 L/min；另一條未經過加濕器之管線(長度為 0.6 公尺)則為乾空氣，預設流量為 27 L/min。此兩條管線交會後，形成具有一定相對濕度(Relative humidity, RH, %)之混合氣體，並進入系統之暴露艙中，使系統暴露艙中之總送氣氣量達預設之 60 Lpm。暴露艙中置有溫濕度計(Thermo-hydrometer HT800, INS Enterprise Co., Ltd., Taiwan)以確認暴露艙中 RH 是否介於 55-60%濕度範圍，此濕度範圍較接近一般室內環境中大部分情況下之相對濕度[36]。

S. aureus 氣膠產生系統之暴露艙為由長、寬、高皆為 29.5 cm 之方形壓克力板組裝而成之空間，其氣膠入口處設置有一圓形壓克力板，暴露艙底部設置一圓形開口，待評估之採樣器之採樣口即由此處進入暴露艙中進行空氣採樣，每次進行一種採樣器之空氣採樣，且每種採樣器之採樣高度皆距艙室底部 4 公分。暴露艙後端則連接 HEPA filter 與抽氣流量 60 Lpm 之幫浦，以過濾離開暴露艙之生物氣膠。

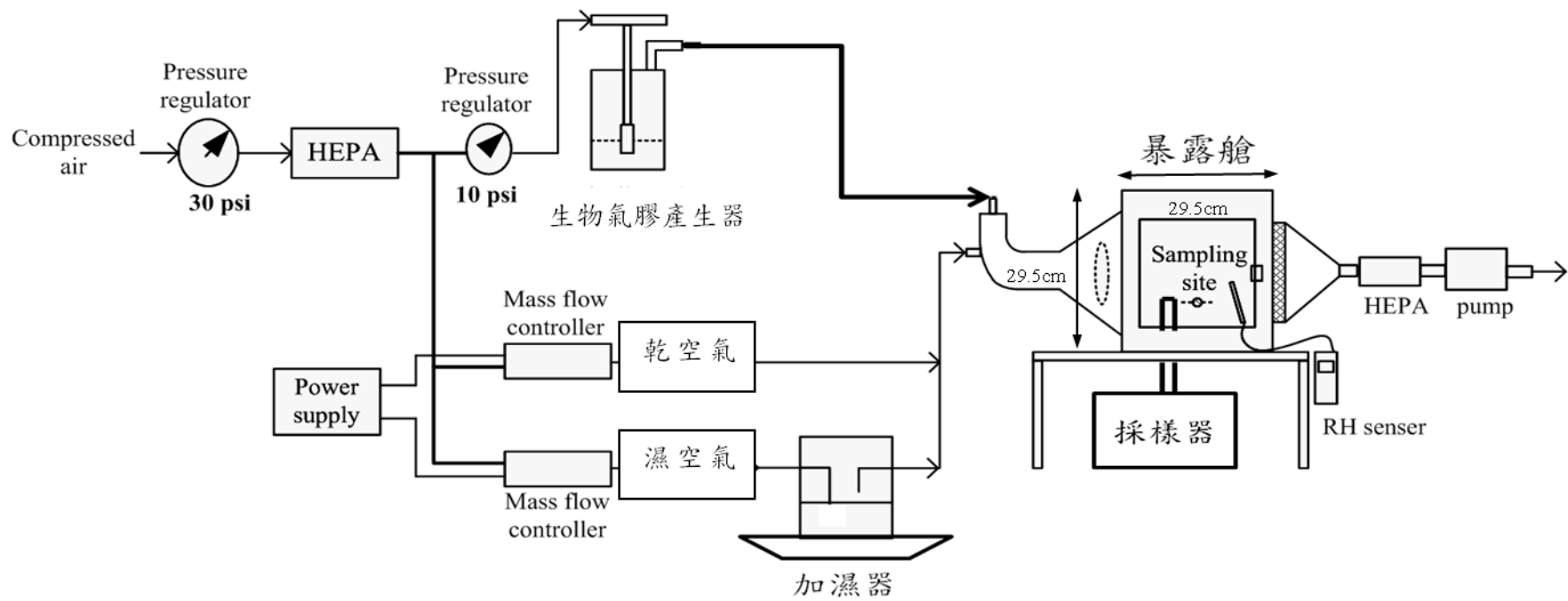


圖 2 *S. aureus* 生物氣膠產生系統

第六節 *S. aureus* 氣膠產生系統之穩定性測試

一、濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器之流量

S. aureus 氣膠產生系統包括濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器(Collision three-jet nebulizer)三條空氣管線。濕空氣流量預設為 30 L/min，乾空氣流量預設為 27 L/min，上述兩種流量皆以質量流量控制器 (Mass Flow Meters and Mass Flow Controllers, Hampton virginia U.S.A) 調整並控制其流量大小；Nebulizer 於其內裝有 40 mL 之無菌水的情形下，由預設為 10 psi 之壓力閥所調控，其流量預設為 3 L/min。上述三種流量之穩定性測試，係於開啓系統壓縮空氣後，每 10 分鐘以紅外線皂泡計(Gilibrator, Gillian Inc.)分別量測一次，共紀錄 360 分鐘，並進行三次重複測試。

二、暴露艙相對濕度

暴露艙中 RH 穩定性測試，係先將加熱板開啓並轉至 2 刻度，以預熱內裝有 1000 mL 無菌水之加濕器，共計 20 分鐘。接著開啓壓縮空氣，使氣流分別通過乾、溼空氣管線與內裝 40 mL 無菌水之 Nebulizer 後，再將乾、溼空氣管線與 Nebulizer 之流量分別校正為前述之預設流量。其後再以每 10 分鐘記錄一次置於暴露艙中之溫濕度計所測得之 RH 值，共計紀錄 360 分鐘，並進行三次重複測試。

三、生物氣膠產生器(Nebulizer)中 *S. aureus* 菌液濃度

為了解 Nebulizer 中菌液濃度變化情形，本研究於系統開啓壓縮空氣 20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度為 4 log CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液取代無菌水後，重新開啓連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使其產生 *S. aureus* 生物氣膠。自置入 *S. aureus* 菌液於 Nebulizer 後，每隔 30 分鐘即短暫關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，自 Nebulizer 中取出 0.1 mL 菌液，經適當稀釋後於 TSA 進行推盤，總計量測 300 分鐘，且進行三次重複測試。TSA 培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後計數菌落，再由菌落數與其推盤時之稀釋倍數的乘積，推算於不同時間點(Ti)時 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度(C_{susp}, CFU/mL)。Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度計算公式如下：

$$C_{\text{susp}} = (N / 0.1) \times D$$

C_{susp} (CFU/mL) : Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度

N (CFU) : TSA 於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

0.1 (mL) : 因自 Nebulizer 中取出 0.1 mL 菌液推盤，需換算為 1 mL

D : 推盤時之稀釋倍數

四、暴露艙生物氣膠濃度

爲了解於系統運作期間，暴露艙中 *S. aureus* 生物氣膠之濃度變化情形，本研究於系統開啓壓縮空氣 20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度爲 4 log CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液取代無菌水後，重新開啓連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使 *S. aureus* 菌液氣懸，並受到壓縮空氣推送而進入暴露艙中。10 分鐘後，再以內裝有 TSA 之 Andersen 1-STG 採樣器，在流量 28.3 L/min 下採樣 20 分鐘。重複上述空氣採樣步驟至系統總運作時間爲 320 分鐘止，且進行三重複測試。

採樣結束後，將 TSA 培養基置於 37°C 培養箱中培養 24 小時後計數菌落。培養所得之菌落數先以校正表(Positive Hole Correction Table)進行校正，再除以 Andersen 1-STG 採樣流量與採樣時間之乘積值，即可獲得此 20 分鐘空氣採樣下於暴露艙中所得之生物氣膠濃度(C_{air}, CFU/m³)。暴露艙中 *S. aureus* 細菌濃度計算公式如下：

$$C_{air} = N / (L \times T \times 0.001)$$

C_{air} (CFU/m³) : 暴露艙中 *S. aureus* 細菌濃度

N (CFU) : 經校正表(Positive Hole Correction Table)校正過之菌落數

L (L/min) : Andersen 1-STG 採樣流量(28.3 L/min)

T (min) : 空氣採樣時間(20 分鐘)

0.001 : 將空氣採樣之單位體積由 1 L 換算爲 1 m³

五、採樣效能指標(R)

本研究係透過計算各採樣方法所得之採樣效能指標(R)，以比較不同採樣方法間之採樣效能。採樣效能指標(R)計算公式如下：

$$R = C_{air}/C_{susp}$$

C_{air} (CFU/m³) : 以 Andersen 1-STG 於暴露艙採樣 20 分鐘所得之空氣中

S. aureus 濃度

C_{susp} (CFU/mL)：該次空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度之平均值

六、*S. aureus* 粒徑分佈

為瞭解暴露艙中 *S. aureus* 之粒徑分佈，以確認 *S. aureus* 微粒是否出現聚集成團之現象，本研究於系統開啓壓縮空氣 20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度為 7 log CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液取代無菌水後，重新開啓連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使其產生 *S. aureus* 生物氣膠。自置入 *S. aureus* 菌液於 Nebulizer 後，每 5 分鐘以氣動粒徑分析儀(Aerodynamic particle sizer APS, model 3310A, TSI, Inc., St. Paul, MN, USA)於系統暴露艙中偵測一次艙內微粒粒徑，共計偵測 150 分鐘，且進行三重複測試。微粒進入 APS 之流量為 5 L/min，其中包含 inlet flow rate 4 L/min 與 sheath flow rate 1 L/min，微粒粒徑測量範圍設定為 0.453 μm 至 2.943 μm。

APS 所測得之各粒徑區間下之微粒數，則以下述公式求得 *S. aureus* 幾何平均氣動粒徑(GM)以及幾何標準差(GSD)。

$$\text{幾何平均氣動粒徑 (geometric mean diameter, GM)} = \exp \frac{\sum_i n_i \ln d_i}{N}$$

i：粒徑區間數

d_i：第 i 個粒徑區間內之平均粒徑值

n_i：粒徑為 d_i 時之平均微粒數

N：所有粒徑區間之平均微粒數之總和

$$\text{幾何標準差 (geometric standard deviation, GSD)} = \exp \left[\frac{\sum_i n_i (\ln d_i - \ln d_g)^2}{N - 1} \right]^{1/2}$$

d_g：幾何平均氣動粒徑

第七節 *S. aureus* 空氣採樣方法之效能評估

一、以固體培養基為採樣介質之採樣器(Agar-based samplers)效能評估

本研究所評估之 Agar-based sampler 係指 Andersen one stage sampler (Andersen 1-STG) (Andersen Samplers, Ins., Atlanta, GA, USA)。其採樣原理為將生物氣膠引入多孔縫隙並衝擊至培養皿中。Andersen 1-STG 為一階衝擊採樣器，內有 400 個孔徑為 0.25 mm 之孔洞，抽氣流量為 28.3 L/min，截取粒徑(cut-off size)為 0.57 μm [37]。Andersen 1-STG 之流量校正皆於每次進行效能評估實驗前完成，並於採樣實驗結束時再進行流量後測。

(一) 選擇 *S. aureus* 最佳空氣採樣培養基

根據文獻顯示，曾用於 *S. aureus* 空氣採樣之培養基包括非選擇性培養基 Tryptic soy agar[10]與四種選擇性培養基，後者為 Mannitol salt agar[16]、Baird-Park agarose[12]、CHROMagar staph aureus[11]與 Chapman Stone Medium[10]。故本研究將 *S. aureus* 氣懸並收集至五種培養基上以計算其回收率，藉此方法直接反應培養基對空氣中 *S. aureus* 採樣效能的影響。實驗過程如圖 3 所示，在備製與調整 *S. aureus* 菌液濃度後，開啓生物氣膠產生系統之壓縮空氣，使其通過乾、溼空氣管線與內裝有 40 mL 無菌水之 Nebulizer，並校正三種氣體流量至前述之預設流量。20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度為 10^5 CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液取代無菌水後，重新開啓連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使 *S. aureus* 菌液氣懸，並受到壓縮空氣推送而進入暴露艙中，共運作 30 分鐘。此時暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，並自 Nebulizer 中取出 0.1 mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後利用推盤法塗抹至與 Andersen 1-STG 內相同之測試培養基上，作為 Andersen 1-STG 採樣前 Nebulizer 中菌液濃度之測試值。其後重新開啓壓縮空氣，等待 10 分鐘後至暴露艙中生物氣膠分佈均勻，再將置有相同培養基之 Andersen 1-STG 置於暴露艙下方採樣口並進行 6 分鐘空氣採樣。採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1mL 菌液進行同樣培養基之推盤，以獲得空氣採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。被測試之五種培養基係採隨機順序方式置入 Andersen 1-STG 內以進行採樣效能評估，暴露艙內空氣中生物氣膠濃度為 10^2 至 10^3 CFU/ m^3 。每種培養

基均進行四重複測試。

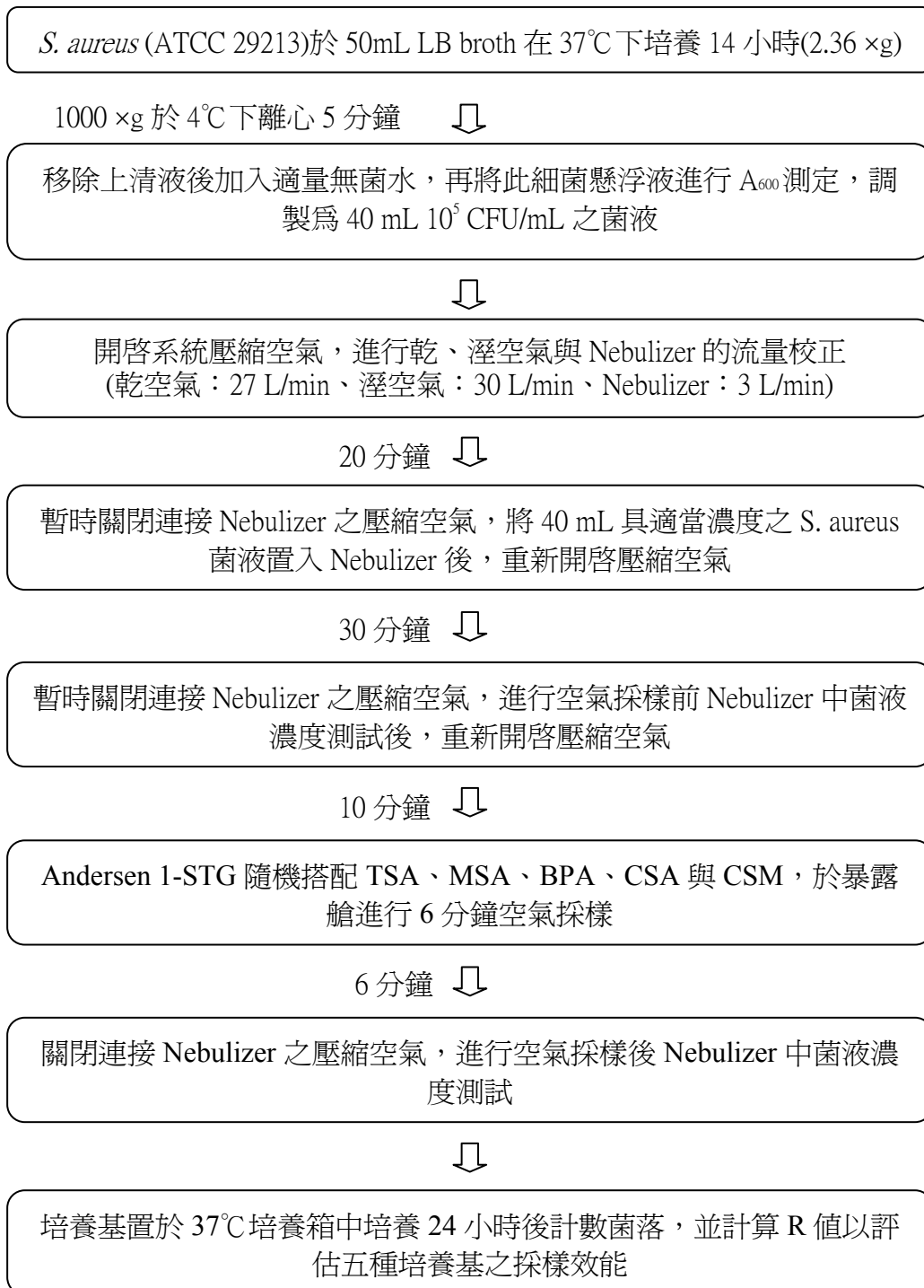


圖 3 選擇 *S. aureus* 最佳空氣採樣培養基之實驗流程

上述培養基皆置於 37°C 培養箱中培養 24 小時並計數菌落。Andersen 1-STG 搭配各種培養基採樣所得之菌落數，經 positive hole correction table、採樣時間與採樣流量的校正，可得到其空氣中 *S. aureus* 採樣濃度(Cair_Andersen 1-STG)。將此濃度除以其相對應採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度(Csusp)之平均值，所得之比值即為該培養基空氣採樣之效能指標值(R, $R = \text{Cair_Andersen 1-STG} / \text{Csusp}$)。R 值愈大表示該採樣方法對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能較佳。有關上述各濃度與 R 值之計算公式如下：

Andersen 1-STG 採樣所得之暴露艙空氣中 *S. aureus* 細菌濃度(Cair_Andersen 1-STG)計算公式如下：

$$\text{Cair_Andersen 1-STG (CFU/m}^3\text{)} = N / (L \times T \times 0.001)$$

N (CFU)：經校正表(Positive Hole Correction Table)校正過之菌落數

L (L/min)：Andersen 1-STG 採樣流量(28.3 L/min)

T (min)：空氣採樣時間

0.001：將空氣採樣之單位體積由 1 L 換算為 1 m³

Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度(Csusp)計算公式如下：

$$\text{Csusp (CFU/mL)} = (N / 0.1) \times D$$

N (CFU)：測試培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

0.1 (mL)：因自 Nebulizer 中取出 0.1 mL 菌液推盤，需換算為 1 mL

D：推盤時之稀釋倍數

採樣效能指標(R)計算公式如下：

$$R = \text{Cair_Andersen 1-STG} / \text{Csusp}$$

Cair_Andersen 1-STG (CFU/m³)：以 Andersen 1-STG 於暴露艙採樣所得之空氣中
S. aureus 濃度

Csusp (CFU/mL)：該次空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度之平均值

以 R 作為比較各類採樣方法之指標曾應用於評估 Anderson one stage sampler 與 cassette 對於 *S. aureus* 之採樣效能研究[11]、評估 Andersen impactor、AGI-30 impinger 等採樣器對病毒性生物氣膠之採樣效能研究[38]，以及評估紫外光和奈米光觸媒對空氣中 *Legionella pneumophila* 之控制效果研究中[37]。

(二) 採樣時間對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響

本實驗流程如圖 4 所示。於系統開啓壓縮空氣後，將通過乾、溼空氣管線與內裝 40 mL 無菌水之 Nebulizer 的氣體流量分別校正為前述之預設流量。20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度介於 5×10^3 至 5×10^4 CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液取代無菌水後，重新開啓連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使 *S. aureus* 菌液氣懸，並受到壓縮空氣推送而進入暴露艙中。30 分鐘後暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，以取出 0.1mL Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後利用推盤法塗抹至與 Andersen 1-STG 內相同之測試培養基上，作為空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度之測試。其後重新開啓壓縮空氣，等待 10 分鐘後暴露艙中生物氣膠分佈均勻，再將內裝有先前實驗評估具較佳採樣效能之培養基的 Andersen 1-STG，置於系統之暴露艙下方採樣口，進行 3、6、15、30 與 60 分鐘等不同採樣時間採樣，暴露艙內空氣中生物氣膠濃度為 10^2 至 10^3 CFU/m³。採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1mL 菌液進行推盤，以與採樣前相同實驗方式測試採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。

上述培養基將置於 37°C 培養箱中培養 24 小時。不同採樣時間之效能指標值 (R) 如前述之方式進行計算，每種採樣時間進行四重複測試。

S. aureus (ATCC 29213) 於 50 mL LB broth 在 37°C 下培養 14 小時(2.36 ×g)

1000 ×g 於 4°C 下離心 5 分鐘 ↓

移除上清液後加入適量無菌水，再將此細菌懸浮液進行 A₆₀₀ 測定，調製為 40 mL 且濃度介於 5×10^3 至 5×10^4 CFU/mL 之菌液

↓

開啓系統壓縮空氣，將乾、溼空氣與 Nebulizer 管線校正為預設流量

20 分鐘 ↓

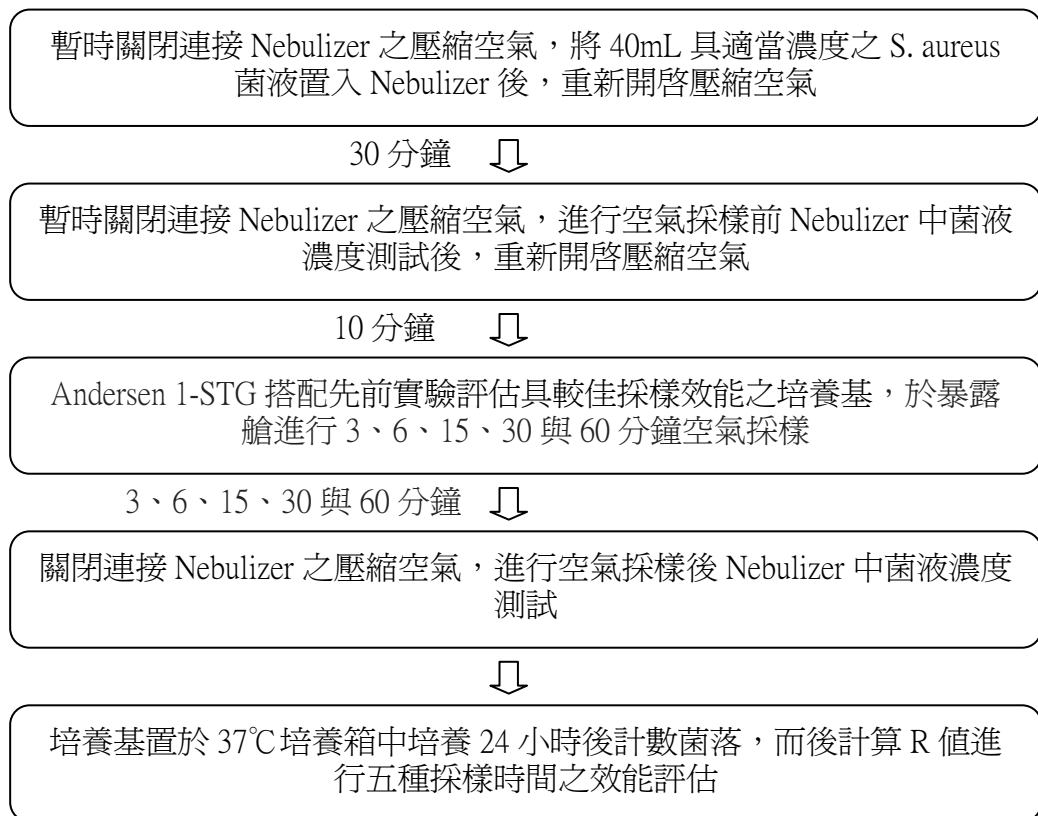


圖 4 探討時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能的影響之實驗流程

二、以收集液為採樣介質之採樣器(Liquid-based samplers)效能評估

本研究評估之 Liquid-based samplers 包括 All glass impinger-30 (AGI-30)與 BioSampler (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA)，AGI-30 與 BioSampler 之 50%截取氣動粒徑(d50)分別為 0.31 μm [39]與 0.3 μm [40]，兩者抽氣流量均為 12.5 L/min。AGI-30 與 BioSampler 之流量校正皆於每次進行採樣評估實驗前完成，並於採樣實驗結束再進行流量後測。

(一) 評估 *S. aureus* 空氣採樣收集液之採樣效能

本研究以生物氣膠文獻中常使用之收集液作為效能評估對象，包括經過濾之無菌水(Filtered deionized water, DW)、磷酸緩衝液(Phosphate buffer saline, PBS)與 Tween 80 mixture (1% peptone, 0.01% Tween 80 and 0.005% antifoam Y-30 in Deionized water, TM)。評估方法如圖 5 之 A 流程所示，在製備與調整 *S. aureus* 菌液濃度後，開啓生物氣膠產生系統之壓縮空氣，並將通過乾、溼空氣管線與內裝 40 mL 無菌水之 Nebulizer 的氣體流量分別校正為前述之預設流量。20 分鐘後，將

連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度為 10^8 CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液取代無菌水後，重新開啓連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使 *S. aureus* 菌液氣懸，並受到壓縮空氣推送而進入暴露艙中，共運作 30 分鐘。此時暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，並自 Nebulizer 中取出 0.1 mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後利用推盤法塗抹至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上，定量空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度。其後重新開啓壓縮空氣，等待 10 分鐘後至暴露艙中生物氣膠分佈均勻，再將內裝有 20 mL 隨機選取之三種收集液的 AGI-30 置於暴露艙下方採樣口，進行 3 分鐘採樣；採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1mL 菌液進行推盤，以與採樣前相同實驗方式定量採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。

採樣結束後即進行量測 AGI-30 內之收集液總體積，且收集液不經過儲放，即取出其中 0.1mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後推盤至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上。

S. aureus (ATCC 29213)於 50mL LB broth 在 37°C 下培養 14 小時(2.36 ×g)

1000 ×g 於 4°C 下離心 5 分鐘 ↓

移除上清液後加入適量無菌水，再將此細菌懸浮液進行 A_{600} 測定，調製為 40 mL 且濃度為 10^8 CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液

↓

開啓系統壓縮空氣，將乾、溼空氣與 Nebulizer 管線校正為預設流量

20 分鐘 ↓

暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，將 40mL 具適當濃度之 *S. aureus* 菌液置入 Nebulizer 後，重新開啓壓縮空氣

30 分鐘 ↓

暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，進行空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度測試後，重新開啓壓縮空氣

10 分鐘 ↓

A. AGI-30 搭配 20mL 之 DW、PBS 或 Tween 80 mixture，於暴露艙進行 3 分鐘空氣採樣

B. AGI-30 與 BioSampler 搭配先前實驗評估具最佳空氣採樣效能之收集液，於暴露艙進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣

Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度(C_{susp})計算公式如下：

$$C_{\text{susp}} (\text{CFU/mL}) = (N / 0.1) \times D$$

N (CFU)：培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

0.1 (mL)：因自 Nebulizer 中取出 0.1 mL 菌液推盤，需換算為 1 mL

D：推盤時之稀釋倍數

採樣效能指標(R)計算公式如下：

$$R = C_{\text{air_AGI-30}} / C_{\text{susp}}$$

C_{air_ AGI-30} (CFU/m³)：以 AGI-30 於暴露艙採樣所得之空氣中 *S. aureus* 濃度

C_{susp} (CFU/mL)：該次空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度之平均值

(二) 時間因子對 AGI-30 與 Biosampler 採樣效能之影響

本實驗流程如圖 5 之 B 流程所示。於系統開啓壓縮空氣後進行流量校正。俟 20 分鐘後，以與前述相同操作方式以 40 mL 且濃度為 10⁸ CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液取代無菌水。30 分鐘後暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，以測試空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度。其後重新開啓壓縮空氣，等待 10 分鐘後再將內裝有 20 mL 先前測試評估具最佳空氣採樣效能之收集液的 AGI-30 或 Biosampler 置於暴露艙下方採樣口，進行 3、6、15、30 與 60 分鐘採樣；採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1 mL 菌液進行推盤，以與採樣前相同實驗方式測試採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。

液體採樣器內之收集液總體積將於採樣結束後進行量測，且收集液不經過儲放步驟，即取出其中 0.1mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後推盤至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上。

上述培養基皆將置於 37°C 培養箱培養 24 小時候計數菌落。AGI-30 與 Biosampler 於不同採樣時間之效能指標值(R)如前述之方式進行計算，每種採樣時間進行四重複測試。

三、以濾紙為採樣介質之採樣器(Filter-based samplers)效能評估

本研究評估之 Filter -based samplers 包括濾匣式採樣器(Cassette) [28, 32, 33]與可攜式個人採樣器(Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler, IOM) [29, 31]，Cassette (搭配 Polycarbonate filters, PC filter)與 IOM (搭配 Gelatin filters)之抽氣流量分別為 4 與 2 L/min。Cassette 與 IOM 之流量校正皆於每次進行採樣評估實驗前完成，並於採樣實驗結束再進行流量後測。

(一) 以濾匣式採樣器(Cassette)評估潤洗液之回收率

本研究以生物氣膠文獻中常使用之潤洗液作為效能評估對象，包括含 0.1% peptone 與 0.01%Tween 80 之 Tween 80 潤洗液、磷酸緩衝液(Phosphate buffer saline, PBS)與經過濾之無菌水(Filtered deionized water, DW)。然經收集液採樣效能評估後，結果顯示 DW 之採樣效能顯著低於 PBS，故本研究僅取 Tween mixture 與 PBS 等兩種潤洗液進行回收率評估。

Cassette (SKC, Eighty Four, PA, USA)所搭配之濾紙為直徑 37-mm、孔徑為 0.2 μm 之 PC filter (Millipore, IsoporeTM Membrane Filters, Bedford, MA, USA)。實驗前 PC filter 與墊片皆需經 121 $^{\circ}\text{C}$ 高溫滅菌 15 分鐘，而 Cassette 則需經環氧乙烷氣體滅菌(Ethylene oxide gas sterilization)[37]。評估潤洗液與不同濾紙震盪時間之回收率方法如圖 6 所示，在製備與調整 *S. aureus* 菌液濃度後，將 PC filter 置於裝有墊片之 Cassette，接著取 0.5 mL 且濃度為 5×10^5 CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液加至 PC filter，此懸浮菌液需推盤至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上，作為 PC filter 於兩種潤洗液中經過不同震盪時間處理後之回收率比較基準。PC filter 於 Cassette 中自然風乾 30 分鐘後，將 PC filter 移至 50mL 離心管並將其剪碎，隨後加入 10mL Tween 80 潤洗液或 PBS 於 50mL 離心管中，各分別震盪 30、60、90 與 120 秒後，取出其中 0.1mL 潤洗液，經適當稀釋後推盤至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上。

上述培養基皆將置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱培養 24 小時候計數菌落。潤洗液推盤所得菌落數，經其稀釋倍數與總體積之校正，可得到 PC filter 於兩種潤洗液中經過不同震盪時間處理後可回收之菌落數(N_{sample})，此菌落數與初始添加菌落數($N_{\text{spike sample}}$)之比值即作為該種潤洗液於特定震盪時間下之回收率(Recovery)，每種震

盪時間皆進行四重複測試。

回收率(Recovery)計算公式如下：

$$\text{Recovery (\%)} = N_{\text{sample}} / N_{\text{spike sample}}$$

$$N_{\text{sample}} : (N / 0.1) \times D \times V$$

N (CFU)：潤洗液推盤後之菌落數

0.1 (mL)：因自潤洗液中取出 0.1 mL 菌液推盤，故需換算為 1 mL

D：將潤洗液推盤時之稀釋倍數

V (mL)：潤洗液之總體積(10.5mL)

$$N_{\text{spike sample}} : (N_0 / 0.1) \times D_0 \times 0.5$$

N₀ (CFU)：初始添加菌液推盤後之菌落數

0.1 (mL)：因自初始添加菌液中取出 0.1 mL 菌液推盤，故需換算為 1 mL

D₀：將初始添加菌液推盤時之稀釋倍數

0.5 (mL)：自初始添加菌液中取出 0.5 mL 菌液加至 PC filter

S. aureus (ATCC 29213)於 50mL LB broth 在 37°C 下培養 14 小時(2.36 ×g)

1000 ×g 於 4°C 下離心 5 分鐘 ↓

移除上清液後加入適量無菌水，再將此細菌懸浮液進行 A600 測定，調製為濃度為 5×10⁵ CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液



取 0.5 mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液加至置於 Cassette 中之 PC filter (此初始添加菌液需以推盤法分析其添加之菌落數)

自然風乾 30 分鐘 ↓

將 PC filter 移至 50mL 離心管並將其剪碎



加入 10mL 潤洗液於 50mL 離心管後，分別震盪 30、60、90 與 120 秒



取出 0.1mL 潤洗液以推盤法測試可回收之菌落數，培養基置於 37°C 培養箱中培養 24 小時後計數菌落，並計算回收率

圖 6 以濾匣式採樣器(Cassette)評估潤洗液之回收率

(二) 以可攜式個人採樣器(Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler, IOM)評估潤洗液之回收率

IOM (SKC, Eighty four, PA, USA)所搭配之濾紙為直徑 25-mm、孔徑為 3 μm 之 Gelatin filter (Sartorius, Goettingen, Germany)。IOM 需經 121°C 高溫滅菌 15 分鐘後方可進行實驗。評估潤洗液與不同濾紙加熱時間之回收率方法如圖 7 所示，在製備與調整 *S. aureus* 菌液濃度後，將 Gelatin filter 置於 50mL 離心管，接著取 0.5 mL 且濃度為 10^5 CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液加至 Gelatin filter，此懸浮菌液需推盤至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上，作為 Gelatin filter 於兩種潤洗液中經過不同加熱時間處理後之回收率比較基準。俟 Gelatin filter 自然風乾 30 分鐘後，加入 10mL Tween 80 潤洗液或 PBS 於 50mL 離心管中，隨後將離心管置於已預熱之 37°C 水浴槽分別加熱 2、5、10、15 與 20 分鐘，最後取出其中 0.1mL 潤洗液，經適當稀釋後推盤至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上。

上述培養基皆將置於 37°C 培養箱培養 24 小時候計數菌落。潤洗液推盤所得菌落數，經其稀釋倍數與總體積之校正，可得到 Gelatin filter 於兩種潤洗液中經過不同加熱時間處理可回收之菌落數(Nsample)，此菌落數與初始添加菌落數(Nspike sample)之比值即作為該種潤洗液於特定加熱時間下之回收率(Recovery)，Recovery 如前述之方式進行計算，每種加熱時間皆進行四重複測試。

S. aureus (ATCC 29213)於 50mL LB broth 在 37°C 下培養 14 小時(2.36 \times g)

1000 \times g 於 4°C 下離心 5 分鐘

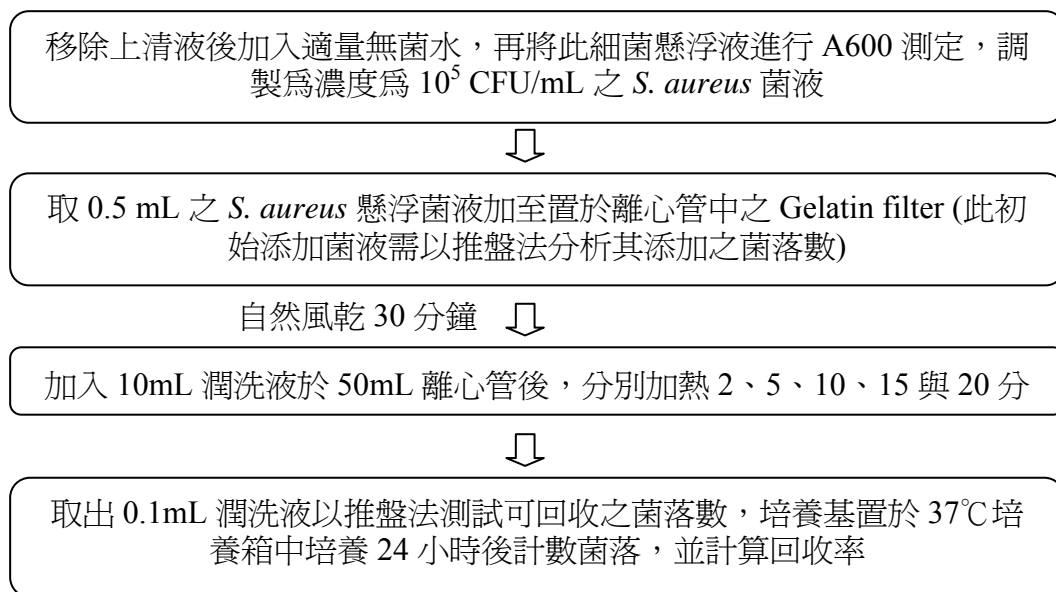


圖 7 以可攜式個人採樣器(Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler, IOM)評估潤洗液之回收率

(三) 時間因子對 Cassette 與 IOM 採樣效能之影響

本實驗流程如圖 8 所示。於系統開啓壓縮空氣後進行流量校正。俟 20 分鐘後，以與前述相同操作方式以 40 mL 且濃度為 10^8 CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液取代無菌水。30 分鐘後暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，以測試空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度。其後重新開啓壓縮空氣，等待 10 分鐘後再將內裝有濾紙之 Cassette 與 IOM 置於暴露艙下方採樣口，進行 30、60 與 270 分鐘採樣；採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1 mL 菌液進行推盤，以與採樣前相同實驗方式測試採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。

兩種採樣器內之濾紙將於採樣結束後取出，其中 Cassette 所搭配之 PC filter 將置於先前實驗評估具較佳回收率之潤洗液，接著以回收率較佳之震盪時間處理後，取出其中 0.1mL 潤洗液，經適當稀釋後推盤至先前實驗評估具最佳採樣效能之培養基上。而 IOM 所搭配之 Gelatin filter 亦將置於先前實驗評估具較佳回收率之潤洗液，後輔以回收率較佳之加熱時間使濾紙溶解，最後取出其中 0.1mL 潤洗液，以與前述相同方法測試潤洗液中細菌濃度。

上述培養基皆將置於 37°C 培養箱培養 24 小時後計數菌落。Cassette 與 IOM

採樣所得之菌落數，經潤洗液稀釋倍數、潤洗液總體積、採樣時間與採樣流量的校正，可得到其空氣中 *S. aureus* 採樣濃度(Cair_Cassette 與 Cair_IOM)。將此濃度除以其相對應採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度(Csusp)之平均值，所得比值即為該次空氣採樣之效能指標值(R, $R = \text{Cair_Cassette} / \text{Csusp}$ 與 $\text{Cair_IOM} / \text{Csusp}$)，每種採樣時間皆進行四重複測試。有關上述各濃度與 R 值之計算公式如下：

Cassette 採樣所得之暴露艙空氣中 *S. aureus* 細菌濃度(Cair_Cassette)計算公式如下：

$$\text{Cair_Cassette (CFU/m}^3) = ((N / 0.1) \times D \times V) / (L \times T \times 0.001)$$

N (CFU)：培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

0.1 (mL)：因自潤洗液中取出 0.1 mL 菌液推盤，需換算為 1 mL

D：將潤洗液推盤時之稀釋倍數

V (mL)：潤洗液之總體積

L (L/min)：Cassette 採樣流量 (4 L/min)

T (min)：空氣採樣時間

0.001：將空氣採樣之單位體積由 1 L 換算為 1 m³

Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度(Csusp)計算公式如下：

$$\text{Csusp (CFU/mL)} = (N / 0.1) \times D$$

N (CFU)：培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

0.1 (mL)：因自 Nebulizer 中取出 0.1 mL 菌液推盤，需換算為 1 mL

D：推盤時之稀釋倍數

採樣效能指標(R)計算公式如下：

$$R = \text{Cair_Cassette} / \text{Csusp}$$

Cair_ Cassette (CFU/m³)：以 Cassette 於暴露艙採樣所得空氣中 *S. aureus* 濃度

Csusp (CFU/mL)：該次空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度之平均值
IOM 於不同採樣時間下之採樣效能(R)計算方法如前述。

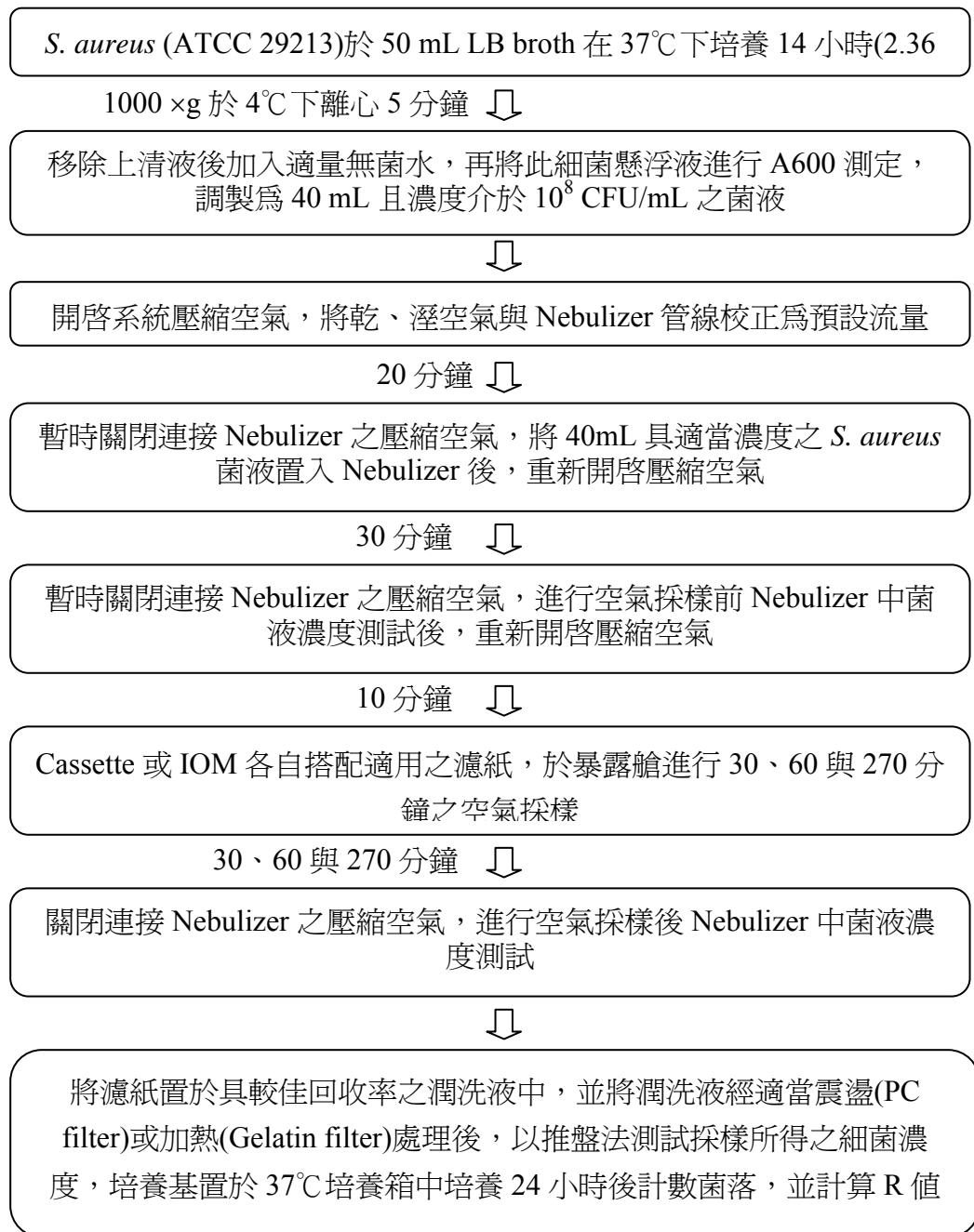


圖 8 時間因子對 Cassette 與 IOM 採樣效能之影響

第八節 資料分析

以 Microsoft office excel 2007 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA)進行資料建檔，並求得各採樣效能指標之平均值 (mean)、標準差 (SD)、變異係數 (CV) 及完成不同採樣器、採樣介質與採樣時間之效能比較製圖。另外以 SAS 9.2 版進行 Kruskal-Wallis test、事後 Scheffé test 等統計檢定，以評估不同採樣方法之採樣效能是否具顯著差異($p < 0.05$ 視為達統計上顯著差異)。

第四章 結果

第一節 *S. aureus* 氣膠產生系統之穩定性測試

一、濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器流量

系統流量測試結果如圖 9 所示，濕空氣流量平均值為 30.12 L/min，變異數 (Coefficient of variation, CV) 為 0.57% (表 5)；乾空氣流量平均值為 27.05 L/min (CV = 0.45%，表 6)；Nebulizer 流量平均值為 3.01 L/min (CV = 0.59%，表 7)。三種流量測試結果之 CV 值皆小於 1%，顯示氣膠產生系統於開啓壓縮空氣後之 360 分鐘運作時間內，濕空氣、乾空氣與 Nebulizer 流量皆呈穩定(圖 10)。

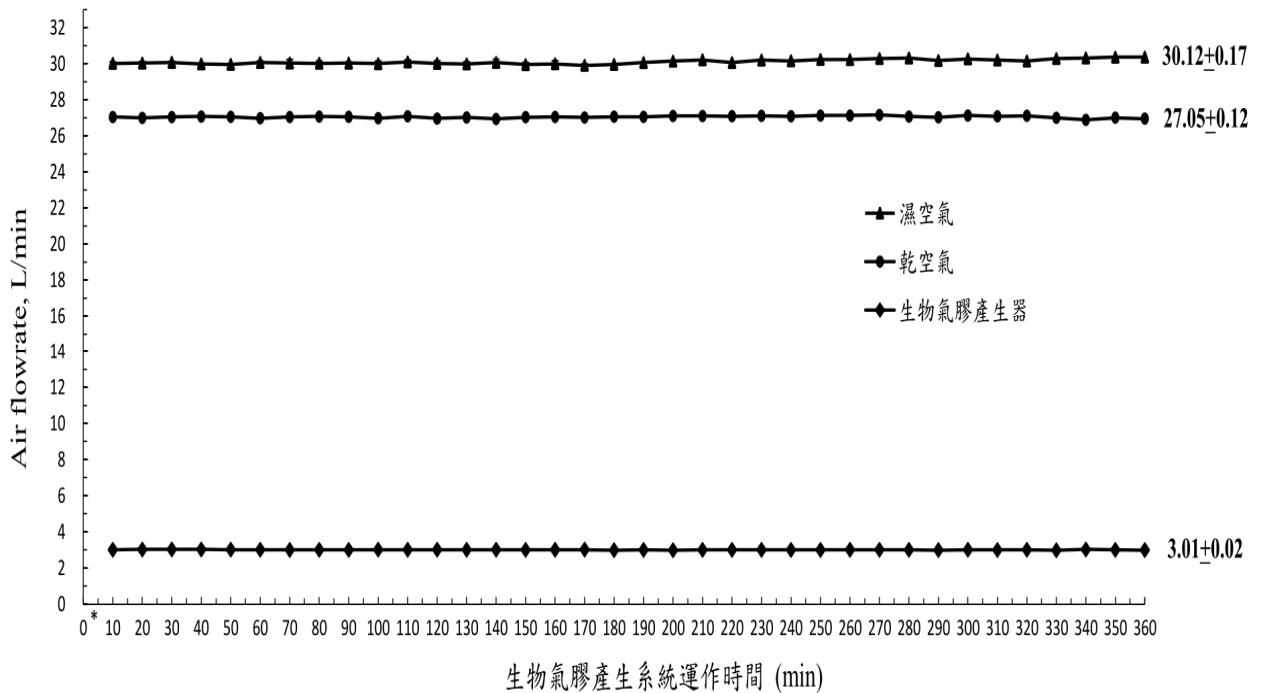


圖 9 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器(Nebulizer)之流量值(*0 min：開啓系統壓縮空氣時間)

表 5 濕空氣流量值(n=3)

系統運作時間 (min)	濕空氣實際流量 (L/min)			Mean	SD	CV%
	Test 1	Test 2	Test 3			
0						
10	29.97	30.08	30.01	30.02	0.06	0.19
20	30.01	30.06	30.03	30.03	0.03	0.08
30	29.98	30.12	30.12	30.07	0.08	0.27
40	29.94	30.05	29.98	29.99	0.06	0.19
50	30.02	30.04	29.83	29.96	0.12	0.39
60	30.19	30.14	29.88	30.07	0.17	0.55
70	29.94	30.09	30.08	30.04	0.08	0.28
80	29.75	30.16	30.16	30.02	0.24	0.79
90	29.86	30.08	30.15	30.03	0.15	0.50
100	30.01	29.95	30.04	30.00	0.05	0.15
110	30.19	30.08	30.02	30.10	0.09	0.29
120	29.89	30.16	30	30.02	0.14	0.45
130	29.94	30.11	29.92	29.99	0.10	0.35
140	30.01	30.12	30.08	30.07	0.06	0.19
150	30.01	30.03	29.8	29.95	0.13	0.43
160	30.13	30.01	29.85	30.00	0.14	0.47
170	29.78	30.12	29.83	29.91	0.18	0.61
180	29.9	29.94	30.04	29.96	0.07	0.24
190	30.04	30.06	30.08	30.06	0.02	0.07
200	30.06	30.23	30.14	30.14	0.09	0.28
210	30.22	30.19	30.24	30.22	0.03	0.08
220	30.03	30.02	30.14	30.06	0.07	0.22
230	30.22	30.32	30.06	30.20	0.13	0.43
240	30.13	30.23	30.12	30.16	0.06	0.20
250	30.28	30.19	30.24	30.24	0.05	0.15
260	30.12	30.3	30.26	30.23	0.09	0.31
270	30.28	30.23	30.35	30.29	0.06	0.20
280	30.25	30.32	30.38	30.32	0.07	0.21
290	30.03	30.38	30.12	30.18	0.18	0.60
300	30.18	30.27	30.36	30.27	0.09	0.30
310	30.24	30.25	30.13	30.21	0.07	0.22
320	30.48	29.88	30.08	30.15	0.31	1.01
330	30.56	30.06	30.24	30.29	0.25	0.84
340	30.35	30.08	30.53	30.32	0.23	0.75
350	30.43	30.02	30.63	30.36	0.31	1.02
360	30.56	30.15	30.38	30.36	0.21	0.68
N(0~360min)	36	36	36	N(0~360min)	108	
Mean	30.11	30.13	30.12	Mean	30.12	
SD	0.20	0.11	0.19	SD	0.17	
CV(%)	0.67	0.38	0.63	CV(%)	0.57	

表 6 乾空氣流量值(n=3)

系統運作時間 (min)	乾空氣實際流量 (L/min)			Mean	SD	CV%
	Test 1	Test 2	Test 3			
0						
10	26.96	27.14	27.02	27.04	0.09	0.34
20	26.89	27.13	26.96	26.99	0.12	0.46
30	26.89	27.13	27.10	27.04	0.13	0.48
40	27.10	27.02	27.08	27.07	0.04	0.15
50	27.10	27.08	26.98	27.05	0.06	0.24
60	26.91	27.00	27.02	26.98	0.06	0.22
70	27.02	27.03	27.08	27.04	0.03	0.12
80	27.09	27.13	26.98	27.07	0.08	0.29
90	27.10	27.02	27.04	27.05	0.04	0.15
100	26.89	27.08	26.96	26.98	0.10	0.36
110	27.10	27.13	27.02	27.08	0.06	0.21
120	26.89	27.02	26.96	26.96	0.07	0.24
130	27.06	27.12	26.87	27.02	0.13	0.48
140	26.89	26.93	26.98	26.93	0.05	0.17
150	26.96	27.13	27.02	27.04	0.09	0.32
160	27.06	27.00	27.08	27.05	0.04	0.15
170	27.03	26.99	27.02	27.01	0.02	0.08
180	27.03	27.15	27.00	27.06	0.08	0.29
190	27.08	26.99	27.08	27.05	0.05	0.19
200	27.12	27.18	27.00	27.10	0.09	0.34
210	27.06	27.21	27.02	27.10	0.10	0.37
220	27.00	27.09	27.18	27.09	0.09	0.33
230	27.00	27.28	27.04	27.11	0.15	0.56
240	27.06	27.13	27.07	27.09	0.04	0.14
250	27.16	27.20	27.00	27.12	0.11	0.39
260	27.00	27.34	27.02	27.12	0.19	0.70
270	27.08	27.22	27.16	27.15	0.07	0.26
280	26.96	27.16	27.08	27.07	0.10	0.37
290	26.87	27.23	26.98	27.03	0.18	0.68
300	27.01	27.29	27.06	27.12	0.15	0.55
310	26.96	27.12	27.16	27.08	0.11	0.39
320	26.89	27.09	27.35	27.11	0.23	0.85
330	26.94	26.72	27.33	27.00	0.31	1.14
340	26.86	27.17	26.62	26.88	0.28	1.03
350	27.01	27.16	26.85	27.01	0.16	0.57
360	27.06	27.16	26.64	26.95	0.28	1.02
N(0~360min)	36	36	36	N(0~360min)	108	
Mean	27.00	27.11	27.02	Mean	27.05	
SD	0.08	0.11	0.14	SD	0.12	
CV(%)	0.31	0.42	0.51	CV(%)	0.45	

表 7 Nebulizer 流量值(n=3)

系統運作時間 (min)	Nebulizer 實際流量 (L/min)			Mean	SD	CV%
	Test 1	Test 2	Test 3			
0						
10	3.00	3.02	3.02	3.01	0.01	0.28
20	3.01	3.04	3.03	3.02	0.02	0.58
30	3.03	3.02	3.04	3.03	0.01	0.39
40	3.02	3.04	3.02	3.03	0.01	0.33
50	3.00	3.02	3.04	3.02	0.02	0.62
60	3.02	3.01	3.01	3.01	0.01	0.21
70	3.00	2.99	3.02	3.00	0.02	0.57
80	3.02	3.00	3.01	3.01	0.01	0.42
90	3.01	2.99	3.02	3.01	0.02	0.55
100	3.03	3.00	3.03	3.02	0.02	0.71
110	3.01	3.01	3.02	3.01	0.01	0.17
120	3.03	3.02	3.01	3.02	0.01	0.40
130	3.02	2.99	3.03	3.01	0.02	0.79
140	3.01	3.03	3.01	3.02	0.01	0.28
150	3.02	2.99	3.02	3.01	0.02	0.60
160	3.01	3.02	3.01	3.01	0.00	0.08
170	3.01	3.03	3.03	3.02	0.01	0.29
180	3.02	2.97	2.98	2.99	0.02	0.83
190	2.99	3.01	3.00	3.00	0.01	0.33
200	2.99	2.99	2.98	2.99	0.01	0.17
210	3.00	3.01	3.00	3.01	0.01	0.24
220	2.98	3.03	3.01	3.01	0.02	0.70
230	2.98	3.02	3.02	3.01	0.02	0.71
240	2.98	3.01	3.01	3.00	0.02	0.53
250	2.98	3.02	3.00	3.00	0.02	0.59
260	3.00	3.02	3.01	3.01	0.01	0.25
270	3.01	3.02	3.01	3.01	0.01	0.29
280	3.00	3.01	3.01	3.01	0.01	0.23
290	3.00	2.99	3.00	3.00	0.01	0.32
300	3.01	3.02	3.02	3.01	0.00	0.16
310	3.01	3.02	2.98	3.00	0.02	0.72
320	3.02	3.05	2.98	3.01	0.03	1.05
330	3.01	2.96	2.98	2.99	0.03	0.87
340	3.00	3.06	3.02	3.03	0.03	0.90
350	3.02	2.97	3.03	3.01	0.03	1.00
360	3.02	2.96	3.01	2.99	0.03	1.01
N(0~360min)	36	36	36	N(0~360min)	108	
Mean	3.01	3.01	3.01	Mean	3.01	
SD	0.01	0.02	0.02	SD	0.02	
CV(%)	0.45	0.74	0.54	CV(%)	0.59	

二、暴露艙相對濕度

暴露艙相對濕度測試結果如表 8 所示，開啓系統壓縮空氣後之 20 分鐘內，三次測試之暴露艙中相對濕度平均值為 51.93%與 54.90%，低於系統原先設定之 55%~60%，且三次批次之 CV 值介於 6.48%至 6.63%。當開啓系統壓縮空氣 30 至 360 分鐘間，暴露艙中 RH 介於 57.37%與 60.33%，其平均值為 59.07%， CV 值為 1.58% (表 8)。由於開啓系統壓縮空氣後之 30 至 360 分鐘，暴露艙中 RH 較為穩定且為系統預設之 RH 範圍(55%~60%) (圖 10)。因此，後續實驗均於系統開啓壓縮空氣 20 分鐘後，其 RH 達預設且穩定階段時，將 *S. aureus* 懸浮菌液置入 Nebulizer 中以進行氣懸。進行空氣採樣時，亦開啓溫濕度計以監測暴露艙中之溫濕度是否偏離預設之 RH 範圍，若 RH 出現偏離情形(低於 55%或高於 60%)，則檢查系統管線是否有氣體洩漏問題，並重新進行各管線之流量校正後才進行空氣採樣。

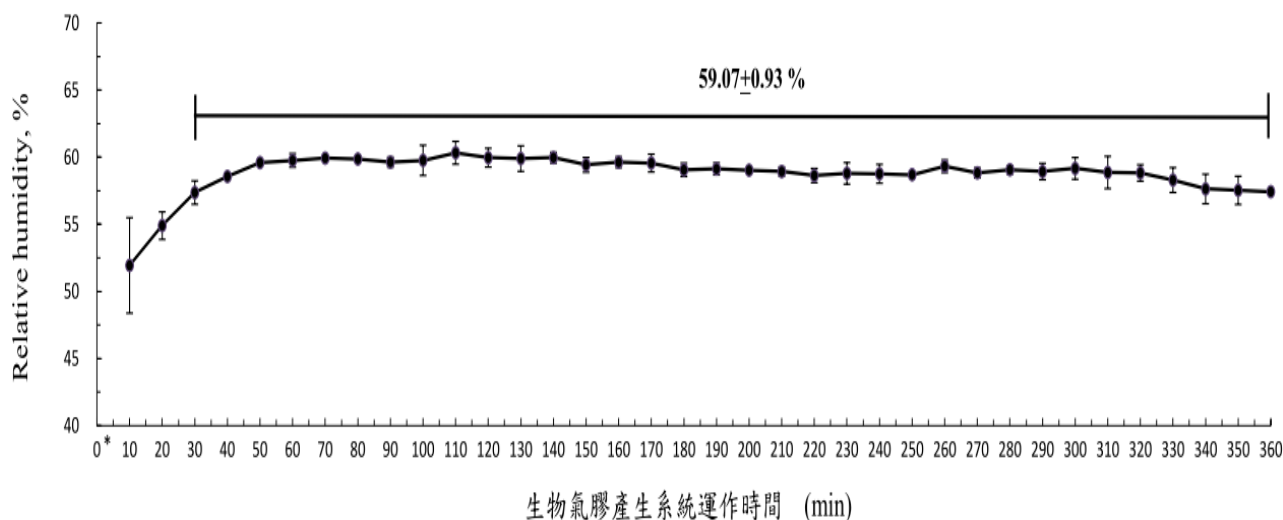


圖 10 暴露艙中相對濕度測試值(*0 min：開啓系統壓縮空氣時間)

表 8 暴露艙中相對濕度測量值(n=3)

系統運作時間 (min)	相對濕度 (RH, %)			Mean	SD	CV (%)
	Test 1	Test 2	Test 3			
0						
10	54.4	48	53.4	51.93	3.44	6.63
20	57.2	50.8	56.7	54.90	3.56	6.48
30	58.5	56.5	57.1	57.37	1.03	1.79
40	59.3	57.6	58.8	58.57	0.87	1.49
50	59.7	59.5	59.6	59.60	0.10	0.17
60	59.8	59.9	59.6	59.77	0.15	0.26
70	59.5	60.5	59.8	59.93	0.51	0.86
80	59.8	60	59.8	59.87	0.12	0.19
90	59.4	59.7	59.8	59.63	0.21	0.35
100	59.5	59.6	60.2	59.77	0.38	0.63
110	59.1	61.3	60.6	60.33	1.12	1.86
120	59.1	60	60.8	59.97	0.85	1.42
130	59.2	59.9	60.6	59.90	0.70	1.17
140	59	60.9	60	59.97	0.95	1.58
150	59.5	59	59.8	59.43	0.40	0.68
160	59.1	60.2	59.6	59.63	0.55	0.92
170	59.2	60	59.5	59.57	0.40	0.68
180	58.9	59.8	58.5	59.07	0.67	1.13
190	59.2	59.6	58.6	59.13	0.50	0.85
200	59	59.5	58.6	59.03	0.45	0.76
210	58.8	59.1	58.9	58.93	0.15	0.26
220	58.6	58.3	59	58.63	0.35	0.60
230	58.6	58.4	59.4	58.80	0.53	0.90
240	58.7	58	59.6	58.77	0.80	1.36
250	58.7	58	59.4	58.70	0.70	1.19
260	59.5	59.2	59.3	59.33	0.15	0.26
270	58.3	59.2	59	58.83	0.47	0.80
280	59.5	58.9	58.8	59.07	0.38	0.64
290	59.3	58.7	58.8	58.93	0.32	0.55
300	59.3	59.7	58.5	59.17	0.61	1.03
310	59.6	59	58	58.87	0.81	1.37
320	58.9	60	57.6	58.83	1.20	2.04
330	58.7	58.6	57.6	58.30	0.61	1.04
340	58.7	57	57.2	57.63	0.93	1.61
350	58.8	56.8	57	57.53	1.10	1.91
360	58.5	56.4	57.4	57.43	1.05	1.83
N(0~360 min)	36	36	36	N(0~360min)	108	
Mean	58.91	58.54	58.80	Mean	58.75	
SD	0.92	2.56	1.41	SD	1.76	
CV(%)	1.57	4.37	2.40	CV(%)	2.99	
N(30~360min)	34	34	34	N(30~360min)	102	
Mean	59.10	59.08	59.02	Mean	59.07	
SD	0.40	1.20	1.03	SD	0.93	
CV(%)	0.69	2.04	1.74	CV(%)	1.58	

三、生物氣膠產生器中 *S. aureus* 菌液濃度

如圖 11 所示，於開啓系統壓縮空氣產生生物氣懸後之 20 分鐘至 320 分鐘間，Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度呈現持續下降現象。當開啓系統運作至 80、230 與 320 分鐘時，Nebulizer 中之菌液濃度為未氣懸前菌液濃度之 52.02%、10.48%與 5.36% (表 9)。

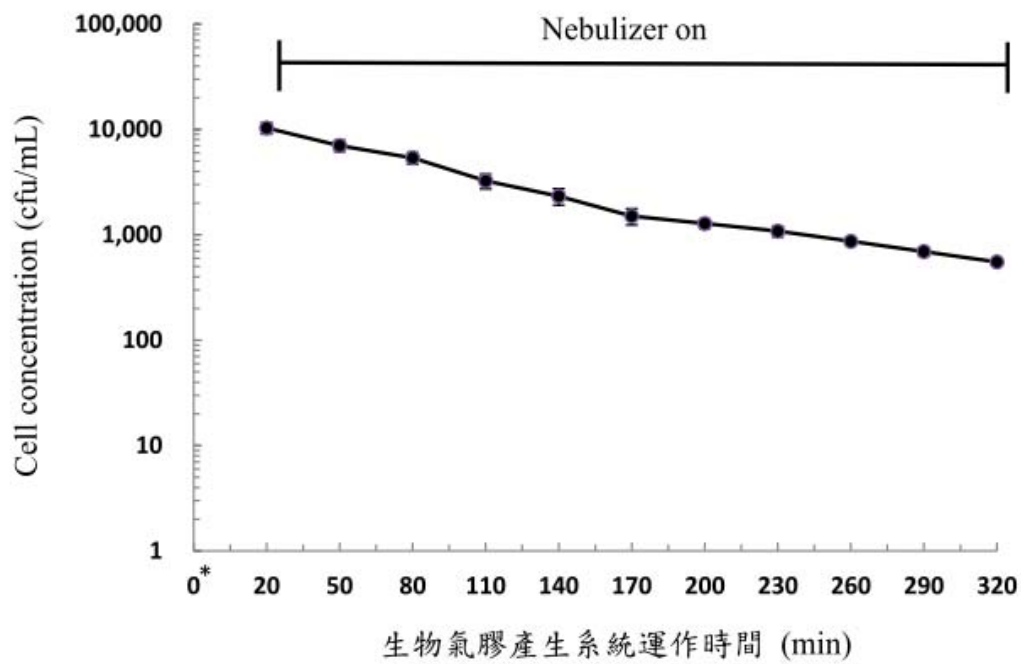


圖 11 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度(*0 min：開啓系統壓縮空氣時間)

表 9 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度(n=3)

系統運作時間 (Ti) (min)*	Nebulizer 中菌液濃度 (C _{susp} (Ti))(cfu/mL)**			Mean	SD	CV (%)	Relative concentration*** (%)
	Test 1	Test 2	Test 3				
0-20	待暴露艙中相對濕度穩定						
20	1.20E+04	8.80E+03	1.01E+04	1.03E+04	1.62E+03	15.71	100.00
50	8.35E+03	5.82E+03	6.90E+03	7.02E+03	1.27E+03	18.11	68.06
80	6.20E+03	4.48E+03	5.43E+03	5.37E+03	8.64E+02	16.10	52.02
110	3.77E+03	2.49E+03	3.48E+03	3.24E+03	6.72E+02	20.72	41.46
140	2.76E+03	1.75E+03	2.48E+03	2.33E+03	5.21E+02	22.36	22.57
170	1.89E+03	1.07E+03	1.57E+03	1.51E+03	4.13E+02	27.46	14.59
200	1.54E+03	1.01E+03	1.29E+03	1.28E+03	2.65E+02	20.75	12.39
230	1.18E+03	9.38E+02	1.13E+03	1.08E+03	1.28E+02	11.84	10.48
260	1.00E+03	7.53E+02	8.45E+02	8.67E+02	1.26E+02	14.58	8.40
290	6.90E+02	6.30E+02	7.58E+02	6.93E+02	6.38E+01	9.21	6.71
320	6.15E+02	5.03E+02	5.40E+02	5.53E+02	5.73E+01	10.37	5.36
N(20~320 min)	11	11	11	N(20~320min)	33		
Mean	3.64E+03	2.57E+03	3.14E+03	Mean	3.11E+03		
SD	3.72E+03	2.69E+03	3.10E+03	SD	3.13E+03		
CV(%)	102.19	104.86	98.90	CV(%)	100.48		

*Ti：開啓系統壓縮空氣使其產生生物氣膠之運作時間

**C_{susp}(Ti)：於系統運作時間 Ti 時 Nebulizer 中之菌液濃度

***以系統運作 20 分鐘時所測得之 Nebulizer 中菌液濃度為基準，其他系統運作時間所測得的 Nebulizer 中菌液濃度與其相除之百分比

四、暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度

如圖 12 顯示，暴露艙空氣中之 *S. aureus* 濃度於系統運作之 40 分鐘至 310 分鐘間呈現下降趨勢。在系統運作至 130、220 與 310 分鐘時，暴露腔內空氣中 *S. aureus* 濃度為系統運作 40 分鐘時 Andersen 1-STG 於暴露艙內第一次採樣所得濃度之 21%、11%與 6% (表 10)。

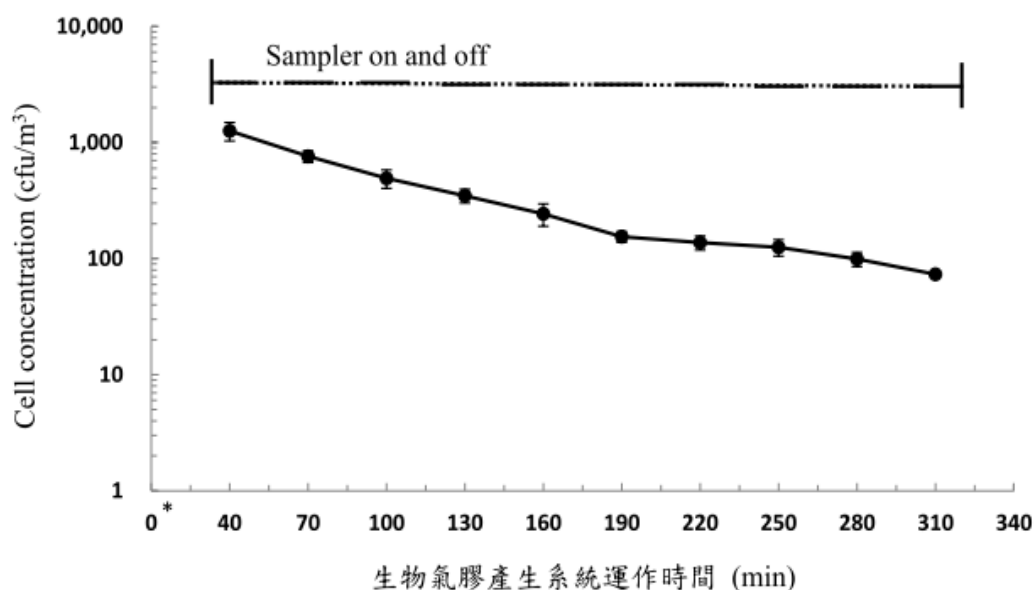


圖 12 暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度

(實線：Sampler on，亦即以 Andersen 1-STG 採樣 20 分鐘；虛線：Sampler off)

表 10 暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度(n=3)

於系統運作中之採 樣時間點 (min)	採樣時間之中間時間 點 (<i>T_m</i>) (min)*	暴露艙空氣中細菌濃度 (<i>C_{air}(T_m)</i>)(cfu/m ³)**			Mean	SD	CV (%)	Relative concentration*** (%)
		Test 1	Test 2	Test 3				
0-20		待暴露艙中相對濕度穩定						
20-30		於 Nebulizer 中添加 <i>S. aureus</i> 菌液後，等待經氣懸之 <i>S. aureus</i> 進入暴露艙至穩定						
30-50	40	1.68E+03	8.58E+02	1.24E+03	1.26E+03	4.13E+02	32.73	100.00
60-80	70	9.66E+02	5.15E+02	8.00E+02	7.60E+02	2.28E+02	29.95	60.31
90-110	100	5.53E+02	3.91E+02	5.30E+02	4.91E+02	8.72E+01	17.75	38.97
120-140	130	4.10E+02	2.47E+02	3.88E+02	3.48E+02	8.82E+01	25.33	21.38
150-170	160	2.88E+02	1.94E+02	2.47E+02	2.43E+02	4.72E+01	19.41	19.29
180-200	190	2.13E+02	1.09E+02	1.42E+02	1.55E+02	5.30E+01	34.31	12.27
210-230	220	1.55E+02	1.23E+02	1.34E+02	1.37E+02	1.64E+01	11.95	10.91
240-260	250	1.45E+02	1.07E+02	1.25E+02	1.25E+02	1.89E+01	15.10	9.95
270-290	280	1.07E+02	7.64E+01	1.15E+02	9.93E+01	2.02E+01	20.39	7.87
300-320	310	7.07E+01	6.08E+01	8.83E+01	7.33E+01	1.39E+01	19.03	5.81
	N (40~310 min)	10	10	10	N(40~310 min)	30		
	Mean	4.59E+02	2.68E+02	3.81E+02	Mean	3.69E+02		
	SD	5.08E+02	2.54E+02	3.80E+02	SD	3.89E+02		
	CV(%)	110.65	94.82	99.60	CV(%)	105.25		

**T_m*：以 Andersen 1-STG 採樣 20 分鐘之中間時間點

***C_{air}(T_m)*：於系統運作時間 *T_m* 之暴露艙空氣中細菌濃度

***以系統運作 30-50 分鐘時 Andersen 1-STG 所得暴露艙中細菌濃度為基準，其他運作時間所得暴露艙中細菌濃度與其相除之百分比

五、採樣效能指標(R)

將 Nebulizer 中菌液濃度(表 9)與暴露艙空氣中細菌濃度(表 10)合併製圖，觀察隨系統運作時間之下降趨勢，結果如圖 13 所示，下降幅度相似。因此進一步計算以 Andersen 1-STG 於暴露艙中採樣 20 分鐘測得之細菌濃度(表 10)與該次空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度(表 9)平均值之比值(R)，其結果如表 11 與圖 14 所示。當系統運作 30 分鐘至 50 分鐘時，三次重複實驗所得之平均 R 值為 0.14，其 CV 為 16.83%；而系統運作 60 至 320 分鐘間所進行的第二次至第十次空氣採樣，三次重複實驗所得之平均 R 值介於 0.11 至 0.13，CV 值則均小於 15%，介於 2.54%至 14.89%，總平均 R 值為 0.12，顯示系統運作時間 60 至 320 分鐘間，其 R 值較為穩定(圖 14)。

總結以上測試結果，顯示生物氣膠產生系統運作 60 分鐘至 320 分鐘期間，為濕空氣、乾空氣與 Nebulizer 流量、暴露艙相對濕度與採樣效能指標 (R) 均達穩定之區段，因此本研究生物氣膠採樣器之採樣效能測試皆於此穩定運作時間範圍內進行。

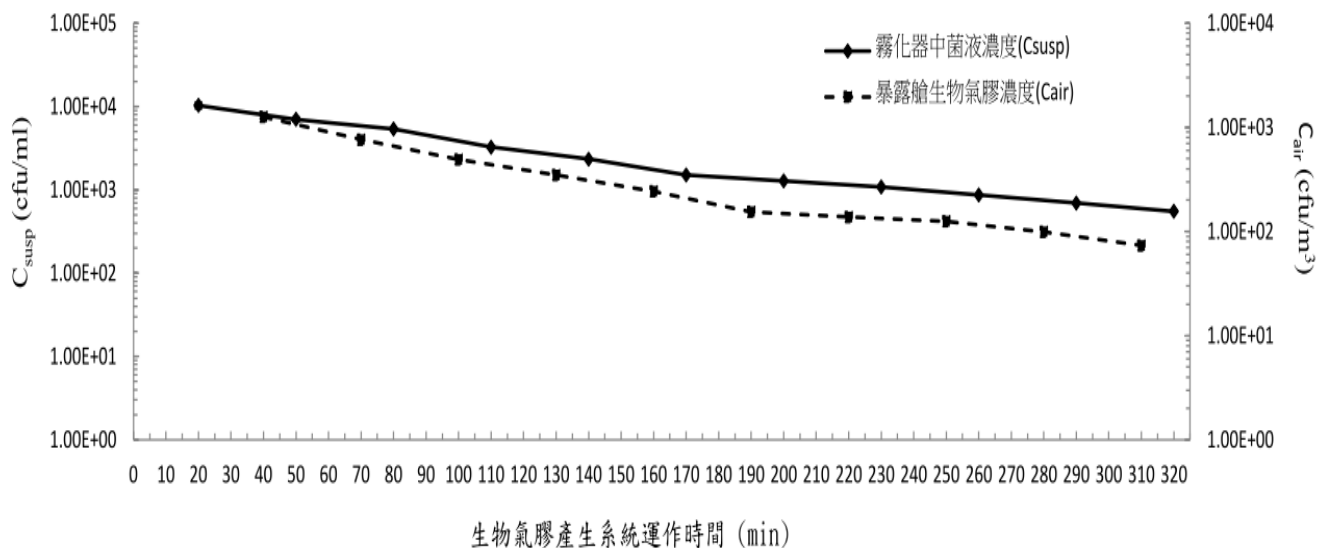


圖 13 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度與暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度隨系統運作下降趨勢圖

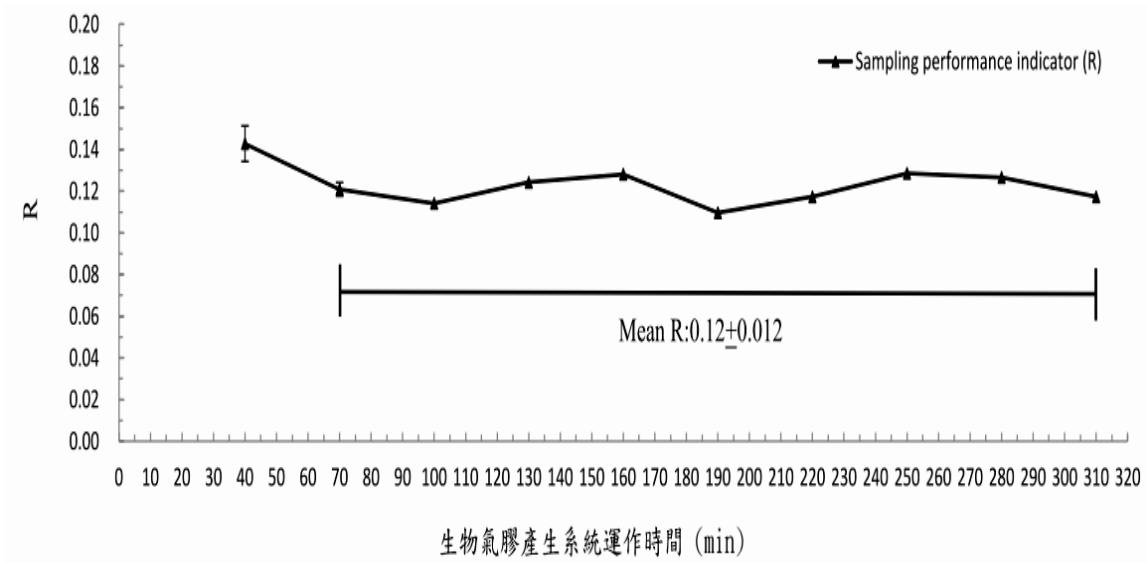


圖 14 採樣效能指標(R)

($R = C_{air} / C_{susp}$ 平均值； C_{air} ：以 Andersen 1-STG 於暴露艙採樣 20 分鐘所得之空氣中 *S. aureus* 濃度； C_{susp} ：該次空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度平均值)

表 11 採樣效能指標(R) (n=3)

於系統運作中之採 樣時間點 (min)	採樣時間之中間時間 點 (min)	採樣效能指標(R)*			Mean	SD	CV (%)	Relative concentration** (%)
		Test 1	Test 2	Test 3				
30-50	40	0.17	0.12	0.15	0.14	0.02	16.83	100.00
60-80	70	0.13	0.10	0.13	0.12	0.02	14.89	84.66
90-110	100	0.11	0.11	0.12	0.11	0.00	3.75	79.92
120-140	130	0.13	0.12	0.13	0.12	0.01	5.55	28.68
150-170	160	0.12	0.14	0.12	0.13	0.01	6.67	89.72
180-200	190	0.12	0.10	0.10	0.11	0.01	11.79	76.80
210-230	220	0.11	0.13	0.11	0.12	0.01	7.14	82.12
240-260	250	0.13	0.13	0.13	0.13	0.00	2.54	90.02
270-290	280	0.13	0.11	0.14	0.13	0.02	12.98	88.64
300-320	310	0.11	0.11	0.14	0.12	0.02	13.95	82.14
	N (40~310 min)	10	10	10	N (40~310 min)	30		
	Mean	0.13	0.12	0.13	Mean	0.12		
	SD	0.02	0.01	0.01	SD	0.01		
	CV(%)	12.65	9.91	11.24	CV(%)	11.72		
	N (70~310 min)	9	9	9	N (70~310 min)	27		
	Mean	0.12	0.12	0.12	Mean	0.12		
	SD	0.009	0.012	0.012	SD	0.012		
	CV%	7.26	10.52	10.52	CV(%)	9.68		

*採樣效能指標(R)：以 Andersen 1-STG 於暴露艙中採樣到之細菌濃度($C_{air}(T_m)$)與該次採樣前後之 Nebulizer 中菌液濃度($C_{susp}(T_i)$)平均之比值。

**以系統運作 30-50 分鐘時 Andersen 1-STG 採樣所得採樣效能指標(R)為基準，其他運作時間採樣所得 R 值與其相除之百分比。

六、*S. aureus* 粒徑分佈

在三種空氣流量(濕空氣、乾空氣與 Nebulizer 流量)、暴露艙相對濕度與採樣效能指標皆達穩定之運作時間區段內(亦即 60 分鐘至 320 分鐘內)，以 APS 每 5 分鐘偵測一次暴露艙空氣中微粒，共偵測 150 分鐘，取得 30 筆數據，並重複測試三次，其粒徑分佈數據如表 12 所示。進一步計算測量數據顯示，*S. aureus* 氣動粒徑之 GM 為 0.77 μm ，GSD 為 1.17 (表 13 與圖 15)，顯示暴露艙空氣中之 *S. aureus* 為單一粒徑分佈

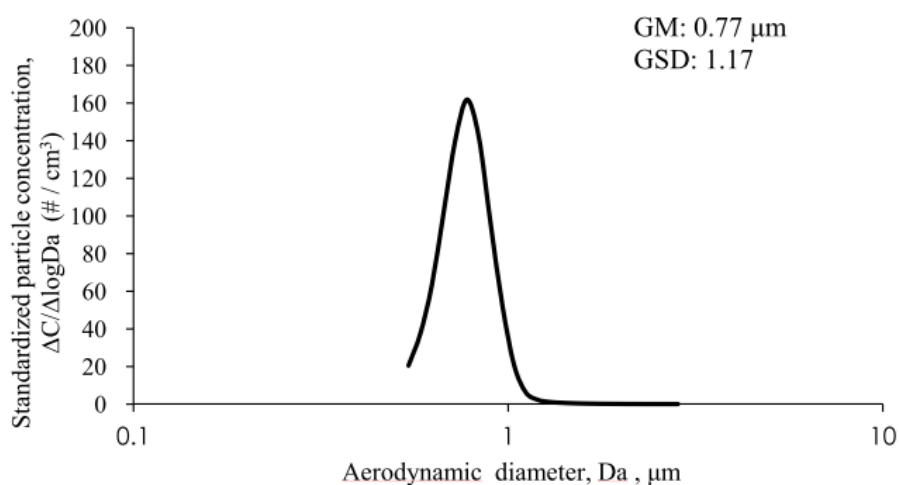


圖 15 以氣動粒徑分析儀 (Aerodynamic particle sizer) 所得暴露艙中 *S. aureus* 之粒徑分佈

表 12 暴露艙中 *S. aureus* 之粒徑分佈(n=3)

Aerodynamic Diameter (μm)	Test 1 _ Conc. ($\Delta\text{C}/\Delta\log\text{Da}$)(N=30)*	Test 2 _ Conc. ($\Delta\text{C}/\Delta\log\text{Da}$)(N=30)	Test 3 _ Conc. ($\Delta\text{C}/\Delta\log\text{Da}$)(N=30)	Concentration ($\#/\text{cm}^3$)		
				Mean	SD	CV%
<0.523	5.69	7.36	12.28	8.44	3.43	40.58
0.542	19.99	20.69	20.58	20.42	0.37	1.82
0.583	37.43	38.37	36.45	37.42	0.96	2.56
0.626	63.20	64.37	62.66	63.41	0.88	1.38
0.673	99.33	101.84	104.74	101.97	2.71	2.66
0.723	135.04	141.11	144.99	140.38	5.01	3.57
0.777	160.45	162.10	162.95	161.83	1.27	0.78
0.835	144.14	131.29	150.54	141.99	9.81	6.91
0.898	102.14	84.29	101.24	95.89	10.05	10.48
0.965	59.81	49.04	49.03	52.63	6.22	11.82
1.037	21.67	18.11	22.72	20.83	2.42	11.60
1.114	6.39	4.53	7.93	6.28	1.70	27.06
1.197	2.52	1.60	2.85	2.33	0.65	27.93
1.286	1.08	0.78	1.55	1.14	0.39	34.24
1.382	0.64	0.50	1.01	0.72	0.26	36.64
1.486	0.41	0.32	0.63	0.45	0.16	35.25
1.596	0.28	0.20	0.38	0.29	0.09	32.26
1.715	0.17	0.14	0.25	0.18	0.06	31.21
1.843	0.11	0.09	0.17	0.12	0.04	34.03
1.981	0.07	0.06	0.11	0.08	0.03	33.14
2.129	0.04	0.04	0.07	0.05	0.02	32.66
2.288	0.01	0.02	0.04	0.03	0.01	50.92
2.458	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	52.07
2.642	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	80.18
2.839	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	45.07

*以 APS 每 5 分鐘偵測一次暴露艙空氣中之微粒粒徑分佈，共偵測 150 分鐘，取得 30 筆數據

表13 暴露艙中 *S. aureus*之粒徑(n=3)

Aerodynamic Diameter(μm)	Test 1_ Mean of raw counts (N=30)	Test 2_ Mean of raw counts (N=30)	Test 3_ Mean of raw counts (N=30)	Mean	SD	CV%	d_i	$n_i \ln d_i$	$\ln d_g$	d_g	$n_i (\ln d_i - \ln d_g)^2$	$\sum n_i (\ln d_i - \ln d_g)^2$	$\ln \sigma_g$	σ_g
<0.523	7108.93	9044.87	15346.57	10500.12	4307.32	41.02								
0.542	3124.23	3160.93	3215.30	3166.82	45.82	1.45	0.55	-1876.02	-0.26	0.77	347.94	3220.45	0.16	1.17
0.583	5849.23	5980.83	5696.03	5842.03	142.54	2.44	0.58	-3142.16			448.01			
0.626	9875.80	10082.20	9790.37	9916.12	150.04	1.51	0.63	-4613.13			413.83			
0.673	15520.33	15955.40	16365.90	15947.21	422.84	2.65	0.67	-6279.75			281.47			
0.723	21099.93	22074.77	22654.40	21943.03	785.56	3.58	0.73	-7056.52			80.73			
0.777	25071.03	25398.40	25460.73	25310.06	209.33	0.83	0.78	-6321.04			3.17			
0.835	22522.83	20552.37	23522.93	22199.38	1511.47	6.81	0.84	-3936.70			155.13			
0.898	15959.00	13134.47	15818.30	14970.59	1591.68	10.63	0.90	-1577.31			362.31			
0.965	9346.03	7668.53	7661.43	8225.33	970.56	11.80	0.97	-271.76			427.17			
1.037	3386.63	2796.83	3549.97	3244.48	396.18	12.21	1.04	125.69			291.36			
1.114	998.47	689.27	1238.67	975.47	275.42	28.23	1.12	107.93			134.68			
1.197	393.77	248.40	446.10	362.76	102.43	28.24	1.20	66.14			71.27			
1.286	168.93	117.30	242.17	176.13	62.74	35.62	1.29	44.78			46.75			
1.382	99.87	76.27	157.53	111.22	41.81	37.59	1.39	36.31			38.37			
1.486	64.27	51.03	97.83	71.04	24.12	33.96	1.49	28.28			30.86			
1.596	43.20	32.37	59.83	45.13	13.84	30.65	1.60	21.23			24.13			
1.715	26.27	21.60	38.90	28.92	8.95	30.95	1.72	15.68			18.65			
1.843	16.73	14.83	25.80	19.12	5.86	30.65	1.85	11.74			14.64			
1.981	11.03	9.40	17.00	12.48	4.00	32.06	1.99	8.56			11.19			
2.129	6.47	6.20	10.33	7.67	2.31	30.17	2.13	5.81			7.96			
2.288	2.30	3.60	6.27	4.06	2.02	49.86	2.29	3.37			4.83			
2.458	1.30	2.10	3.57	2.32	1.15	49.50	2.47	2.10			3.14			
2.642	0.53	1.90	2.87	1.77	1.17	66.36	2.65	1.72			2.69			
2.839	0.33	0.57	0.80	0.57	0.23	41.18	1.32	0.16			0.16			

第二節 以固體培養基為採樣介質之採樣器效能評估

一、選定最佳空氣採樣培養基

本研究評估一種非選擇性(TSA)與四種適用於 *S. aureus* 之選擇性培養基(MSA、BPA、CSA、CSM)對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能。實驗方法係於系統運作時間 60 分鐘至 320 分鐘內，以 Andersen 1-STG 隨機搭配上上述五種培養基，於暴露艙中進行 6 分鐘空氣採樣；並於每種培養基進行空氣採樣前後，分別以推盤法定量 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度，再進一步計算空氣濃度與其空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度平均值的比值 (R)，以此顯示其採樣效能。

結果表 14 所示，Andersen 1-STG 搭配 TSA 採樣之 R 平均值為 0.139 (CV = 16.37%)，而以 Andersen 1-STG 搭配 MSA、BPA、CSA 與 CSM 採樣，其 R 平均值分別為 0.085、0.069、0.066 與 0.061。若將 TSA 之平均 R 值設為 1，MSA 之平均 R 值為 TSA 的 0.61 倍，而 BPA、CSA 與 CSM 之平均 R 值分別為 TSA 的 0.49、0.48 與 0.44 倍。

進一步將五種培養基之 R 值以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 進行統計檢定，結果如表 14 所示，非選擇性培養基 TSA 之 R 值顯著高於 MSA、BPA、CSA 與 CSM 等選擇性培養基之 R 值，而四種選擇性培養基之 R 值彼此間無顯著差異(表 14，Kruskal Wallis test， $p = 0.0092$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)。顯示當五種培養基在相同空氣採樣條件下(相同系統流量、溫濕度環境、生物氣膠採樣器與採樣時間)，TSA 能採集到並培養出來之空氣中 *S. aureus* 顯著多於其他四種選擇性培養基，亦即 TSA 之空氣採樣效能顯著優於其他四種選擇性培養基(圖 16)。

然因非選擇性培養基 TSA 未添加任何抑菌成份，於實際環境中進行空氣採樣時，可能面臨過多雜菌以致干擾目標致病菌之鑑定問題，因此本研究根據上述結果，挑選採樣效能相對較佳之 MSA，與 TSA 一同作為本研究後續評估採樣時間對採樣效能影響的培養基。

表 14 五種 *S. aureus* 培養基之空氣採樣效能(R)與統計檢定結果

培養基	採樣時間 (min)	樣本數(n)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
				Mean	SD	CV (%)				
TSA	6	4	0.172 0.134 0.129 0.121	0.139	0.02	16.37	1.00	13.47	0.0092	A
MSA		4	0.098 0.078 0.074 0.091	0.085	0.01	13.32	0.61			B
BPA		4	0.058 0.078 0.076 0.064	0.069	0.01	14.02	0.49			B
CSA		4	0.064 0.061 0.074 0.066	0.066	0.01	8.47	0.48			
CSM		4	0.067 0.067 0.060 0.052	0.061	0.01	11.44	0.44			B

*設 TSA 之平均 R 值為 1，其他培養基與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

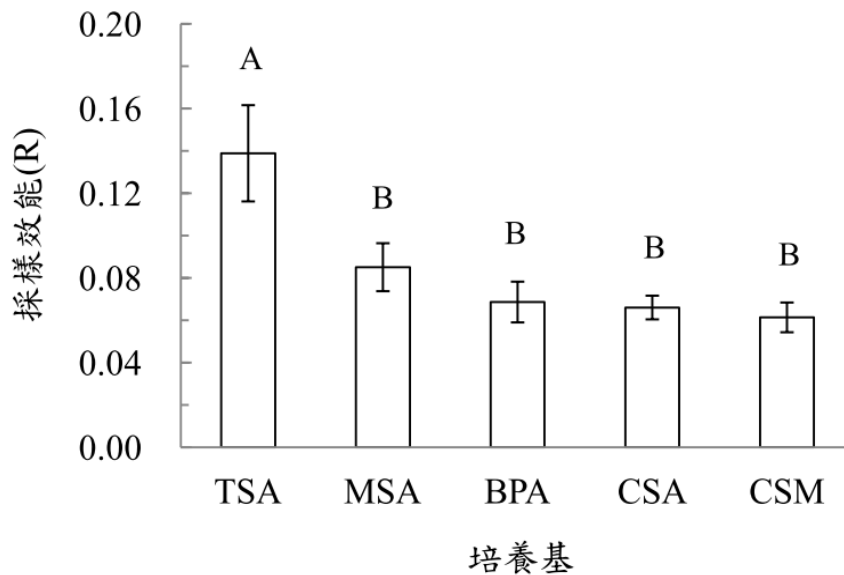


圖 16 五種 *S. aureus* 培養基之空氣採樣效能(R)比較

二、時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響

本實驗係以 Andersen 1-STG 搭配採樣效能較佳之 TSA 與 MSA 兩種培養基，分別進行不同時間之空氣採樣，以了解時間因子對該採樣方法效能之影響。實驗操作上係將內置有 TSA 或 MSA 之 Andersen 1-STG 於系統暴露艙中進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣。且於每次空氣採樣前後，以推盤法定量 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度，進一步計算該採樣時間下所得之採樣效能(R)。

對於非選擇性培養基 TSA(表 15)，在採樣時間為 3、6、15、30 與 60 分鐘時，其 R 平均值分別為 0.179、0.139、0.111、0.130 與 0.132。若以 TSA 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘採樣平均 R 值的 0.77、0.62、0.72 與 0.73 倍(表 15)。進一步以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 對五種採樣時間之 R 值進行統計檢定，結果顯示，採樣 3 分鐘時之 R 值顯著高於採樣 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值(表 15)，Kruskal Wallis test, $p = 0.008$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$ ；而採樣 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值彼此之間則無統計上顯著差異。

至於在選擇性培養基 MSA 部分(表 16)，採樣時間為 6、15、30 與 60 分鐘時，所得之 R 平均值分別為 0.119、0.085、0.084、0.088 與 0.083。若以 MSA 採樣 3 分鐘

之平均 R 值為 1，採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值則分別為 3 分鐘之平均 R 值的 0.72、0.71、0.74 與 0.70 倍(表 16)。進一步進行統計檢定，結果發現採樣時間 3 分鐘之 R 值亦顯著高於採樣時間為 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值(表 16)，Kruskal Wallis test， $p = 0.0447$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)，且採樣時間 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值彼此間亦未達統計上顯著差異。綜合上述結果，以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 或 MSA 進行 *S. aureus* 之空氣採樣時，於採樣 3 分鐘時之採樣效能最佳，而採樣時間 6 至 60 分鐘之採樣效能相近(如圖 17)。

當以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，以了解兩種培養基於 3-60 分鐘採樣時間下之採樣效能是否有達統計上顯著差異。結果如表 17 所示，TSA 之採樣效能顯著高於 MSA。

在進行採樣時間評估時，研究發現其中採樣 60 分鐘之樣本需要培養較長的時間，才能正確評估其採樣效能。如圖 18 顯示之一代表範例，當以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 進行 60 分鐘之空氣採樣後，將培養基置於 37°C 培養箱培養至 18 小時時，其 *S. aureus* 菌落直徑小於 0.05 cm 且菌落數為 115 CFU，此時菌落外觀呈淡黃色；當繼續培養至 24 小時時，培養基上菌落直徑增加至介於 0.05 至 0.1 cm 且菌落數亦增加至 173 CFU，而菌落外觀呈黃色；繼續延長培養時間至 48 小時時，菌落數增加至 288 CFU 且外觀呈金黃色。若培養時間大於 48 小時，則 MSA 上 *S. aureus* 菌落大小、數目或顏色上未再繼續出現明顯變化。以上結果顯示，當以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 進行 60 分鐘空氣採樣後，MSA 需於 37°C 下培養至 48 小時，才可觀察到所有被收集至 MSA 且可被培養出來之 *S. aureus* 菌落數；同樣進行 60 分鐘之空氣採樣之 TSA 則未發現此現象。至於以 TSA 與 MSA 進行 3、6、15 與 30 採樣之樣本，於培養 18 小時後皆已達到最大菌落數，故無須延長培養時間。

表 15 TSA 於不同採樣時間下之採樣效能(R)

培養基	採樣時間 (min)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
			Mean R	SD	CV (%)				
Tryptic soy agar (TSA)	3	0.181	0.179	0.02	12.22	1.00	13.7857	0.008	A
		0.188							
		0.200							
		0.148							
	6	0.172	0.139	0.02	16.30	0.77			B
		0.134							
		0.129							
		0.121							
	15	0.101	0.111	0.01	6.70	0.62			B
		0.114							
		0.119							
		0.111							
	30	0.134	0.130	0.01	5.93	0.72			B
		0.120							
		0.137							
		0.127							
	60	0.142	0.132	0.01	7.60	0.73			B
		0.118							
		0.130							
		0.136							

*以 TSA 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test.

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

表 16 MSA 於不同採樣時間下之採樣效能(R)

培養基	採樣時間 (min)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
			Mean R	SD	CV (%)				
Mannitol salt agar (MSA)	3	0.122	0.119	0.02	12.82	1.00	9.7571	0.0447	A
		0.138							
		0.116							
		0.101							
	6	0.098	0.085	0.01	13.41	0.72			B
		0.078							
		0.074							
		0.091							
	15	0.088	0.084	0.00	4.29	0.71			B
		0.079							
		0.086							
		0.084							
	30	0.098	0.088	0.01	10.74	0.74			B
		0.087							
		0.091							
		0.076							
	60	0.096	0.083	0.01	12.61	0.70			B
		0.071							
		0.083							
		0.082							

*以 MSA 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test.

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

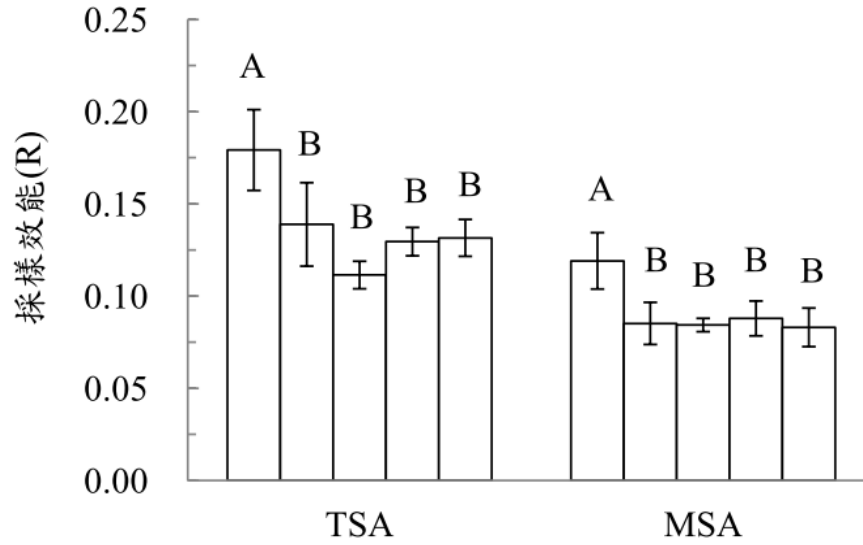


圖 17 Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA，於不同採樣時間下其採樣效能(R)
(*採樣時間，min)

表 17 TSA 與 MSA 之採樣效能(R)統計檢定

培養基	採樣時間 (min)	Mean R	SD	CV (%)	Z value	p value*
TSA	3	0.179	0.02	12.22	4.75	<0.0001
	6	0.139	0.02	16.30		
	15	0.111	0.01	6.70		
	30	0.130	0.01	5.93		
	60	0.132	0.01	7.60		
MSA	3	0.119	0.02	12.82		
	6	0.085	0.01	13.41		
	15	0.084	0.00	4.29		
	30	0.088	0.01	10.74		
	60	0.083	0.01	12.61		

*Wilcoxon rank sum test

培養時間(小時)	18 小時	24 小時	48 小時
菌落數(CFU)	115 CFU	173 CFU	288 CFU
菌落大小(cm)	≤0.05 cm	0.05~0.1 cm	0.05~0.1 cm
菌落顏色	淡黃色	黃色	金黃色

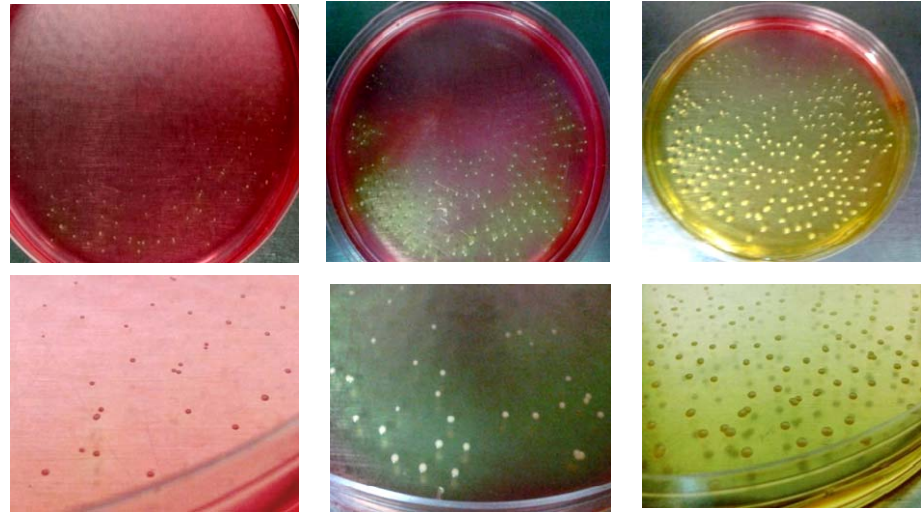


圖 18 以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 採樣 60 分鐘後，將培養基置於 37°C 下培養 18 至 48 小時之 *S. aureus* 菌落圖片

第三節 以收集液為採樣介質之採樣器效能評估

一、評估 *S. aureus* 空氣採樣收集液之採樣效能

本研究評估 DW、PBS 與 Tween 80 mixture 對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能。實驗方法係於系統運作時間 60 分鐘至 320 分鐘內，以 AGI-30 隨機搭配上上述三種收集液，於暴露艙中進行 3 分鐘空氣採樣；並於每種收集液進行空氣採樣前後，分別以推盤法定量 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度，再進一步計算空氣濃度與其空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度平均值的比值(R)，以此顯示其採樣效能。

結果如表 18 所示，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣後以 TSA 推盤，其 R 平均值為 0.142 (CV = 3.85%)，搭配 PBS 與 DW 採樣之 R 平均值則分別為 0.112 與 0.025。若將 Tween 80 mixture 以 TSA 推盤之平均 R 值設為 1，則 PBS 與 DW 之平均 R 值分別為 Tween 80 mixture 的 0.79 與 0.17 倍。若改以選擇性培養基 MSA 推盤時，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣之 R 平均值則為 0.105 (CV = 7.36%)，而搭配 PBS 與 DW 採樣，其 R 平均值則分別為 0.092 與 0.012。以上數據顯示，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，無論搭配何種培養基，其 R 值皆高於 PBS 與 DW。

進一步將三種收集液之 R 值以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 進行統計檢定，發現 Tween 80 mixture 之 R 值顯著高於 PBS 與 DW 之 R 值，而 PBS 之 R 值顯著高於 DW 之 R 值(表 18，Kruskal Wallis test， $p = 0.0002$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)。顯示三種收集液於相同空氣採樣與分析條件下(以同一種液體採樣器進行單一時間之空氣採樣，並以相同培養基進行推盤分析)，Tween 80 mixture 之採樣效能最佳(如圖 19)。另以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，以了解三種收集液於不同培養基推盤分析時，其採樣效能是否有達統計上顯著差異。結果顯示 TSA 之採樣效能顯著高於 MSA ($p = 0.0464$)。

綜合上述結果，可知 Tween 80 mixture 具最佳之採樣效能，PBS 次之，DW 最差。因此，本研究選擇以 Tween 80 mixture 與 PBS 進行後續流失率測試與液體採樣器之效能評估。

表 18 三種收集液之空氣採樣效能(R)與統計檢定結果

收集液	採樣時間 (min)	培養基	樣本數(n)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
					Mean	SD	CV(%)				
Tween 80 mixture	3	TSA	4	0.140	0.142	0.01	3.85	1	17.165	0.0002	A
				0.149							
				0.136							
				0.145							
		MSA	4	0.109	0.105	0.01	7.36	1			
				0.110							
				0.094							
				0.108							
PBS		TSA	4	0.113	0.112	0.01	10.12	0.79			B
				0.109							
				0.128							
				0.100							
		MSA	4	0.097	0.092	0.01	6.79	0.88			
				0.094							
				0.094							
				0.083							
DW		TSA	4	0.024	0.025	0.00	8.40	0.17			C
				0.023							
				0.028							
				0.024							
		MSA	4	0.011	0.012	0.00	10.82	0.11			
				0.010							
				0.013							
				0.012							

*以 Tween 80 mixture 採樣並推盤至 TSA 與 MSA 所得平均 R 值為 1 下，其他收集液以相同培養基推盤所得之相對 R 值

**Kruskal Wallis test

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

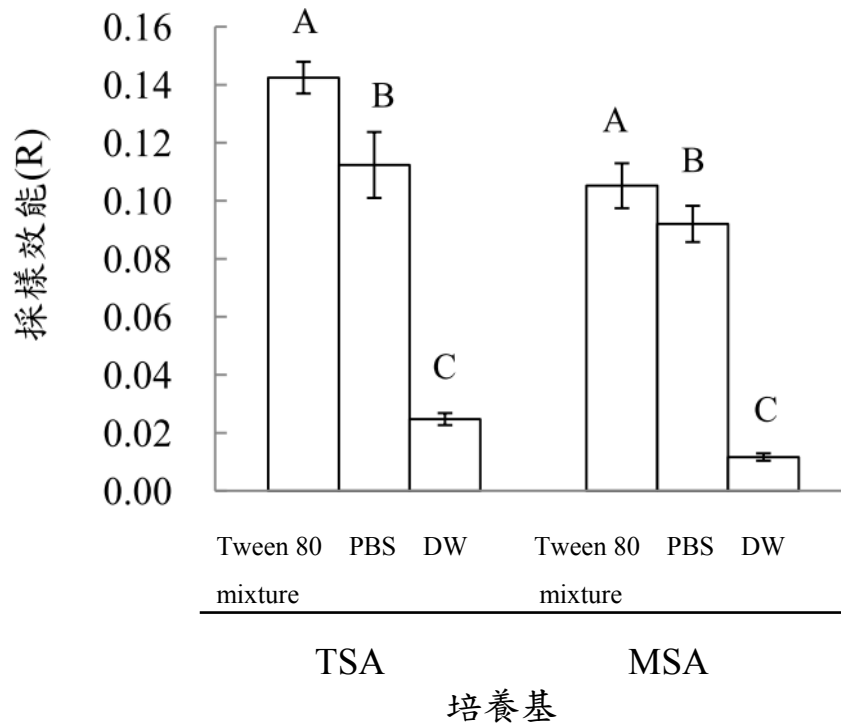


圖 19 三種收集液之空氣採樣效能(R)

二、時間因子對 AGI-30 採樣效能之影響

本實驗係以 AGI-30 搭配採樣效能較佳之 Tween 80 mixture 與 PBS 兩種收集液，進行不同時間之空氣採樣，以了解時間因子對該採樣方法效能之影響。實驗操作上係將內置有 Tween 80 mixture 或 PBS 之 AGI-30 於系統暴露艙中進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣。且於每次空氣採樣前後，以推盤法定量 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度，進一步計算該採樣時間下所得之採樣效能(R)。

以 AGI-30 搭配 PBS 採樣時(圖 20)，生物氣膠產生系統內 Nebulizer 中 *S. aureus* 細菌濃度(C_{susp})隨系統運作時間增長，呈現逐漸下降之趨勢。而 AGI-30 於四重覆之實驗中，皆依序進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣，其於暴露艙採樣所得之空氣中細菌濃度(C_{air})亦出現隨採樣時間與系統運作時間增加而下降之趨勢(圖 20)。顯示當以 AGI-30 搭配 PBS 於暴露艙採樣時，其所得空氣中細菌濃度與 Nebulizer 中細菌濃度之變化趨勢一致。

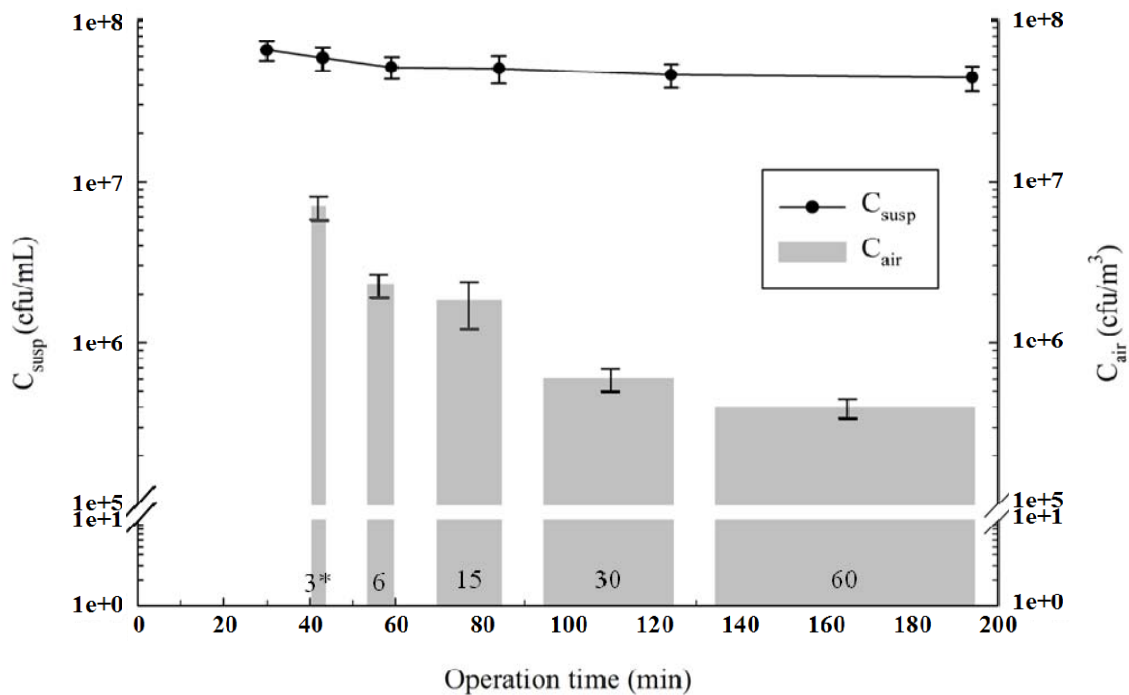


圖 20 以 AGI-30 搭配 PBS 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer(C_{susp})與暴露艙空氣中細菌濃度(C_{air})(*空氣採樣時間(min))

當以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，亦可發現 Nebulizer 中 *S. aureus* 細菌濃度(C_{susp})隨系統運作時間延長而逐漸下降(圖 21)。然有別於 PBS 的結果(圖 20)，當以 AGI-30 結合 Tween 80 mixture 如前述方式進行五種不同時間空氣採樣時，其所得之空氣中細菌濃度(C_{air})隨採樣時間與系統運作時間增長卻出現先升後降之現象，亦即於採樣 6 分鐘所測得之空氣細菌濃度較前次採樣 3 分鐘時為高，且後續採樣 15 與 30 分鐘時所得之空氣中細菌濃度與採樣 3 分鐘之濃度相比，亦無明顯下降現象(圖 21)。此結果顯示，以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於暴露艙採樣時，其收集到之空氣中 *S. aureus* 濃度與 Nebulizer 中細菌濃度之變化趨勢相異。

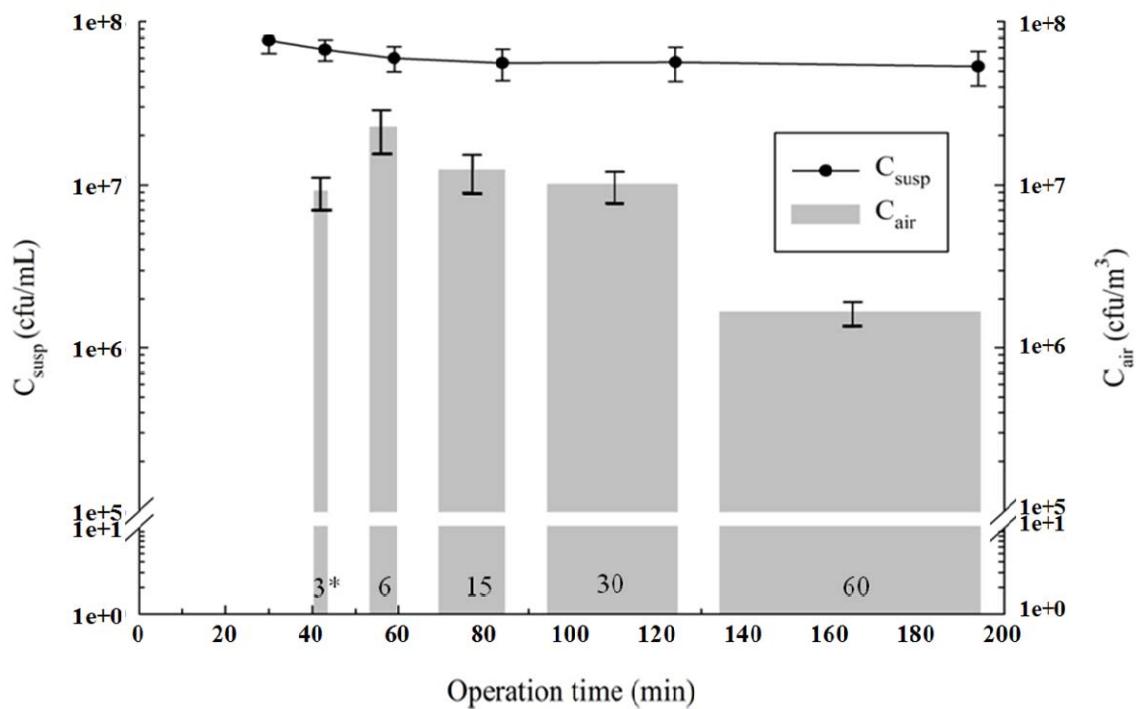


圖 21 以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer(C_{susp}) 與暴露艙空氣中細菌濃度(C_{air})(*空氣採樣時間(min))

進一步將 PBS 與 Tween 80 mixture 採樣所得之空氣中細菌濃度以 Nebulizer 中細菌濃度進行校正，以計算不同採樣時間之 R 值。PBS 之結果如表 19 所示，在採樣 3、6、15、30 與 60 分鐘時，其 R 平均值逐步下降，分別為 0.114、0.042、0.035、0.012 與 0.009。若以採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘採樣平均 R 值的 0.37、0.3、0.11 與 0.08 倍(表 19)。將以上五種採樣時間之 R 值進行統計檢定，結果顯示，採樣 3 分鐘時其 R 值顯著高於採樣 6、15、30 與 60 分鐘時之 R 值，而採樣 6 與 15 分鐘時其 R 值亦顯著高於採樣 30 與 60 分鐘時之 R 值(表 19，Kruskal Wallis test, $p = 0.0014$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)。此結果顯示，以 AGI-30 搭配 PBS 進行 *S. aureus* 3-60 分鐘採樣，其採樣效能隨採樣時間增加而下降(如圖 22)。

表 19 AGI-30 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R)

收集液	採樣時間 (min)	樣本數(n)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
				Mean	SD	CV(%)				
PBS	3	4	0.101	0.114	0.01	11.70	1.00	17.7286	0.0014	A
			0.111							
			0.133							
			0.112							
	6	4	0.034	0.042	0.01	14.72	0.37			B
			0.042							
			0.048							
			0.044							
	15	4	0.042	0.035	0.01	16.07	0.30			B
			0.029							
			0.033							
			0.035							
	30	4	0.012	0.012	0.00	11.38	0.11			C
			0.014							
			0.011							
			0.012							
	60	4	0.008	0.009	0.00	7.16	0.08			C
			0.010							
			0.008							
			0.009							

*以 AGI-30 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

AGI-30 結合 Tween 80 mixture 採樣所得 R 值則如表 20 所示，採樣 3、6、15、30 與 60 分鐘下之 R 平均值分別為 0.124、0.342、0.208、0.175 與 0.03，其中 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘之平均 R 值的 2.75、1.67、1.41 與 0.24 倍(表 20)。統計檢定結果則顯示，採樣 6 分鐘時之 R 值顯著高於採樣 3、15、30 與 60 分鐘時之 R 值，採樣 15 分鐘之 R 值亦顯著高於採樣 3 與 60 分鐘時之 R 值，而採樣 3 與 30 分鐘之 R 值亦顯著高於採樣 60 分鐘之 R 值(表 20，Kruskal Wallis test， $p = 0.0013$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)。顯示當以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 3-60 分鐘採樣時，相較於初始之 3 分鐘採樣結果，其採樣效能隨採樣時間增加，在採樣 6-30 分鐘時出現不降反升現象(如圖 22)，此採樣效能之變化情形與 AGI-30 於暴露艙採樣所得之空氣中細菌濃度變化趨勢(圖 21)一致，然相異於 Nebulizer 中細菌濃度之變化趨勢(圖 21)。Nebulizer 為系統產生生物氣膠之來源，由於系統運作期間 Nebulizer 內菌液濃度隨時間而下降(圖 21)，故由此氣懸而進入暴露艙中之細菌濃度亦應隨之為下降，然以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣暴露艙內細菌時，卻出現其所定量之細菌濃度與採樣效能皆出現不降反升之趨勢(圖 21 與表 20)，此現象是否為 Tween 80 mixture 於採樣過程中導致 *S. aureus* 增生，抑或存在其他原因，值得後續進一步研究加以釐清。

表 20 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能(R)

收集液	採樣時間 (min)	樣本數(n)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
				Mean	SD	CV(%)				
Tween 80 mixture	3	4	0.131	0.124	0.02	14.44	1.00	17.8857	0.0013	C
			0.147							
			0.113							
			0.107							
	6	4	0.404	0.342	0.05	14.22	2.75			A
			0.354							
			0.291							
			0.319							
	15	4	0.205	0.208	0.03	14.13	1.67			B
			0.248							
			0.203							
			0.177							
	30	4	0.167	0.175	0.01	6.19	1.41			B C
			0.181							
			0.188							
			0.166							
	60	4	0.027	0.030	0.00	8.93	0.24			D
			0.029							
			0.030							
			0.033							

*以 AGI-30 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

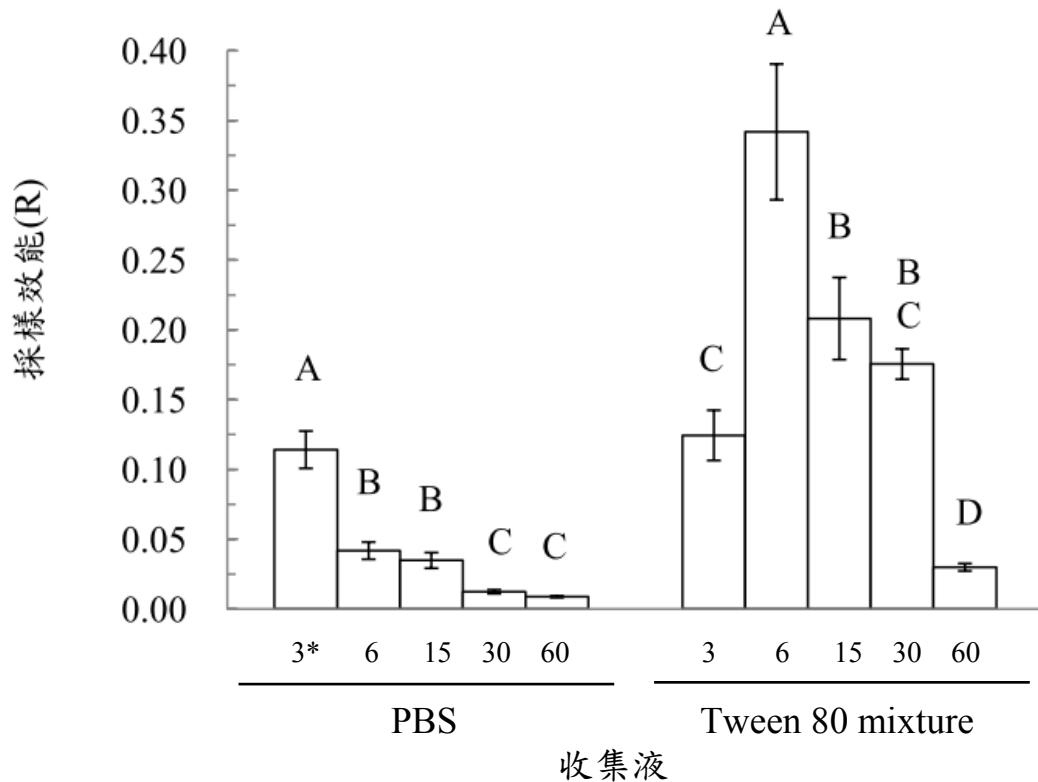


圖 22 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R)
(*採樣時間，min)

三、時間因子對 BioSampler 採樣效能之影響

本實驗操作流程係以 BioSampler 搭配採樣效能較佳之 Tween 80 mixture 與 PBS 兩種收集液，隨機進行不同時間之空氣採樣，以了解時間因子對該採樣方法效能之影響。同樣將 BioSampler 搭配 PBS 與 Tween 80 mixture 採樣所得之空氣中細菌濃度以 Nebulizer 中細菌濃度進行校正，以計算不同採樣時間之 R 值。PBS 之結果如表 21 所示，在採樣時間為 3、6、15、30 與 60 分鐘時，其 R 平均值分別為 0.341、0.266、0.238、0.136 與 0.09，且採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘採樣平均 R 值的 0.78、0.7、0.4 與 0.26 倍(表 21)。統計結果則顯示五種採樣時間之 R 值彼此間皆達統計顯著差異(表 21，Kruskal Wallis test, $p = 0.0011$ ，Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)。由上述可知，BioSampler 搭配 PBS 進行 3-60 分鐘空氣採樣，其採樣效能隨採樣時間增加而下降(如圖 23)。此現象與 AGI-30 搭配 PBS 進行 3-60 分鐘空氣採樣結果(表 19)相似。

表 21 BioSampler 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R)

收集液	採樣時間 (min)	樣本數(n)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
				Mean	SD	CV(%)				
PBS	3	4	0.332	0.341	0.01	2.49	1.00	18.2857	0.0011	A
			0.352							
			0.343							
			0.338							
	6	4	0.263	0.266	0.01	3.59	0.78			B
			0.277							
			0.255							
			0.270							
	15	4	0.230	0.238	0.01	2.87	0.70			C
			0.242							
			0.235							
			0.245							
	30	4	0.131	0.136	0.01	7.61	0.40			D
			0.150							
			0.126							
			0.139							
	60	4	0.089	0.090	0.00	1.46	0.26			E
			0.091							
			0.088							
			0.091							

*以 BioSampler 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

當以 Tween 80 mixture 搭配 BioSampler 進行 3、6、15、30 與 60 分鐘時，所得之 R 平均值分別為 0.326、0.376、0.369、0.294 與 0.175，其中 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘之 R 值的 1.16、1.13、0.9 與 0.54 倍(表 22)。統計檢定發現，採樣 6 分鐘時其 R 值顯著高於採樣 3、30 與 60 分鐘時之 R 值，採樣 15 分鐘時其 R 值亦顯著高於採樣 30 與 60 分鐘時之 R 值，而採樣 3 與 30 分鐘時其 R 值皆顯著高於採樣 60 分鐘時之 R 值(表 22，Kruskal Wallis test， $p = 0.0018$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)。顯示以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 進行 3-60 分鐘空氣採樣時，採樣 6 分鐘之採樣效能顯著優於 3 分鐘，而採樣時間大於 15 分鐘時，其採樣效能則隨採樣時間增加而下降(如圖 23)，採樣效能變化趨勢近似於 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時之結果(如圖 22)。與表 20 相比，發現當以 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，6 分鐘之採樣效能皆顯著高於 3 分鐘之 R 值，且為 3-60 分鐘採樣下之最高者，之後即隨採樣時間增長而逐步下降；然即便如此，其 15 分鐘之 R 平均值均高於初始之 3 分鐘採樣結果。

表 22 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能(R)

收集液	採樣時間 (min)	樣本數(n)	R	R			Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***
				Mean	SD	CV(%)				
Tween 80 mixture	3	4	0.308	0.326	0.01	4.52	1.00	17.1714	0.0018	BC
			0.344							
			0.324							
			0.327							
	6	4	0.421	0.376	0.03	8.16	1.16			A
			0.354							
			0.357							
			0.373							
	15	4	0.393	0.369	0.02	4.76	1.13			AB
			0.371							
			0.353							
			0.360							
	30	4	0.288	0.294	0.02	7.48	0.90			C
			0.308							
			0.266							
			0.315							
	60	4	0.187	0.175	0.01	6.14	0.54			D
			0.178							
			0.172							
			0.162							

*以 BioSampler 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

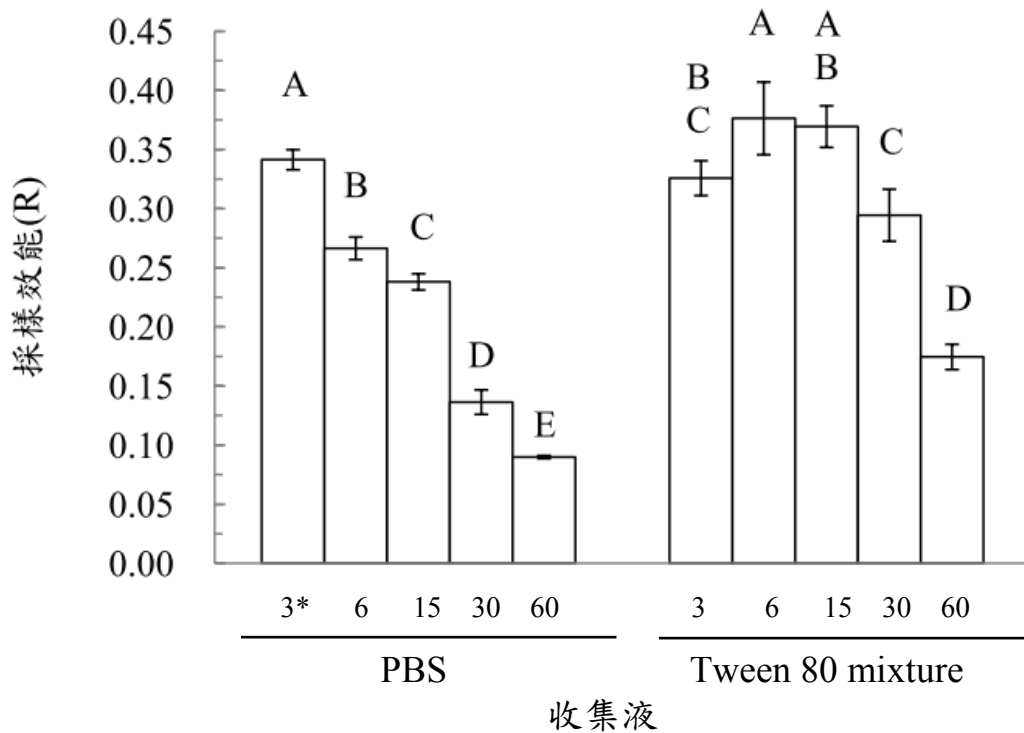


圖 23 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能(R)
(*採樣時間，min)

四、以收集液為採樣介質之生物氣膠採樣方法比較

(一) BioSampler 與 AGI-30 之採樣效能

以 Wilcoxon rank sum test 對所有以 BioSampler 與 AGI-30 採樣所得之 80 筆 R 值(表 19-22)進行統計檢定，以了解兩種採樣器搭配不同收集液於 3-60 分鐘採樣時間下之採樣效能是否具統計上顯著差異。結果顯示，BioSampler 之採樣效能顯著高於 AGI-30($p < 0.0001$)。

(二) Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能

同樣以 Wilcoxon rank sum test 對所有以 Tween 80 mixture 與 PBS 採樣所得之 R 值進行統計檢定，以了解兩種收集液於不同採樣器中進行 3-60 分鐘之空氣採樣時其採樣效能是否具統計上顯著差異。結果顯示 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著高於 PBS($p < 0.0001$)。

表 23 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能(R)統計檢定

採樣器	收集液	採樣時間 (min)	樣本數(n)	Mean R	SD	CV(%)	χ^2 value	<i>p</i> value*	Scheffé test**
BioSampler	Tween 80 mixture	3	4	0.326	0.01	4.52	45.9987	<0.0001	A
		6	4	0.376	0.03	8.16			
		15	4	0.369	0.02	4.76			
		30	4	0.294	0.02	7.48			
		60	4	0.175	0.01	6.14			
	PBS	3	4	0.341	0.01	2.49			B
		6	4	0.266	0.01	3.59			
		15	4	0.238	0.01	2.87			
		30	4	0.136	0.01	7.61			
		60	4	0.090	0.00	1.46			
AGI-30	Tween 80 mixture	3	4	0.124	0.02	14.44			B
		6	4	0.342	0.05	14.22			
		15	4	0.208	0.03	14.13			
		30	4	0.175	0.01	6.19			
		60	4	0.030	0.00	8.93			
	PBS	3	4	0.114	0.01	11.70			C
		6	4	0.042	0.01	14.72			
		15	4	0.035	0.01	16.07			
		30	4	0.012	0.00	11.38			
		60	4	0.009	0.00	7.16			

*Kruskal Wallis test.

**Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

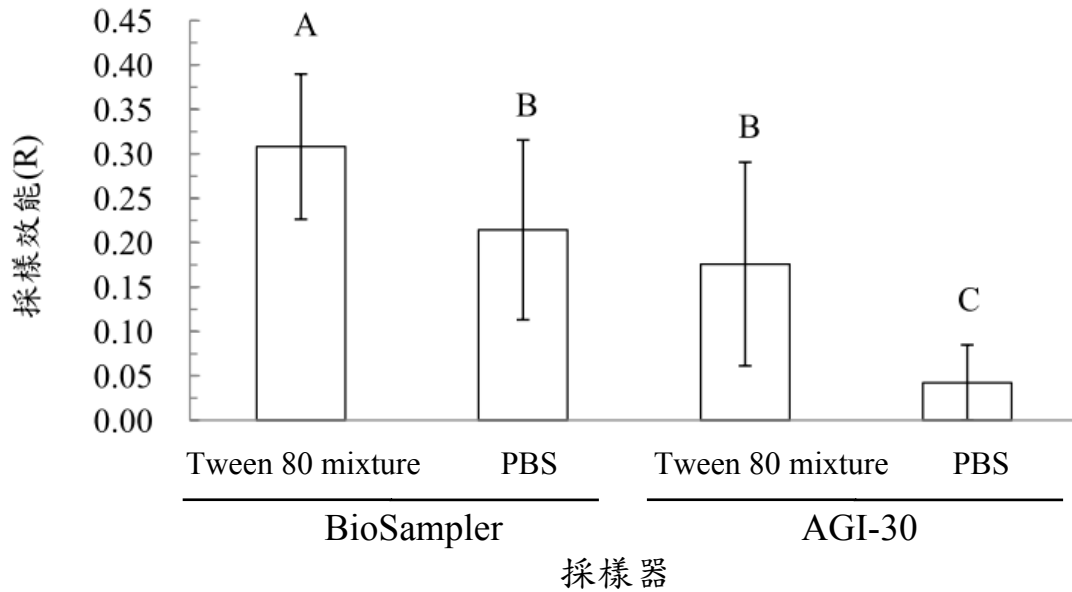


圖 24 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能(R)

第四節 以濾紙為採樣介質之採樣器效能評估

一、以 Cassette 評估潤洗液之回收率

本實驗以 Cassette 搭配 PC filter 評估 Tween 80 潤洗液與 PBS 對於 *S. aureus* 之回收率。測試方法係取 *S. aureus* 菌液加至置於 Cassette 之 PC filter，待自然風乾 30 分鐘後，將 PC filter 移至離心管剪碎，並加入 Tween 80 潤洗液或 PBS 分別震盪 30、60、90 與 120 秒，最後以推盤法定量潤洗液中 *S. aureus* 菌落數，此菌落數與初始添加菌落數之比值即為兩種潤洗液於特定震盪時間下之回收率(Recovery, %)。

結果如表 24 所示，以 TSA 推盤之組別而言，當震盪時間由 30 秒延長至 120 秒時，Tween 80 潤洗液與 PBS 之回收率分別自 19.70% (CV = 19.89%) 上升至 48.67% (CV = 4.48%) 與 8.17% (CV = 11.61%) 上升至 21.28% (CV = 13.93%)，亦即兩種潤洗液之回收率皆隨濾紙震盪時間增加而上升。另以 MSA 推盤之組別而言，Tween 80 潤洗液之回收率則隨震盪時間延長(30-120 秒)而自 20.56% (CV = 18.97%) 上升至 41.56 (CV = 2.68%)，PBS 之回收率則自 6.06% (CV = 17.74%) 上升至 18.90 (CV = 13.96%)，回收率變化趨勢與 TSA 推盤之組別相同。

進一步將兩種潤洗液分別以兩種培養基推盤之回收率以 Kruskal-Wallis test 與事

後 Scheffé test 進行統計檢定，發現當以 TSA 推盤，PC filter 於兩種潤洗液中震盪 90 與 120 秒時，*S. aureus* 之回收率彼此間無統計上顯著差異，然顯著高於震盪 30 秒時之回收率(表 24，Kruskal Wallis test，Tween 80 潤洗液：0.0051，PBS：0.0045，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)；另以 MSA 推盤時，*S. aureus* 之回收率於震盪 90 與 120 秒時彼此間亦無統計上顯著差異，然顯著高於震盪 30 與 60 秒時之回收率(表 24，Kruskal Wallis test，Tween 80 潤洗液：0.0062，PBS：0.0051，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)。最後以 Wilcoxon rank sum test 對濾紙於 Tween 80 潤洗液與 PBS 中以四種震盪時間處理後之回收率進行統計檢定，結果顯示，Tween 80 潤洗液之回收率顯著高於 PBS (表 25， $p < 0.0001$)。另以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，以了解兩種潤洗液於不同培養基推盤分析時，其回收率是否有達統計上顯著差異，結果顯示 TSA 與 MSA 彼此間無統計上顯著差異($p = 0.4481$)。

由上述說明可知，以 Cassette 搭配 PC filter 採樣時，使用 Tween 80 潤洗液收集濾紙上之 *S. aureus* 具較佳回收率，而濾紙於 Tween 80 潤洗液中震盪 90 與 120 秒時之回收率彼此間雖無統計上顯著差異(表 24)，然進一步觀察數據可發現以 TSA 推盤之組別而言，震盪時間自 90 秒延長至 120 秒時，回收率自 46.11%微幅上升至 48.67% (表 24)，故本研究認為將 PC filter 置於 Tween 80 潤洗液中震盪 120 秒較為適當，以此作為 Cassette 搭配 PC filter 採樣完成後之樣本處理方法。

表 24 以 Cassette 評估 PC filter 於 Tween 80 潤洗液與 PBS 中經過不同震盪時間處理之回收率(%)統計檢定

培養基	潤洗液	震盪時間(s)	樣本數(n)	平均回收率(%)	SD	CV(%)	χ^2 value	<i>p</i> value*	Scheffé test**		
TSA	Tween 80 潤洗液	30	4	19.70	0.04	19.89	12.7941	0.0051	C		
		60	4	30.09	0.04	14.77			B		
		90	4	46.11	0.06	12.09			A		
		120	4	48.67	0.02	4.48			A		
	PBS	30	4	8.17	0.01	11.61			13.0588	0.0045	C
		60	4	14.27	0.02	10.54					B
		90	4	18.96	0.03	13.82					AB
		120	4	21.28	0.03	13.93					A
MSA	Tween 80 潤洗液	30	4	20.56	0.04	18.97	12.3750	0.0062	B		
		60	4	27.76	0.04	15.31			B		
		90	4	41.91	0.06	13.66			A		
		120	4	41.56	0.01	2.68			A		
	PBS	30	4	6.06	0.01	17.74			12.7941	0.0051	B
		60	4	10.99	0.02	19.51					B
		90	4	18.06	0.03	15.31					A
		120	4	18.90	0.03	13.96					A

*Kruskal Wallis test.

**Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

表 25 Tween 80 潤洗液與 PBS 之回收率(%)統計檢定

潤洗液	震盪時間 (s)	樣本數(n)	平均回收 率(%)	SD	CV(%)	Z value	p value*
Tween 80 潤洗液	30	4	20.13	0.04	18.12	6.0489	<0.0001
	60	4	28.92	0.04	14.57		
	90	4	44.01	0.06	12.94		
	120	4	45.11	0.04	9.14		
PBS	30	4	7.11	0.01	20.66		
	60	4	12.63	0.02	19.39		
	90	4	18.51	0.03	13.72		
	120	4	20.09	0.03	14.40		

*Wilcoxon rank sum test

二、時間因子對 Cassette 採樣效能之影響

本實驗係以 Cassette 搭配 PC filter 進行不同時間之空氣採樣，以了解時間因子對該採樣方法效能之影響。實驗方法係將內置有 PC filter 之 Cassette 於系統暴露艙中進行 30、60 與 270 分鐘之空氣採樣，採樣完成後將 PC filter 剪碎並置於回收率較佳之 Tween 80 潤洗液中，將潤洗液震盪 120 秒以收集濾紙上之 *S. aureus* 後，以推盤法定量潤洗液中 *S. aureus* 細菌濃度，每次空氣採樣前後，亦以推盤法定量 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度，進一步計算該採樣時間下所得之採樣效能(R)。

Cassette 搭配 PC filter 採樣所得 R 值則如表 26 所示，以 TSA 與 MSA 推盤之組別於採樣時間 30、60 與 270 分鐘下之 R 平均值分別為 0.0037、0.0034、0.002 與 0.0034、0.0031、0.0017；其中採樣時間 60 與 270 分鐘之平均 R 值分別為 30 分鐘之平均 R 值的 0.93、0.54 倍(以 TSA 推盤)與 0.91、0.51 倍(以 MSA 推盤) (表 26)，亦即採樣效能皆隨採樣時間延長而下降。統計檢定結果則顯示，無論以 TSA 或 MSA 推盤，於採樣 30 與 60 分鐘時之 R 值皆顯著高於採樣 270 分鐘時之 R 值(表 26，Kruskal Wallis test，TSA： $p = 0.0183$ ，MSA： $p = 0.0125$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)，而採樣 30 與 60 分鐘之 R 值彼此間則無統計上顯著差異顯示。另以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，以了解 Cassette 搭配 PC filter 進行不

同時間之空氣採樣後，將其潤洗液於不同培養基推盤分析時，其採樣效能是否有達統計上顯著差異，結果顯示 TSA 與 MSA 彼此間無統計上顯著差異($p = 0.1749$)。由上述說明可知，Cassette 搭配 PC filter 之採樣效能隨採樣時間延長而顯著下降(圖 25)。

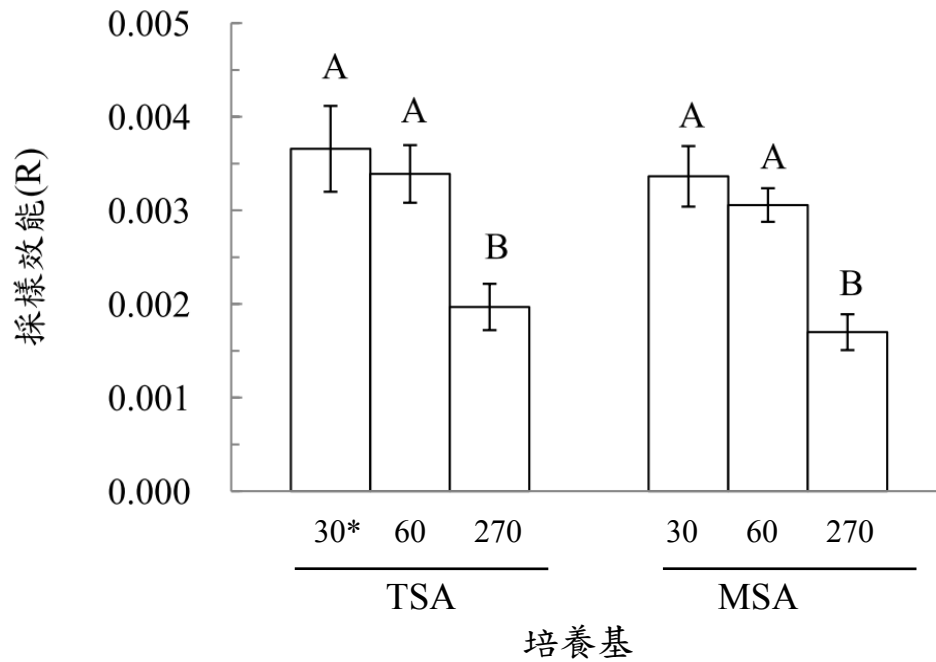


圖 25 Cassette 搭配 PC filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R)
(*採樣時間，min)

表 26 Cassette 搭配 PC filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R)統計檢定

採樣器	培養基	採樣時間 (min)	R	Mean R	SD	CV(%)	Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***	
Cassette	TSA	30	0.0040	0.0037	0.00	12.53	1.00	8.0000	0.0183	A	
			0.0031								
			0.0041								
		0.0035									
		60	0.0034	0.0034	0.00	9.07	0.93				
			0.0034								
	0.0037										
	270	0.0030	0.0020	0.00	12.57	0.54					
		0.0022									
		0.0020									
	MSA	30	30	0.0019	0.0034	0.00	9.61	1.00	8.7692	0.0125	A
				0.0016							
0.0034											
60		60	0.0030	0.0031	0.00	5.87	0.91				
			0.0038								
			0.0034								
270	270	0.0031	0.0017	0.00	11.26	0.51					
		0.0030									
		0.0033									
			0.0029								
			0.0020								
			0.0016								
			0.0017								
			0.0015								

*以 Cassette 採樣 30 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test.

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

三、以 IOM 評估潤洗液之回收率

本實驗以 IOM 搭配 Gelatin filter 評估 Tween 80 潤洗液與 PBS 對於 *S. aureus* 之回收率。測試方法係取 *S. aureus* 菌液加至置於離心管之 Gelatin filter，待自然風乾 30 分鐘後，加入 Tween 80 潤洗液或 PBS 於離心管中並將離心管置於 37°C 下加熱 2、5、10、15 與 20 分鐘，最後以推盤法定量潤洗液中 *S. aureus* 菌落數，此菌落數與初始添加菌落數之比值即為兩種潤洗液於特定震盪時間下之回收率(Recovery, %)。

結果如表 28 所示，以 TSA 推盤之組別而言，當加熱時間由 2 分鐘延長至 20 分鐘時，Tween 80 潤洗液與 PBS 之回收率分別自 60.99% (CV = 3.64%) 上升至 94.70% (CV = 2.8%) 與 61.34% (CV = 3.75%) 上升至 87.48 (CV = 2.79%)，亦即兩種潤洗液之回收率皆隨濾紙加熱時間延長而上升。另以 MSA 推盤之組別而言，Tween 80 潤洗液之回收率則隨濾紙加熱時間延長(2-20 分鐘)而自 54.03% (CV = 4.95%) 上升至 91.04% (CV = 3.38%)，PBS 之回收率則自 53.23% (CV = 3.96%) 上升至 84.76 (CV = 2.39%)，回收率變化趨勢與 TSA 推盤之組別相同。

進一步將兩種潤洗液分別以兩種培養基推盤之回收率以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 進行統計檢定，發現當以 TSA 推盤，Gelatin filter 於兩種潤洗液中加熱 15 與 20 分鐘時，*S. aureus* 之回收率彼此間無統計上顯著差異，然顯著高於濾紙加熱 2-10 分鐘時之回收率(表 28，Kruskal Wallis test，Tween 80 潤洗液：0.0016，PBS：0.0015，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)；另以 MSA 推盤時，*S. aureus* 之回收率於濾紙加熱 15 與 20 分鐘時彼此間亦無統計上顯著差異，且亦顯著高於濾紙加熱 2-10 分鐘時之回收率(表 28，Kruskal Wallis test，Tween 80 潤洗液：0.0015，PBS：0.0016，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)。最後以 Wilcoxon rank sum test 對濾紙於 Tween 80 潤洗液與 PBS 中以五種加熱時間處理後之回收率進行統計檢定，結果顯示，Tween 80 潤洗液之回收率亦顯著高於 PBS (表 27， $p = 0.0103$)。另以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，結果顯示兩種潤洗液於 TSA 與 MSA 分推盤分析時其回收率彼此間無統計上顯著差異($p = 0.1134$)。

綜合上述說明可知，以 IOM 搭配 Gelatin filter 採樣時，使用 Tween 80 潤洗液收集濾紙上之 *S. aureus* 具較佳回收率，而濾紙於 Tween 80 潤洗液中加熱 15 與 20 分鐘時之回收率彼此間無統計上顯著差異(表 28)，且由數據可發現無論何種培養基推盤，

加熱時間自 15 分鐘延長至 20 分鐘時，回收率皆未出現繼續上升之趨勢(表 28)，故本研究認為將 Gelatin filter 置於 Tween 80 潤洗液中加熱 15 分鐘即為適當作法，以此作為 IOM 搭配 Gelatin filter 採樣完成後之樣本處理方法。

表 27 Tween 80 潤洗液與 PBS 之回收率(%)統計檢定

潤洗液	加熱時間 (min)	樣本數(n)	平均回收 率(%)	SD	CV(%)	Z value	p value*
Tween 80 潤洗液	2	4	57.51	0.04	7.58	2.5644	0.0103
	5	4	77.59	0.03	3.91		
	10	4	83.16	0.03	3.81		
	15	4	93.98	0.02	2.17		
	20	4	92.87	0.03	3.55		
PBS	2	4	57.29	0.05	8.36		
	5	4	71.78	0.03	4.41		
	10	4	75.62	0.03	3.82		
	15	4	84.09	0.02	2.79		
	20	4	86.12	0.03	2.95		

*Wilcoxon rank sum test

表 28 以 IOM 評估 Gelatin filter 於 Tween 80 潤洗液與 PBS 中經過不同加熱時間處理之回收率(%)統計檢定

培養基	潤洗液	加熱時間 (min)	樣本數(n)	平均回收率(%)	SD	CV(%)	χ^2 value	<i>p</i> value*	Scheffé test**
TSA	Tween 80 潤洗液	2	4	60.99	0.02	3.64	17.3881	0.0016	D
		5	4	79.98	0.02	2.05			C
		10	4	85.78	0.02	2.34			B
		15	4	95.02	0.02	2.05			A
		20	4	94.70	0.03	2.80			A
	PBS	2	4	61.34	0.02	3.75	17.6000	0.0015	C
		5	4	73.93	0.02	2.73			B
		10	4	77.91	0.01	0.96			B
		15	4	85.07	0.03	3.28			A
		20	4	87.48	0.02	2.79			A
MSA	Tween 80 潤洗液	2	4	54.03	0.03	4.95	17.5000	0.0015	C
		5	4	75.19	0.02	2.46			B
		10	4	80.55	0.01	1.32			B
		15	4	92.95	0.02	1.88			A
		20	4	91.04	0.03	3.38			A
	PBS	2	4	53.23	0.02	3.96	17.4596	0.0016	C
		5	4	69.62	0.03	3.77			B
		10	4	73.34	0.02	3.03			B
		15	4	83.11	0.02	1.88			A
		20	4	84.76	0.02	2.39			A

*Kruskal Wallis test.

**Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

四、時間因子對 IOM 採樣效能之影響

本實驗操作流程近似於 Cassette，係以 IOM 搭配 Gelatin filter 進行不同時間之空氣採樣，以了解時間因子對該採樣方法效能之影響。同樣將內置有 Gelatin filter 之 IOM 於系統暴露艙中進行 30、60 與 270 分鐘之空氣採樣，採樣完成後將 Gelatin filter 置於回收率較佳之 Tween 80 潤洗液中，並將潤洗液於 37°C 下加熱 15 分鐘，其後以推盤法定量潤洗液中 *S. aureus* 細菌濃度，IOM 採樣所得之空氣中細菌濃度將以 Nebulizer 中細菌濃度進行校正，以計算不同採樣時間之 R 值。

結果如表 29 所示，以 TSA 與 MSA 推盤時，採樣時間 30、60 與 270 分鐘下之 R 平均值為 0.0265、0.0096、0.0024 與 0.0221、0.0082、0.0017；其中採樣時間 60 與 270 分鐘之平均 R 值分別為 30 分鐘之平均 R 值的 0.36、0.09 倍(以 TSA 推盤)與 0.37、0.08 倍(以 MSA 推盤)(表 26)，顯示採樣效能皆隨採樣時間延長而下降。進一步進行統計檢定則發現，無論以 TSA 或 MSA 推盤，採樣時間 30 分鐘之 R 值顯著高於採樣 60 與 270 分鐘時之 R 值，而採樣 60 分鐘時之 R 值亦顯著高於採樣 270 分鐘之結果(表 26，Kruskal Wallis test，TSA： $p = 0.0073$ ，MSA： $p = 0.0073$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$)。另以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，結果顯示 IOM 搭配 Gelatin filter 進行不同時間之空氣採樣後，其潤洗液於 TSA 與 MSA 推盤分析時其採樣效能彼此間無統計上顯著差異($p = 0.3708$)。由上述說明可知，IOM 搭配 Gelatin filter 之採樣效能隨採樣時間延長而呈現下降趨勢(圖 26)，與 Cassette 搭配 PC filter 採樣之結果變化趨勢相同。

表 29 IOM 搭配 Gelatin filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R)統計檢定

採樣器	培養基	採樣時間 (min)	R	Mean R	SD	CV(%)	Relative R*	χ^2 value	p value**	Scheffé test***	
IOM	TSA	30	0.0276	0.0265	0.00	13.48	1.00	9.8462	0.0073	A	
			0.0224								
			0.0308								
		0.0252									
		60	0.0113	0.0096	0.00	14.25	0.36				B
			0.0100								
	0.0090										
	270	0.0081	0.0024	0.00	13.30	0.09	C				
		0.0026									
		0.0021									
	MSA	30	30	0.0242	0.0221	0.00	12.48	1.00	9.8462	0.0073	A
				0.0223							
0.0239											
60		0.0182	0.0082	0.00	16.56	0.37	B				
		0.0092									
		0.0081									
270	0.0093	0.0017	0.00	19.48	0.08	C					
	0.0063										
	0.0021										
			0.0014								
			0.0018								
			0.0015								

*以 IOM 採樣 30 分鐘之平均 R 值為 1，其他採樣時間與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test.

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

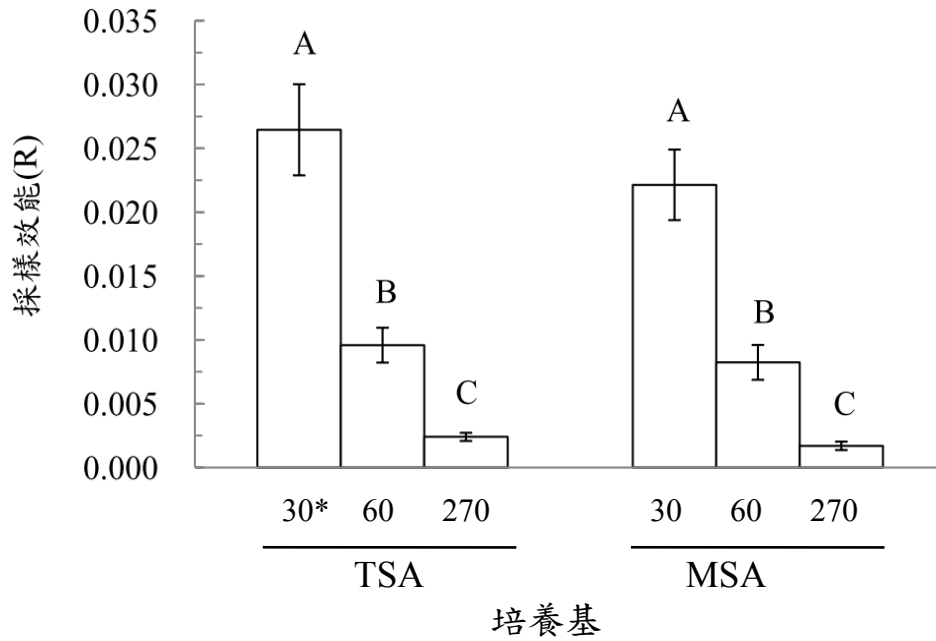


圖 26 IOM 搭配 Gelatin filter 於不同採樣時間下之採樣效能(R)
(*採樣時間，min)

五、以濾紙為採樣介質之生物氣膠採樣方法比較

(一) IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 之採樣效能

以 Wilcoxon rank sum test 對所有以 IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 採樣所得之 48 筆 R 值(表 26 與表 29)進行統計檢定，以了解兩種採樣器搭配各自濾紙於 30-270 分鐘採樣時間下之採樣效能是否具統計上顯著差異。結果顯示，IOM 之採樣效能顯著高於 Cassette (表 30， $p = 0.0049$)。

表 30 IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 之採樣效能(R)統計檢定

採樣器	培養基	採樣時間 (min)	樣本數 (n)	Mean R	SD	CV(%)	Z value	<i>P</i> value*
IOM	TSA	30	4	0.0265	0.00	13.48	2.8146	0.0049
		60	4	0.0096	0.00	14.25		
		270	4	0.0024	0.00	13.30		
	MSA	30	4	0.0221	0.00	12.48		
		60	4	0.0082	0.00	16.56		
		270	4	0.0017	0.00	19.48		
Cassette	TSA	30	4	0.0037	0.00	12.53		
		60	4	0.0034	0.00	9.07		
		270	4	0.0020	0.00	12.57		
	MSA	30	4	0.0034	0.00	9.61		
		60	4	0.0031	0.00	5.87		
		270	4	0.0017	0.00	11.26		

第五節 生物氣膠採樣方法比較

本研究將 Andersen impactor、BioSampler、AGI-30、IOM 與 Cassette 等五種採樣器於相同採樣時間(30 與 60 分鐘)下之 R 值進行比較。以推盤培養基皆為具最佳採樣效能之 TSA 的情形下，結果如表 31 所示，若以 IOM 搭配 Gelatin filter 採樣並以 TSA 作為其潤洗液之培養基的組別之平均 R 值為 1，採樣時間 30 分鐘時，同樣以濾紙為介質之 Cassette 與其相對 R 值之平均值為 0.14，而 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時與其相對 R 值之平均值則為 11.13 與 6.63，搭配 PBS 採樣時採樣時與其相對 R 值之平均值較低，分別為 5.15 與 0.47，另 Andersen impactor 與其相對 R 值之平均值則為 4.9；採樣時間為 60 分鐘時，Cassette 與其相對 R 值之平均值為 0.35，BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時與其相對 R 值之平均值則為 18.22 與 3.12，而搭配 PBS 採樣時採樣時與其相對 R 值之平均值亦較低，分別為

9.37 與 0.92，另 Andersen impactor 與其相對 R 值之平均值則為 13.73。

進一步以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 對上述五種採樣器於 30 與 60 分鐘採樣時間下之 R 進行統計檢定，結果顯示 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能於採樣時間 30 與 60 分鐘下，皆顯著高於其他採樣方法於相同採樣時間下之採樣效能。而 AGI-30 搭配 PBS、IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 之採樣效能於採樣時間 30 與 60 分鐘下則皆顯著最低，且上述三種採樣方法之採樣效能彼此間無統計上顯著差異。此外，採樣時間 30 分鐘時，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能僅次於 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之結果，且顯著高於 BioSampler 搭配 PBS 與 Andersen impactor 搭配 TSA 之採樣效能，然採樣時間 60 分鐘時，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能則顯著低於 BioSampler 搭配 PBS 採樣與 Andersen 搭配 TSA 之結果。觀察數據可發現，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，其與 BioSampler 相對 R 值之平均值於採樣時間 30 分鐘延長至 60 分鐘時，由 6.63 下降至 3.12。

若將五種採樣器於 30 與 60 分鐘採樣時間下以 MSA 推盤之結果納入統計檢定，結果(表 32)亦顯示 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著高於其他採樣方法於相同採樣時間下之採樣效能。而 AGI-30 搭配 PBS、IOM 與 Cassette 之採樣效能於採樣時間 30 與 60 分鐘時亦顯著最低。另，採樣時間 30 分鐘時，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能僅次於 BioSampler 搭配相同收集液採樣之結果，然採樣時間 60 分鐘時，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能則亦顯著低於 Andersen impactor 與 BioSampler 搭配 PBS 之採樣效能。由上述說明可知 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於採樣時間延長時(30 至 60 分鐘)，其採樣效能下降程度應明顯大於 Andersen impactor 與 BioSampler 搭配 PBS 採樣之結果。

綜合上述評比結果，五種採樣器中以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著最佳，而 AGI-30 搭配 PBS、IOM 與 Cassette 之採樣效能則顯著最低。

表 31 五種採樣器搭配不同介質於 30 與 60 分鐘採樣時間下之相對採樣效能(Relative R)與統計檢定(以 TSA 推盤)

採樣器	採樣介質*	30 分鐘			60 分鐘		
		Relative R**		Scheffe's test***	Relative R		Scheffe's test
		Mean	SD		Mean	SD	
以培養基為採樣介質							
Andersen impactor	TSA	4.90	0.29	C	13.73	1.04	B
以收集液為採樣介質							
BioSampler	Tween 80 mixture	11.13	0.83	A	18.22	1.12	A
AGI-30	Tween 80 mixture	6.63	0.41	B	3.12	0.28	D
BioSampler	PBS	5.15	0.39	C	9.37	0.14	C
AGI-30	PBS	0.47	0.05	D	0.92	0.07	E
以濾紙為採樣介質							
IOM	Gelatin filter	1.00	0.00	D	1.00	0.00	E
Cassette	Polycarbonate filter	0.14	0.02	D	0.35	0.03	E

*收集液與濾紙潤洗液等採樣介質皆以 TSA 推盤分析

**以 IOM 搭配 Gelatin filter 採樣 30 與 60 分鐘並以 TSA 進行其潤洗液推盤之平均 R 值為 1，其他採樣方法於相同採樣時間下與其相對 R 值

***Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

表 32 五種採樣器搭配不同介質於 30 與 60 分鐘採樣時間下之相對採樣效能(Relative R)與統計檢定

採樣器	採樣介質	培養基	30 分鐘			60 分鐘		
			Relative R*		Scheffe's test**	Relative R		Scheffe's test
			Mean	SD		Mean	SD	
以培養基為採樣介質								
Andersen impactor	TSA		4.90	0.29	C	13.73	1.04	B
	MSA		3.32	0.36	D	8.67	1.09	C
以收集液為採樣介質								
BioSampler	Tween 80 mixture	TSA	11.13	0.83	A	18.22	1.12	A
AGI-30	Tween 80 mixture	TSA	6.63	0.41	B	3.12	0.28	D
BioSampler	PBS	TSA	5.15	0.39	C	9.37	0.14	C
AGI-30	PBS	TSA	0.47	0.05	E	0.92	0.07	E
以濾紙為採樣介質								
IOM	Gelatin filter	TSA	1.00	0.00	E	1.00	0.00	E
IOM	Gelatin filter	MSA	0.84	0.10	E	0.86	0.14	E
Cassette	Polycarbonate filter	TSA	0.14	0.02	E	0.35	0.03	E
Cassette	Polycarbonate filter	MSA	0.13	0.01	E	0.32	0.02	E

*以 IOM 搭配 Gelatin filter 採樣 30 與 60 分鐘並以 TSA 進行其潤洗液推盤之平均 R 值為 1，其他採樣方法於相同採樣時間下與其相對 R 值

**Scheffé test 事後檢定：英文字母相異者為檢定結果達統計上顯著差異($p < 0.05$)

第五章 討論

第一節 *S. aureus* 氣膠產生系統

文獻指出，環境空氣中之細菌濃度、生理特性與菌種分佈與採樣當地環境特性(人口密度、職場作業性質、相對濕度、風速與風向等)有關，因此於實場環境採樣較難進行採樣方法之比較，例如細菌於環境相對濕度較高時，其整體回收率亦高，若環境中相對濕度變動程度大或變動頻率高，則評估結果亦會出現較大變異性，此外當環境中出現具孢子或其他生理結構較為堅實之優勢菌種，易使欲收集然生理結構相對脆弱之目標致病菌之回收率下降[41]。本研究建置之 *S. aureus* 氣膠產生系統，已確認其於開啓壓縮空氣 60 分後至 270 分鐘之系統運作期間，具穩定系統流量、暴露艙相對濕度與效能評估指標(R)，且暴露艙中 *S. aureus* 氣膠呈單一粒徑分佈。採樣效能評估測試皆於此時間區段內進行，以減少系統變動性與其他於實際現場採樣時其環境因子對採樣方法本身所提供之採樣效能的干擾；此外，Nebulizer 提供之單一菌源可使評估對象清楚呈現其對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能，而不受其他菌種干擾。

第二節 以固體培養基為採樣介質之採樣方法效能評估

一、選定 *S. aureus* 最佳空氣採樣培養基

本實驗以 Andersen 1-STG 隨機搭配非選擇性培養基 TSA 與四種適用於 *S. aureus* 之選擇性培養基 MSA、BPA、CSA 與 CSM 於暴露艙進行 6 分鐘之空氣採樣，並以其空氣採樣濃度與其採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度平均值之比值(R)，顯示其採樣效能。統計結果顯示，TSA 之採樣效能顯著高於 MSA、BPA、CSA 與 CSM 之採樣效能，此結果意味著在相同採樣條件(採樣器、抽氣流量、相對濕度與採樣時間)下，相較於選擇性培養基，無添加任何抑菌成份之非選擇性培養基可培養出較多 *S. aureus* 生物氣膠。Stewart 等人曾以 Andersen six stage sampler 搭配非選擇性(TSA)與選擇性培養基(MacConkey agar 與 TSA plus 5% NaCl)，於暴露艙中對 *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) (適用之選擇性培養基為 MacConkey agar)與 *Micrococcus luteus* (ATCC

4698) (適用之選擇性培養基為 TSA plus 5% NaCl)進行 15 分鐘之空氣採樣，而後計數培養基上菌落數以計算回收率(Relative recovery, %)。其結果顯示，*P. fluorescens* 氣膠於 TSA 與 MacConkey agar 之回收率分別為 20±4%與 0%，而 *M. luteus* 氣膠於 TSA 與 TSA plus 5% NaCl 之回收率則分別為 14±3%與 13±1%。該研究指出生物氣膠以衝擊方式收集至培養基上時，可能造成菌體結構損傷或喪失部分生理功能，致使較脆弱細菌 (*P. fluorescens*)於選擇性培養基上的回收率下降[42]，上述因素亦可能是造成 *S. aureus* 需培養至 48 小時才能在 MSA 上觀察到所有菌落之可能原因之一；此有助於 *S. aureus* 克服採樣壓力並恢復酵素作用與繁殖複製能力。

然 2011 年 Hsiao 等人發現非選擇性 TSA 與選擇性培養基 CSA 對於 *S. aureus* 生物氣膠之回收率相似。該研究使用與本研究相同之 *S. aureus* (ATCC 29213)，其實驗過程係以 Andersen 1-STG 搭配不同培養基於暴露艙進行 7 分鐘空氣採樣，而後計數菌落數以計算不同培養基之採樣效能(表 35, Relative recovery, RR; 等同於本研究之 R)。其結果顯示，於相對溼度 RH 為 55%時，TSA 與 CSA 之 RR 值相似(0.5-0.9) [11]。而本研究 TSA 與 CSA 之採樣效能分別為 0.139 與 0.061，且統計結果顯示 TSA 之採樣效能顯著高於 CSA。推測造成兩者差異之可能原因包括：不同的生物氣膠採樣器評估系統(如：Nebulizer 之壓力(Hsiao 等人為 20 psi)、系統總流量(Hsiao 等人為 50 L/min)、連接 Nebulizer 與暴露艙之管線長度與材質等)、不同的空氣採樣時間(Hsiao 等人為 7 分鐘)等。

二、選擇性培養基

本實驗結果中，四種選擇性培養基之 R 值彼此間雖無顯著差異，然比較數據後可發現 MSA 之 R 值最高，BPA 次之，而 CSM 之 R 值最低。本研究於四種選擇性培養基中選擇其一進行生物氣膠採樣方法之效能評估，除考量其 R 值，亦將文獻中對於其成分、鑑定準確度(Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV)與 *S. aureus* 回收率(Recovery)等因子納入參考。

在 CSM 部分，關於其鑑定準確度或 *S. aureus* 回收率之研究相當有限，過往文獻指出，研究者以 Andersen sampler 搭配 TSA[10]或 NA[9]完成 *S. aureus* 空氣採樣後，將 TSA 與 NA 培養一至二日，接著將生長之菌落接種至 CSM 並接續培養二日，其後再進行生化鑑定。以本研究實驗結果而論，因 CSM 採樣效能最低，上述文獻之做法將

會是本研究建議使用 CSM 培養基之方式，亦即先以非選擇性培養基進行空氣採樣以獲得高採樣效能，再接種至空氣採樣效能相對較差之 CSM，以進行後續菌種分離與鑑定。此作法之優點係可避免因培養基採樣效能較低，導致於空氣採樣過程中損失較多具可培養性之 *S. aureus*，使研究者低估環境空氣中 *S. aureus* 之濃度；然其缺點為耗時且鑑定過程較為繁瑣。

此外，1995 年 Sato 等人發現對於泳池中之水樣，BPA、MSA、CSM、Vogel Johnson 與 m-Staphylococcus agar 等培養基之 *S. aureus* 回收率分別為 28.6%、22.9%、21.0%、19.1%、11.4% (表 33)，然五種培養基之回收率未達統計上顯著差異[43]。該研究在 MSA、BPA 與 CSM 之回收率統計結果與本研究之採樣效能相似(MSA、BPA 與 CSM 之 R 值分別為 0.085 ± 0.01 、 0.069 ± 0.01 與 0.061 ± 0.01)，三者間均未達顯著差異。2010 年 Kim 與 Oh 亦有近似發現，該研究以 MSA、BPA、Vogel johnson、RAPID'Staph 與 CSA 等五種培養基測試米飯與魚肉中之 *S. aureus* 之回收率，結果發現回收率分別為 63.3%、70.0%、56.7%、53.3%、50.0% (表 33)，且五種培養基之回收率亦無統計上顯著差異[44]。上述結果顯示，環境水樣與食品中之 *S. aureus* 於三種培養基中被分離並培養出來之能力相近。水樣或食品之採樣過程及樣本前處理步驟雖與空氣樣本相異，且 *S. aureus* 於水體或食品中之生理特性與其存在空氣中亦可能不同，然上述兩研究各自針對同類型樣本、以相同前處理步驟評估不同培養基對於環境水體與食品中 *S. aureus* 之回收率，亦可作為後續實場空氣採樣分析時選擇培養基之參考。

在 BPA 部分，其內含 1%之 Sodium pyruvate 可促進具活性然不具可培養性(viable but non- culturable, VBNC)之 *S. aureus* 於培養基中分離[45]，原理係因 *S. aureus* 受熱或乾燥致使其 catalase 活性下降時，Sodium pyruvate 將有助於減少 peroxide 於此過程中對 *S. aureus* 代謝功能之影響[46]。然 DeBuyser 等人研究[47]指出，一般而言，乳製品中之污染雜菌濃度較高，當以 BPA 分析 77 件乳製品樣本中之 *S. aureus*，其中有 18 件 (23.4%)出現陽性菌落數過多以致無法計數之現象，然於分析相同樣本之 rabbit plasma fibrinogen agar (RPFA) medium 中，僅有 2 件(2.6%)樣本出現上述現象，因此推論 BPA 對抑制雜菌生長之能力需要進一步被評估 [47]。

在 CSA 部分，其確切成分為製造廠商之機密，故無從得知。2001 Carricajo 等人以 CSA 對臨床血液、尿液與上呼吸道等檢體進行 *S. aureus* 鑑定，結果顯示其

Sensitivity 與 Specificity 分別為 98%與 100%[48](表 33)。然 2011 年 Hsiao 等人以 Andersen 1-STG 搭配 CSA 於醫療院所進行 7 分鐘空氣採樣時，CSA 對 *S. aureus* 之鑑定 Sensitivity 與 Specificity 分別為 24.1%與 91.2%[11](表 33)，其鑑定低敏感性為未來於實際環境以 CSA 進行 *S. aureus* 空氣採樣時可能面臨之問題，屆時恐需搭配適當生化測試以提高鑑定敏感性。

在 MSA 部分，本研究中 MSA 於四種選擇性培養基中採樣效能最高，其應與內含之 7.5% NaCl 有關[50]。過去文獻指出，添加 7.5% NaCl 於一般廣效性固體培養基時，致病性葡萄球菌屬(*Staphylococci*)可於其上生長良好，且可有效抑制非葡萄球菌屬(*non-Staphylococci*)的生長；此外，*Staphylococci* 於內含 7.5% NaCl 之 bacto phenol red mannitol agar 上培養 12 小時後，其 *Staphylococci* 凝固酶(*coagulase*)活性上升；*Staphylococci* 於內含 7.5% NaCl 之 proteose lactose agar 生長時，其產色原(*chromogen*)與 *coagulase* 之活性亦上升，因此 proteose lactose agar 過去被建議可作為保存 *Staphylococci* 之培養基[50]。除高濃度鹽分外，MSA 配方中之 *peptones* 與牛肉衍生物(*beef extract*)可提供微生物生長之氮源、有機碳、維他命及無機鹽類之來源。換言之，MSA 本身富含 *S. aureus* 生長所需之營養成分，且其內含之高鹽分除可抑制其他菌種與 *S. aureus* 競爭培養基養分，亦可促進 *S. aureus* 之生物活性，推測上述成分是 MSA 於四種選擇性培養基中具最佳採樣效能之因素。就 MSA 鑑定能力而言，2006 年 Sharp 與 Searcy 指出，MSA 為長期被使用於肺囊性纖維化(CF)病患之呼吸道檢體之選擇性培養基，研究發現 200 件檢體於 MSA 進行四區劃線培養後，於未加做其他鑑定測試之情況下，有大於 98%之樣本顯示只要第二區出現菌落則最後鑑定即為 *S. aureus*[51]。此外，2013 年 Bautista-Trujillo 等人對牛奶樣本進行 *S. aureus* 鑑定，結果顯示於生化測試項目皆相同之情況下，以 MSA 作為 *S. aureus* 初步分離之培養基時，其鑑定 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 皆為 100% (表 33)，而 CSA 之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 則分別為 92.31%、94.46%、99.09%與 75%[52]，亦即若以 MSA 取代 CSA 將使該測試流程具更高之 *S. aureus* 鑑定能力。

綜合以上研究，可知於分析臨床或食品樣本時，MSA 本身即提供良好之鑑定能力，且輔以其他測試後，其鑑定結果之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 皆可達 100%，雖樣本類型不同時可能對鑑定結果造成影響，然對空氣樣本而言，本研究除重

視選擇性培養基之鑑定能力外，亦需考量以生物氣膠採樣器收集空氣中 *S. aureus* 時，其採樣過程中之乾燥或衝擊力對 *S. aureus* 可培養性之影響。故本研究選擇四種選擇培養基中具最佳空氣採樣效能、充足養分、並能維持甚至促進 *S. aureus* 生長活性之培養基收集空氣中 *S. aureus*，期能減少 *S. aureus* 於空氣採樣過程中可能喪失之可培養性，同時抑制其他雜菌之生長；綜合上述，故本研究選定 MSA 作為評估生物氣膠採樣方法效能之選擇性培養基。

表 33 選擇性培養基之比較

	MSA		BPA		CSA		CSM	
R(This study)	0.085±0.01		0.069±0.01		0.066±0.01		0.061±0.01	
Sensitivity(%)	100	96.5	100	92.31	98	24.1	100	-
Specificity(%)	100	66.6	100	94.46	100	91.2	100	-
NPV	100	-	-	99.09	-	94.9	-	-
PPV	100	-	-	75.00	-	15.0	-	-
Reference	[52]	[44]	[44]	[52]	[48]	[11]	[44]	-

	MSA		BPA		CSA	CSM
Recovery(%)	28.6	63.3	22.9	70.0	50.0	21.0
Reference	[43]	[44]	[43]	[44]	[44]	[43]

三、時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響

本研究結果顯示，以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA 對 *S. aureus* 進行 3 分鐘空氣採樣，其採樣效能(R)皆顯著高於採樣時間大於採樣 6 分鐘時之效能，TSA 與 MSA 之 R 值分別下降 0.77 倍與 0.72 倍；而採樣時間 6 至 60 分鐘之採樣效能彼此間則無顯著差異。顯示使用相同採樣器與培養基下，採樣時間等於或高於 6 分鐘時，其採樣產生的衝擊力或乾燥作用將顯著影響 *S. aureus* 之可培養性。過往研究亦發現 Andersen 1-STG 之採樣效能隨採樣時間增加而下降，1991 年 Buttner 等人以 Andersen 6-STG 搭配含有 100 µg/mL rifampin 與 cycloheximide 之 King medium B 與含有 100 µg/mL cycloheximide 之 NA 分別對 *Pseudomonas syringae* 與 *Bacillus subtilis spores* 進行 5、10 與 20 分鐘之空氣採樣，並以所得之空氣中細菌濃度(CFU/m³) (表 35)作為採樣效能指標，結果顯示兩種細菌之濃度隨採樣時間增加而下降[53]。另，1999 年 Li 與 Lin

以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 對 *E. coli* 與 *B. subtilis spores* 進行 0.5 至 60 分鐘之空氣採樣，並以與本實驗相同之採樣效能指標(R) (表 35)評估不同採樣時間之影響，結果顯示，*E. coli* 與 *B. subtilis spores* 於採樣時間 0.5 至 20 分鐘時，其 R 值分別為 0.01 與 0.1[54]，而採樣時間 60 分鐘時，*E. coli* 之 R 值則顯著下降至 0.001，*B. subtilis spores* 之 R 值亦顯著下降(文獻未提供數據)。此外，同年 Li 與 Lin 亦以 Andersen 1-STG 搭配 MEA 對真菌孢子(*Penicillium citrinum spores*)與酵母菌(*Candida famata var flareri* 與 *Rhodotorula mucilaginosa*)進行 10 至 60 分鐘之空氣採樣，並以與本實驗相同之採樣效能指標(R) (表 35)評估不同採樣時間之影響，結果顯示真菌孢子與酵母菌於採樣時間 10 至 30 分鐘時，其 R 值分別為 0.31 與 0.144[55]，採樣時間 60 分鐘時，*P. citrinum spores* 之 R 值則顯著下降至 0.25 以下，酵母菌之 R 值亦顯著下降(文獻未提供數據)。

第三節 以收集液為採樣介質之採樣方法效能評估

一、Tween 80 mixture

本研究根據空氣採樣文獻採用之 Tween 80 mixture 配方係含有 1% (w/v) Peptone、0.01% (v/v) Tween 80 與 0.005% (v/v) Antifoam Y-30 emulsion 之混和溶液。本實驗統計結果顯示，Tween 80 mixture 之 R 值顯著高於 PBS 與 DW 之 R 值，此意味著 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 3 分鐘採樣後，能夠收集並培養之 *S. aureus* 數顯著高於 PBS 與 DW。然值得注意的是，本研究發現以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 3、6、15、30 與 60 分鐘採樣時，Nebulizer 中 *S. aureus* 濃度隨系統運作時間延長而下降，然 AGI-30 採樣所得之空氣中 *S. aureus* 濃度卻出現隨系統運作時間增加而先升後降，亦即採樣 6 分鐘時所得空氣中細菌濃度較前次採樣 3 分鐘時為高，且後續採樣 15 與 30 分鐘時所得之空氣中細菌濃度與採樣 3 分鐘時相比，亦無明顯下降趨勢。進一步計算不同採樣時間之 R 值，其統計結果顯示採樣 6 與 15 分鐘時之 R 值皆顯著高於採樣 3 分鐘時之 R 值。因 Nebulizer 中 *S. aureus* 濃度若呈下降趨勢，進入暴露艙中之細菌濃度應亦呈遞減趨勢，使採樣器採樣所得之空氣中細菌濃度下降，即使 Nebulizer 中 *S. aureus* 濃度與採樣器採樣所得之濃度下降幅度相異，下降趨勢上亦應為一致。有鑑於上述結果，本研究進一步瞭解過往文獻對於 Tween 80 mixture 成份與 *S.*

aureus 之關聯性探討。

1998 年 Plou 與 Emanuilova 等人指出，Tween 常被使用於培養基中作為微生物脂解酶(lipase)之基質，且量化 lipase 分解 Tween 之結果將作為微生物之活性指標[56, 57]，其中關於 *S. aureus* 部分，2009 年 Gould 等人針對臨床樣本分離出之 *S. aureus* 進行 lipase 酵素活性分析研究，實驗方法係添加濃度為 1%之 Tween 80 於 NA 中，再將濃度為 1.5×10^8 CFU/mL 之 *S. aureus* 與 MRSA 菌液塗抹於 NA 上培養 48 小時，並以菌落周圍存在乳白色暈環之菌落數比例作為 *S. aureus* 活性指標(乳白色暈環係為 lipase 分解 Tween 80 後之脂肪酸沉澱物)，結果顯示 83% (98/118)之 *S. aureus* 與 73% (189/260) 之 MRSA 出現 lipase-positive 之活性[58]。此外，2006 年 Prema 等人於 MRS medium 中添加濃度介於 0.1-0.5%之 Tween 80，以分析 *Staphylococcus warneri* 於不同濃度之 Tween 80 處理下，在 12 小時內其細菌濃度(測定 OD600 值)之變化。結果顯示，相較於 0.1% (v/v) Tween 80，*S. warneri* 於含有 0.5% Tween 80 之 MRS medium 中時，其測定之 OD 值由 0.5 上升至 1.5[59]。綜合上述可知，由於 *S. aureus* 具有分解利用 Tween 80 之能力，且 Tween 80 亦具促進 *Staphylococcus spp.* 生長活性之能力，因此本研究中 Tween 80 mixture 之 R 值顯著高於 PBS 與 DW 且出現不降反升之之結果，推測可能係因 Tween 80 mixture 於採樣過程中相對於 PBS 與 DW 提供 *S. aureus* 更多保護作用以致具較高之採樣效能，抑或甚至是 *S. aureus* 於 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣過程中出現微生物複製增生現象，而使菌落數增加以致 R 值上升，值得未來進一步的實驗驗證。

除 Tween 80 外，Tween 80 mixture 中之 1% (w/v) peptone 含有豐富氮源，可供微生物生長。2008 年 Gray 等人評估不同濃度之 peptone 對 *Salmonella serovar Typhimurium* 生長活性之影響，評估方法係將固定濃度之菌液置入含有不同濃度 peptone 的 buffered peptone water (BPW)中，當 peptone 濃度由 0.1%升高至 3%，該菌之濃度(測定 OD 值)於 6 小時內，由 3.51×10^8 CFU/mL 上升至 2.7×10^9 CFU/mL，亦即較高濃度之 peptone 促進該細菌之生長速度。此外，值得注意的是，Gray 等人研究亦顯示，*S. aureus* 於含有濃度為 1%(w/v)之不同廠牌的 peptone 的 BPW 中時，其 Generation time (g, min)最小為 6.8 ± 1.5 (min)，其所使用之 peptone 廠牌(Merck)雖與本研究(Oxoid)相異，然不同廠牌間成分比例變異小，亦即培養基質中若含有 1% (w/v)

peptone，*S. aureus* 確有可能於此段時間內複製[60]。上述研究對象雖不全然為 Gram-positive 細菌，然可推論 Tween 80 mixture 中含有 peptone 對 *S. aureus* 之生長速度應具支持甚至是促進作用。

另，2001 年 Li 與 Lin 以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 分別針對 *E. coli* 與 *B. subtilis* 進行 5 分鐘空氣採樣，其後將收集液置於 4°C 與 25°C 存放，並間隔數小時取出收集液於 TSA 推盤，以測試收集液中細菌濃度，結果顯示收集液存放至 10 小時時，*E. coli* 與 *B. subtilis* 之濃度分別上升至初使濃度之 2.5 與 10 倍，而收集液存放於 4°C 時，兩種細菌之濃度則與初始濃度較為一致，Li 與 Lin 認為此係因於室溫情況下 *E. coli* 與 *B. subtilis* 可於 Tween 80 mixture 中發生複製增生之現象所致，因此建議完成採樣之收集液應低溫保存並盡快進行後續分析[27]。

綜合以上對 Tween 80 mixture 成份之分析[59, 60]，並參考 Li 與 Lin (2001)研究可知，細菌經氣懸作用之乾燥影響與 AGI-30 採樣過程中造成之損傷後，其於室溫下之 Tween 80 mixture 中除可維持其可培養性，還具複製增生之生物活性。上述結論提供本研究發現較合理的解釋，本研究以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣後未經儲放過程即推盤分析，結果發現採樣 6 與 15 分鐘之 R 值顯著高於首先採樣 3 分鐘時之 R 值，此時 Nebulizer 中之 *S. aureus* 濃度雖持續下降，然相對於 3 分鐘時，AGI-30 於 6 與 15 分鐘採樣與培養後卻獲得濃度更高之 *S. aureus*，推論此極可能係於採樣時 *S. aureus* 於 Tween 80 mixture 收集液中複製增生之結果。

Tween 80 mixture 雖可能具促進 *S. aureus* 活性之能力，然進一步分析數據可發現，BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 進行 6 與 15 分鐘空氣採樣時，其採樣效能上升程度均較 AGI-30 為低，分別為採樣 3 分鐘時之 1.16 與 1.13 倍(表 22)，採樣 30 分鐘時則略低於採樣 3 分鐘的效能，為其 0.9 倍(表 22)。當 BioSampler 搭配 PBS 時，採樣效能則隨採樣時間持續下降，採樣 30 分鐘時僅為採樣 3 分鐘者的 0.4 倍。本研究認為，PBS 雖無促進 *S. aureus* 增生之虞，但卻可能造成監測結果顯著低估環境空氣中 *S. aureus* 濃度，甚至造成偽陰性之誤判。考量實場環境空氣 *S. aureus* 濃度以及採樣時間需有適當長度以提升樣本代表性，並避免低估甚至偽陰性之結果，本研究認為 BioSampler 結合 Tween 80 mixture 進行 30 分鐘採樣為宜。唯需參考 2001 年 Li 與 Lin 之研究建議[27]，於採樣完將收集液放置 4°C 運送回實驗室，並盡快進行樣本處理。

二、時間因子對 AGI-30 與 BioSampler 採樣效能之影響

本實驗係以 AGI-30 與 BioSampler 搭配 R 值較高之 Tween 80 mixture 與 PBS 兩種收集液，進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣。以不具促進 *S. aureus* 增生爭議的 PBS 而言，AGI-30 與 BioSampler 之採樣結果顯示隨採樣時間由 3 分鐘延長至 60 分鐘，其採樣效能分別下降為採樣 3 分鐘時之 0.08 與 0.26 倍。過往研究亦顯示延長採樣時間造成採樣效能的下降。1991 年 Buttner 與 Stetzenbach 以 AGI-30 搭配 PBS 針對 *Pseudomonas syringae* 與 *Bacillus subtilis* spore 進行 5-20 分鐘之空氣採樣，並以空氣採樣濃度(CFU/m³)(表 35)做為效能指標。結果顯示採樣時間由 5 分鐘延長至 20 分鐘時，*P. syringae* 之空氣採樣濃度由 $3.4 \pm 0.01 \log \text{CFU/m}^3$ 降至 $2.66 \pm 0.06 \log \text{CFU/m}^3$ ，而 *B. subtilis* 之採樣濃度亦由 $4.36 \pm 0.04 \log \text{CFU/m}^3$ 降至 $4.12 \pm 0.54 \log \text{CFU/m}^3$ [53]。另，1999 年 Li 等人以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 針對 *E. coli* 與 *B. subtilis* spore 進行 1-60 分鐘之空氣採樣，其採樣效能指標計算方式與本研究相同(表)。結果顯示，採樣 1 至 60 分鐘時 *E. coli* 與 *B. subtilis* 之採樣效能自 0.053 與 0.144 下降至 0.04 與 0.104，其採樣效能皆呈下降趨勢。2010 年 Chang 等人以 AGI-30 與 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 針對 *Legionella pneumophila* 與 *E. coli* 進行 3、30 與 60 分鐘之空氣採樣，*L. pneumophila* 之結果顯示，若以 3 分鐘之採樣效能為 1，AGI-30 於採樣時間 30 與 60 分鐘時之採樣效能為其 0.15 與 0.11 倍，而 BioSampler 於採樣 30 與 60 分鐘時之採樣效能則為 3 分鐘時之 0.15 與 0.05 倍；在 *E. coli* 而言，相對於採樣 3 分鐘時之採樣效能，AGI-30 於採樣時間 30 與 60 分鐘時之採樣效能為其 0.61 與 0.32 倍，而 BioSampler 於採樣 30 與 60 分鐘時之採樣效能則為 3 分鐘時之 0.34 與 0.29 倍，上述結果顯示 *L. pneumophila* 與 *E. coli* 之採樣效能皆隨採樣時間延長而下降[61]。

延長採樣時間造成採集可培養性 *S. aureus* 之負面效應，可能與採樣氣體衝擊收集液造成採樣器中已採集之微生物再氣膠化有關[62]，此外，亦與微生物於採樣過程中反覆撞擊收集液面與瓶壁之影響導致細菌活性下降有關[63]。2007 年 Rule 等人置入已知濃度之 *Pantoea agglomerans* 之 DW 於 AGI-30 與 BioSampler 中，並於暴露艙進行 30 與 60 分鐘之空氣採樣(暴露艙通入經 HEPA 過濾之空氣)，而後以染劑區分收集液中總菌與非活性細菌以計算活性細菌濃度(表 34)。結果顯示，當採樣時間自 30 分鐘延長至

60 分鐘，AGI-30 中活性與可培養性細菌濃度分別由 $1.6 \times 10^9 \pm 4.1 \times 10^8$ viable cells/mL 與 $1.6 \times 10^9 \pm 5.8 \times 10^8$ CFU/mL 下降至 $1.5 \times 10^8 \pm 7.1 \times 10^8$ viable cells/mL 與 $6.8 \times 10^8 \pm 2.9 \times 10^8$ CFU/mL，亦即活性與可培養性比例分別下降 0.09 與 0.4 倍；而 BioSampler 中活性與可培養性細菌濃度則分別由 $7.3 \times 10^9 \pm 1.5 \times 10^9$ viable cells/mL 與 $1.2 \times 10^{10} \pm 6.8 \times 10^9$ CFU/mL 下降至 $6.4 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^9$ viable cells/mL 與 $9.2 \times 10^9 \pm 5.1 \times 10^9$ CFU/mL，亦即活性與可培養性比例分別下降 0.88 與 0.77 倍。由該研究結果可知，*P. agglomerans* 之活性與可培養性細菌濃度隨採樣時間延長而下降，且 BioSampler 中活性與可培養性細菌下降比例小於 AGI-30[32]。綜合上述研究可知，本實驗結果發現 AGI-30 與 BioSampler 採樣效能隨採樣時間之增加而下降，可部分歸因於較長時間之採樣過程中其細菌活性下降之現象。

表 34 細菌活性與可培養性評估指標

Test bioaerosols	Dye	Viability indicator	Culturability indicator	Reference
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BacLight stain	% viable bacteria = (Live count _{BL} / Total count _{BL}) × 100%	% culturable bacteria = CFU _{nonselective} / Total count _{BL}	[63]
<i>Pantoea agglomerans</i>	Syto 62、 TOPRO-3	viable cells/mL = (total cells/mL) _{Syto 62} - (nonviable cells/mL) TOPRO-3	Culturability efficiency (CE) _{impingers} = (CFU/mL) _{after test} / (CFU/mL) _{before test}	[32]

三、AGI-30 與 BioSampler 之採樣效能差異

本研究統計結果顯示以液體為介質之採樣方法中，以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能最佳。過往研究顯示 AGI-30 與 BioSampler 之 50% 截取氣動粒徑 (d_{50}) 分別為 $0.31 \mu\text{m}$ [39] 與 $0.3 \mu\text{m}$ [40]，其 d_{50} 相似之特性應使兩種採樣器有相似的物理性回收效率，然 BioSampler 之採樣效能較高，可能與其利用衝擊及離心原理使含生物氣膠之空氣氣流衝擊至收集液表面，降低了生物氣膠反彈與再氣膠化現象，因此使較多生物氣膠被保留於 BioSampler 收集液當中所致[64]。2009 年 Rule 等人於暴露艙中以 BioSampler 與 AGI-30 搭配 PBS 與 DW 進行 5 分鐘之 *Pantoea agglomerans* 空氣採

樣，結果顯示 BioSampler 採樣所得採樣效能(CE，表)高於 AGI-30 20%[65]。此外，2010 年 Chang 等人於暴露艙中以 BioSampler 與 AGI-30 搭配 DW 針對 *L. pneumophila* 進行 3 分鐘空氣採樣時，AGI-30 之採樣效能(R，表 35)為 BioSampler 之 0.57 倍[61]。上述他人之研究皆顯示 BioSampler 之採樣效能高於 AGI-30，與本研究之結果一致。

表 35 採樣效能評估指標

Test bioaerosols	Sampler	Collection agar	Sampling time (min)	Performance indicator	Reference
<i>Pseudomonas fluorescens</i> and <i>Micrococcus luteus</i>	Andersen 6-STG	TSA, MacConkey agar and TSA plus 5% NaCl	15 min	CFU/m ³	[42]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Andersen 1-STG	LB, TSA, BAP and CSA	7 min	Relative recovery (RR) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/mL) _{nebulizer}	[11]
<i>Pseudomonas syringae</i> and <i>Bacillus subtilis</i> spores	Andersen 6-STG	King medium B and NA	5, 10, 20 min	CFU/m ³	[53]
<i>Escherichia coli</i> and <i>Bacillus subtilis</i> spores	Andersen 1-STG	TSA	0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 60 min	Colony survival (CS) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/mL) _{nebulizer}	[54]
<i>Penicillium citrinum</i> spores, <i>Candida famata</i> var <i>flareri</i> and <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Andersen 1-STG	MEA	10, 20, 30, 40, 50, 60 min	Colony survival (CS) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/mL) _{nebulizer}	[55]
<i>Pantoea agglomerans</i>	AGI-30 and BioSampler	PBS and DW	5 min	Culturability efficiency (CE) = (CFU/L) _{sampler} / (Counts/L) _{APS} (L : per liter of air)	[65]
<i>Escherichia coli</i> and <i>Legionella pneumophila</i>	Andersen 1-STG	TSA and BCYE agar	1, 2, 4 min	R = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/m ³) _{APS}	[61]
<i>L. pneumophila</i>	Andersen 1-STG	BCYE agar	5 min	Colony survival (CS) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/mL) _{nebulizer}	[66]

第四節 Andersen 1-STG、AGI-30、BioSampler、Cassette 與 IOM

進一步將以培養基為介質之採樣方法(Andersen 1-STG)、以液體為介質之採樣方法(BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 及 PBS)與以濾紙為介質之採樣方法(IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter)之 R 值進行統計檢定，結果顯示於 30 與 60 分鐘之相同採樣時間下，BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著高於其他五種採樣方法，而 AGI-30 搭配 PBS、IOM 與 Cassette 之採樣效能則顯著最差。前述討論曾提及 BioSampler 之採樣效能優於同樣以收集液為介質之 AGI-30，可能與其利用衝擊及離心原理使生物氣膠衝擊至收集液表面，降低了生物氣膠之再氣膠化現象，而使較多生物氣膠被保留於 BioSampler 收集液當中有關[61, 64]。2012 年 Hsiao 等人研究以 Andersen 1-STG (搭配 LB、TSA、BAP (Blood agar plate)與 CSA)與 Cassette (搭配 PC filter)分別於暴露艙採樣 7 與 60 分鐘，並以與本研究相同之採樣效能指標(RR，表 35)進行不同採樣方法間之效能比較，結果顯示 Andersen 1-STG 之採樣效能約為 0.1，且未隨暴露艙相對濕度(RH)變化(30-85%)而有顯著差異，然 Cassette 之採樣效能則由 RH 值 85%降至 30%時自 0.14-0.2 降至 0.01-0.04，亦即 Cassette 之採樣效能隨 RH 改變而有顯著變化($p < 0.05$)，研究指出上述現象應係 Cassette 採樣過程中對 *S. aureus* 的乾燥影響隨環境中 RH 值降低而加劇，而 Andersen 1-STG 對 *S. aureus* 之採樣效能則較不隨 RH 值出現顯著變化，此外，Hsiao 等人以 Andersen 1-STG 與 Cassette 同時於小兒病房與呼吸照護病房採樣之結果顯示，Cassette 有多個樣本呈現未檢出(not detected)。綜合上述現象可知，對於捕集空氣中 *S. aureus* 而言，Andersen 1-STG 相對於 Cassette 具有較佳之採樣效能[11]，此與本研究有一致的結果。另，2012 年 Friese 等人研究以 AGI-30 搭配 PBS 與 IOM 搭配 PC filter 於 27 個豬舍分別進行 30 與 150 分鐘之 *S. aureus* 空氣採樣，結果顯示使用 AGI-30 採樣時，有 85.2% (23/27)的豬舍偵測出 MRSA 的存在，而以 IOM 採樣時之檢出率則較低，為 55.6% (15/27)；此外，於 27 個豬舍中收集之 81 件 AGI-30 樣本與 80 件 IOM 樣本，其 MRSA 之陽性檢出率分別為 63% (51/81)與 28.8% (23/80)。顯示 AGI-30 相較於 IOM 更能有效捕集空氣中 MRSA[18]。Friese 等人亦於 2013 年在 9 個火雞與肉雞舍以與 2012 年研究相同方式進

行空氣採樣，發現使用 AGI-30 與 IOM 採樣時皆有 77.8% (7/9)的豬舍偵測出存在 MRSA，然於 9 個豬舍中收集之 27 件 AGI-30 樣本與 27 件 IOM 樣本中則分別有 59.3%與 70.4%之 MRSA 陽性檢出率，此結果與 2012 年之研究結果相反，然 Friese 等人認為此現象可能與有限的樣本數有關[19]。本研究則發現，AGI 搭配 PBS、IOM 搭配 gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 三者間之採樣效能未達統計顯著差異，然 AGI 搭配 PBS 則略高於 Cassette 搭配 PC filter (表 31)，此結果與 Friese 等人的發現相似。

過往其他生物氣膠研究亦出現與本研究評估五種採樣器對於空氣中可培養性 *S. aureu* 之採樣效能相近之結果，2011 年 Chang 等人以 BioSampler (搭配 Tween 80 mixture 與 DW)、IOM (搭配 Gelatin filter)與 Cassette (搭配 PC filter)於暴露艙分別採樣 30-60 分鐘與 30-270 分鐘，結果顯示對於可培養性之 *L. pneumophila* 而言，若以 IOM 之採樣效能為 1，採樣時間 30 分鐘時 BioSampler 與 AGI-30 與其相對 R 值之平均值係 4.8-41.6 與 5-10.9，而 Cassette 係 0.01；另，採樣 60 分鐘時，BioSampler 與 AGI-30 與其相對 R 值之平均值係 4.3-311.6 與 10.5-159.5，而 Cassette 係無法測得任何細菌濃度 (Not detected)，研究指出 BioSampler 與 AGI-30 之採樣效能高於 IOM 與 Cassette 之原因，係與濾紙於採樣過程中逐漸乾燥之現象有關，其可能影響收集於濾紙上之細菌的代謝與複製能力，因此應較不適用於收集可培養性 *L. pneumophila*[29]。2012 年 Chang 等人使用 Andersen 1-STG、BioSampler、AGI-30、IOM 與 Cassette 等五種採樣器於生物曝氣池分別進行 5-30、15-60、30-60 與 30-270(IOM 與 Cassette)分鐘之 *Legionellae spp.* 空氣採樣，結果顯示 BioSampler 採樣結果具最高之陽性率(8-50%)，AGI-30 次之 (25%)，而 Andersen 1-STG、IOM 與 Cassette 採樣結果陽性率則皆為 0%[24]。

另，本研究結果顯示 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能於採樣 30 分鐘時顯著高於 Andersen impactor，結果近似於 1992 年 Thorne 等人之研究，1992 年 Thorne 等人以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 進行 15 至 90 秒之細菌與真菌空氣採樣，此外，亦以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 5 分鐘之細菌與真菌空氣採樣，以評估兩種採樣器的效能。結果顯示，Andersen 1-STG 採樣所得之細菌與真菌平均濃度分別是 73200 與 1970 CFU/m³，而 AGI-30 採樣所得之細菌與真菌平均濃度分別是 96400 與 5380 CFU/m³；經統計檢定後，AGI-30 與 Andersen 1-STG 對於細菌之採樣濃度無顯著差異，然 AGI-30 採集之細菌濃度仍高於 Andersen 1-STG，且真菌部份之濃度顯著優

於 Andersen 1-STG[28]。另，2003 年 Li 等人以 Andersen 1-STG 搭配 BCYE agar 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於暴露艙進行 5 分鐘之 *L. pneumophila* 空氣採樣，結果顯示 Andersen 1-STG 之採樣效能(CS)為 0.016 ± 0.002 ，而 AGI-30 之 CS 則為 0.132 ± 0.0387 ，該研究認為此結果係可能與 *L. pneumophila* 於 Andersen 1-STG 採樣過程中之衝擊與乾燥之影響大於其於 AGI-30 採樣過程中之損傷程度[66]。上述研究發現亦與本研究結果相似，亦即 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著高於 Andersen 1-STG 搭配選擇性培養基之結果。另需注意的是，過往空氣採樣文獻中使用不同採樣方法所得之生物氣膠濃度，除需考量不同採樣器搭配不同介質與採樣時間對採樣效能之影響，後續分析方法亦可能影響特定微生物之檢出率，而進一步導致不同採樣方法之採樣效能彼此間的相對關係產生變化。

然 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能於採樣 60 分鐘時卻顯著低於 Andersen 1-STG 之結果，此結果可能與 AGI-30 以衝擊方式將生物氣膠收集至液體中之採樣器特性有關，1997 年 Grinshpun 等人指出，AGI-30 之採樣效能於採樣時間延長時下降，此現象係可能與採樣氣體衝擊至收集液時造成反覆強烈之攪動，使已被捕集於收集液中之微生物再氣膠化有關[62]。

第五節 實場採樣影響因子

本研究結果顯示，對於空氣中具可培養性之 *S. aureus* 而言，BioSampler 之採樣效能顯著優於 AGI-30、Andersen sampler、IOM 與 Cassette。進一步比較收集液時則發現，Tween 80 mixture 較 PBS 與 DW 更具有較佳的採樣效能；其中，以 PBS 結合 BioSampler 或是 AGI-30 時，其採樣效能均隨採樣時間延長而顯著下降，此將造成顯著低估空氣中 *S. aureus* 濃度。故為避免低估空氣中之 *S. aureus* 暴露狀況，以及考量適當長度之採樣時間可提供較具代表性的樣本，根據本研究目前所獲致的結果，認為以 BioSampler 結合 Tween 80 mixture 並進行 30 分鐘採樣為最佳條件，惟需注意於採樣後將收集液置於 4°C 下運送回實驗室，並盡快進行樣本處理為宜。

上述結果係依據目前研究所得，然在制定實場採樣策略時，仍應閱讀相關環境調查文獻以瞭解 *S. aureus* 之空氣濃度範圍或具抗藥性之分佈區域。舉例而言，2013 年

Friese 等人分別以 AGI-30 與 IOM 於火雞舍測得 2.3×10^4 與 7.4×10^3 CFU/m³ 之 MRSA，顯示農畜業為 MRSA 濃度較高之場所，而 2012 年 Hsiao 等人於台灣醫療院所分別以 Andersen impactor 與 Cassette 測得最高濃度為 7.4 與 2.8 CFU/m³ 之 MRSA，顯示於長期經消毒控制之場所，MRSA 空氣濃度較低。研究者可透過上述資訊選擇適當採樣器、採樣介質與採樣時間進行環境監測，而避免收集到過量或過低無法計數或採信之數據。另，2011 年 Perez 等人指出於廚房等儲放垃圾之區域存在較高濃度具抗藥性之 *S. aureus*，原因係可能與農畜業長期使用抗生素促進動物生長與控管疾病有關[9]，亦即於處理食品之相關環境採樣時，除取得濃度資料外，若能進一步分析其菌種抗藥性，應更有助於暴露風險之評估。此外，採樣點之細菌濃度亦可能隨風向、溫濕度與日光照射等環境因子而變動[16]，故取得具代表性之樣本，除考量採樣地點特性與所在位置外，應在不影響採樣效能與生物活性之前提下，進行足夠時間之空氣採樣[67]。以生物氣膠採樣器而言，文獻指出衝擊式採樣器，如 Andersen impactor 較適用於空氣中細菌濃度較低之環境，然大於 10 分鐘之空氣採樣即可能使收集於培養基上細菌受到乾燥影響而導致可培養性下降，因此普遍建議採樣時間介於 1-10 分鐘較為適當[67]。而液體採樣器相較於 Andersen impactor，其適用採樣時間較長，然以 AGI-30 為例，研究指出由於微生物於採樣過程中之再氣膠化現象[62]及細菌反覆撞擊收集液面與瓶壁導致其活性下降等情形[63]，一般而言，其採樣時間建議宜於 30 分鐘內[28]。另，本研究結果與過往研究指出，以濾紙為採樣介質之 IOM 與 Cassette 相較於上述兩類採樣器而言，其流量(IOM：2 Lpm，Cassette：4 Lpm)與採樣效能較低[29, 30]；IOM 於實場採樣曾採用之採樣時間為 150 分鐘至 4 小時[18, 31]，而 Cassette 為 15-60 分鐘[11, 28]，延長採樣時間雖能收集到較大量之空氣樣本，然易使濾紙於採樣過程中逐漸乾燥而可能使收集於其上之細菌活性與可培養性下降[30]。

除考量採樣器種類外，由於實場環境存在許多非 *S. aureus* 之雜菌，故若採用培養法作為樣本定量 *S. aureus* 條件，則需藉重使用選擇性培養基以及一系列生化鑑定流程來排除非 *S. aureus* 之雜菌干擾。然 2012 年 Hsiao 等人研究發現，以 Andersen impactor 搭配選擇性培養基 CSA 於暴露艙採樣時雖能收集到 *S. aureus* (ATCC 29213)，然而於實場採樣時，CSA 之敏感性下降至 24.1%[11]，亦即環境空氣中之 *S. aureus* 於 CSA 上生長且被鑑別出來之能力有限，CSA 本身之成份為商業機密故無法討論，然

Hsiao 等人推測其可能與環境中存在之抑制物[68]、不同地域來源之菌種酵素活性不同[69]以及環境中不同菌群於培養基上競爭生長[70]有關。舉例而言，Tebbe 與 Vahjen 於 2003 年研究指出土壤樣本中存在之腐植酸(humic acid)會抑制土壤樣本 DNA 被於 PCR 中放大，原因係 humic acid 會抑制 DNA 聚合酶之活性[68]；另 Alvarez 等人將以 AGI-30 採樣後之水樣過濾(pore size, 0.22 μ m)與未過濾之樣本，分別加入 102 CFU 之 *E. coli*，其中 10mL 未過濾樣本中之 DNA 於 PCR 放大過程中被抑制，此結果可能與 DNA 聚合酶之活性被空氣中抑制物干擾有關[71]，上述現象顯示環境樣本中可能存在抑制酵素活性之抑制物。而以本研究建議應用於實場採樣之選擇性培養基 MSA 而言，其鑑別方式係 *S. aureus* 醱酵培養基中甘露醇後，其代謝物產生酸性會使培養基中之酚紅指示劑轉變成黃色，若如同上述 *S. aureus* 之代謝產酸能力受環境抑制物之影響，而使 MSA 之敏感性下降，屆時需輔以其他如革蘭氏染色(Gram stain)或凝固酶測試(Coagulase test)等生化測試以排除非 *S. aureus* 之菌落。

此外，2002 年 Perry 等人研究發現由布吉納法索實驗室之糞便檢體分離出的 9 株非傷寒性沙門氏菌(non-Typhi *Salmonella*)雖可於適用於沙門氏菌的產色性培養基 ABC medium 與 modified ABC medium(MABC)上形成菌落，卻無法正常呈現綠色菌落被鑑別出來，其後實驗室以 fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- α -D-galactoside 確認上述菌株係因缺乏 α -galactosidase 以致無法於產色性培養基中呈色，然於英國(Newcastle upon Tyne, United Kingdom)與法國(Lyon, France)等實驗室之糞便檢體分離出的沙門氏菌則皆於產色性培養基上正常呈色[72]。2003 年 Perez 等人推測上述發現可能係不同地區分離出之沙門氏菌的酵素活性差異所致[69]；另，2004 年 Perry 等人評估 MRSA ID、CHROMagar MRSA 與 ORSAB 等三種產色性培養基之鑑定能力，結果顯示三種培養基對於鼻腔拭樣本中之 MRSA 分離率差異相近(MRSA ID：25/26，CHROMagar MRSA：20/25，ORSAB：21/26)，然 MRSA ID 對於會陰部拭樣本之 MRSA 分離率則高於 CHROMagar MRSA 與 ORSAB (MRSA ID：14/15，CHROMagar MRSA：8/9，ORSAB：8/10)，該研究推論此結果係與臨床樣本中其他菌群與 MRSA 於培養基上競爭生長有關[70]。上述現象皆可能為未來實場空氣採樣後分析樣本時所面臨之問題，甚至進而導致於不同環境下採樣分析結果截然不同之狀況。然若能於完成採樣後搭配其他非培養之分析方法(如以 qPCR 結合核酸染劑進行活性菌種定量)，應可避免因雜菌

干擾導致的低估環境空氣中 *S. aureus* 濃度。

另，本研究結果顯示暴露艙中 *S. aureus* 為單一粒徑分佈 (GM 為 0.77 μm ，GSD 為 1.17)，然實場環境中之 *S. aureus* 可能附著於其他微粒(如灰塵或液珠)上使粒徑變大，或呈現較為濕潤之特性，進而影響各採樣方法彼此間的相對採集效能。2012 年 Chang 等人研究指出，對收集空氣中具活性之 *L. pneumophila* 而言，於其先前之暴露艙研究中，Cassette 之採樣效能顯著低於 BioSampler 與 AGI-30，然於生物曝氣池環境採樣時，Cassette 之採樣效能則高於 BioSampler 與 AGI-30 ($p < 0.05$)，該研究指出上述現象可能與生物曝氣池相較於實驗室暴露艙潮濕，以致於使置於生物曝氣池邊的 Cassette 於採樣過程中較能維持濾紙上之 *L. pneumophila* 的生物活性有關[24]。顯示暴露艙部分研究結果可能與實場有所不同，然透過暴露艙可進行控制許多變項下的單一因子研究，不僅能釐清重要的影響因子及其影響程度外，暴露艙所獲得的結果也將有助於後續實場評估時之研究規劃。

第六節 研究限制

本研究建置之生物氣膠產生系統在控制溫濕度條件下，以單一 *S. aureus* 為對象進行評估，得以清楚呈現不同採樣方法對 *S. aureus* 之採樣效能，且因本研究以單一菌種進行採樣效能評估，因此採樣完成後無需進行菌種分離與鑑定。然於實際現場採樣後若採取培養法分析樣本，則勢必須經過適當分離與鑑定流程以確認 *S. aureus* 存在與否與其濃度值。然過往文獻指出，實際環境空氣中存在之混和菌種可能干擾 *S. aureus* 生物活性，而抑制其於選擇性培養基 CSA 上之生長[11]。環境中其他混和菌種對 *S. aureus* 生物活性之干擾程度，與不同 *S. aureus* 鑑定流程之鑑定準確度均可能會影響其檢出率[73]甚至其濃度值。然上述因應雜菌衍生的培養法分析議題均非本研究目前所探討之範疇，有待未來其他研究予以釐清。

第六章 結論與建議

第一節 結論

- 一、本研究顯示，非選擇性 TSA 在搭配 Andersen 1-STG 下，其採樣效能顯著優於其他四類選擇性 MSA、BPA、CSA 與 CSM 培養基；而四類選擇性培養基之採樣效能彼此間雖無統計上顯著差異，然以 MSA 採樣效能較佳。採樣時間方面，Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA 於採樣時間 3 分鐘時之採樣效能顯著優於採樣 6、15、30 與 60 分鐘之結果，而採樣 6、15、30 與 60 分鐘之採樣效能彼此間則未達統計上顯著差異。
- 二、對以收集液為介質之採樣器而言，其具最佳 *S. aureus* 空氣採樣效能之收集液為 Tween 80 mixture，顯著優於 PBS 與 DW 之結果，而 PBS 之採樣效能亦顯著高於 DW；此外，本研究檢定結果顯示，BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著高於 BioSampler 搭配 PBS 以及 AGI-30，且於採樣時間大於 15 分鐘時，其 R 值隨採樣時間增加而下降。
- 三、對以濾紙為介質之採樣器 IOM 或 Cassette 而言，當以 Tween 80 mixture 作為濾材潤洗液並將樣本分別加熱 15 分鐘(Gelatin filter)與震盪 2 分鐘(PC filter)時，其可獲得最佳的 *S. aureus* 回收率。在此樣本處理條件下，空氣採樣 30 至 270 分鐘之結果顯示，IOM 之採樣效能顯著高於 Cassette，且其採樣效能隨採樣時間延長而顯著下降。
- 四、進一步比較本研究之五種採樣器於相同採樣時間下(30 與 60 分鐘)之採樣效能，結果顯示，兩種採樣時間下均以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 採樣，並以 TSA 推盤培養之方法可獲得最高的 *S. aureus* 捕集效果。於採樣 30 分鐘時，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣並以 TSA 培養之結果次之；然於採樣 60 分鐘時，則以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 之採樣效能次於 BioSampler。此外，以 AGI-30 搭配 PBS、IOM 搭配 Gelatin filter 與 Cassette 搭配 PC filter 採樣 30 與 60 分鐘後，無論搭配何種培養基進行樣本分析，三者的採樣效能皆最低且彼此間未

達統計上顯著差異。

第二節 建議

- 一、實務上，由於 Andersen 1-STG 操作方式簡易且樣本可直接進行培養法分析，故被廣泛使用，然其採樣所得樣本亦因無法進一步稀釋分析，因此一般多用於有進行消毒控制之低濃度環境(如醫院候診區[11]、一般病房[8]與加護病房[13])，以避免收集到過多菌落數而無法計數之情況。本實驗針對五種採樣器之評比結果，Andersen 1-STG 之採樣效能於相同採樣時間(30 與 60 分鐘)下雖不及 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之結果，然考量長時間(6-60 分鐘)採樣下其採樣效能並未顯著下降之特性，與其使用之簡易及方便性，本研究認為於可收集到適量菌落數(30-300 CFU)之採樣時間下，Andersen 1-STG 亦不失為實場採樣時可考慮使用於採樣空氣中 *S. aureus* 之採樣器。而 Andersen 1-STG 搭配非選擇性 TSA 採樣雖具最佳採樣效能，然其可能面臨之雜菌問題亦須透過後續生化鑑定(如 Gran stain 或 Coagulase test)或分子生物學方法(如 qPCR)加以鑑別出 *S. aureus*[11]。
- 二、此外，自實務面考量 BioSampler 與 AGI-30 之適用性時，由於其以液體為採樣介質，故樣本可進一步稀釋分析採樣所得生物氣膠濃度，因此較無收集菌落數過多以至數據無法採用之問題，一般多用於農畜養殖場所高濃度之環境(如雞舍[12]、豬舍[17]與火雞舍[19])；然其皆為玻璃製作而成，因此於實場採樣時需注意採樣瓶之放置位置，避免因人為或其他疏失而使採樣瓶破碎之可能。而本實驗針對五種採樣器之評比結果，BioSampler 之採樣效能優於 AGI-30、Andersen sampler、IOM 與 Cassette；收集液中則以 Tween 80 mixture 具最佳採樣效能。考量適當長度之採樣時間可提供具代表性的樣本，且觀察數據可發現於 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 採樣 30 分鐘時，其採樣效能較不受 *S. aureus* 於 Tween 80 mixture 中複製增生之影響，故本研究認為 BioSampler 結合 Tween 80 mixture 進行 30 分鐘採樣為宜，唯需於採樣後將收集液置於 4°C 下運送回實驗室，並盡快進行樣本處理[27]。

誌 謝

本研究參與人員除本所洪柏宸副研究員、羅仕麟助理研究員外，尚包括台灣大學環境衛生研究所張靜文教授及其研究團隊等人，在此深表感激。在研究過程中，感謝參與本計畫審查之所有委員提供寶貴之審查意見，使本研究更臻於完善，謹此敬表謝忱。

參考文獻

- [1] Beggs, C.B. The Airborne Transmission of Infection in Hospital Buildings: Fact or Fiction? *Indoor and Built Environment* 2003;12(1-2):9-18.
- [2] Zetola, N.F., Francis, J.S., Francis, J.F., Nuermberger, W.R., Nuermberger, E.F. and Bishai, W.R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An emerging threat. *The Lancet Infectious Diseases* 2005;5(5):275-86.
- [3] Awad, A., Elmorsy, T., Tarwater, P., Green, C., and Gibbs, S. Air biocontamination in a variety of agricultural industry environments in egypt: A pilot study. *Aerobiologia* 2010;26(3):223-232.
- [4] Moodley, A.F., Nightingale, E.C., Stegger, M., Nielsen, S.S., Skov, R.L. and Guardabassi, L. High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among danish veterinary practitioners. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 2008;34(2):151-7.
- [5] Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and molecular research* 2003;2(1):63-76.
- [6] Noble, W.C. Dispersal of skin microorganisms. *British Journal of Dermatology* 1975;93(4):477-485.
- [7] Rutala, W.A., Katz, E.B., Sherertz, R.J. and Sarubbi, F.A. Environmental study of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic in a burn unit. *Journal of Clinical Microbiology* 1983;18(3):683-688.
- [8] Shiomori, T., Miyamoto, H., Makishima, K., Yoshida, M., Fujiyoshi, T., Udaka, T., Inaba, T. and Hiraki, N. Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. *Journal of Hospital Infection* 2002;50(1):30-35.
- [9] Perez, H.R., Johnson, R., Gurian, P.L., Gibbs, S.G., Taylor, J. and Burstyn, I. Isolation of airborne oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* from culturable air samples of urban residences. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 2011;8(2):80-85
- [10] Gandara, A., Mota, L.C., Flores, C., Perez, H.R., Green, C.F. and Gibbs, S.G. Isolation of *Staphylococcus aureus* and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from residential indoor bioaerosols. *Environmental Health Perspectives* 2006;114(12).

- [11] Hsiao, P. K., Chen, W.T., Chang, K.C., Ke, Y.J., Kuo, C.L. and Tseng, C.C. Performance of chromagar staph aureus and chromagar mrsa for detection of airborne methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Aerosol Science and Technology* 2011;46(3):297-308.
- [12] Zhong, Z.T., Chai, H., Duan, Z., Miao, X., Li, M., Yao, W., Yuan, W., Wang, Q., Li, B.A. and Schlenker, G. Rep-pcr tracking of the origin and spread of airborne *Staphylococcus aureus* in and around chicken house. *Indoor Air* 2009;19(6):511-516.
- [13] Huang, P.Y., Shi, Z.Y., Chen, C.H., Den, W., Huang, H.M. and Tsai, J.J. Airborne and surface-bound microbial contamination in two intensive care units of a medical center in central Taiwan. *Aerosol and Air Quality Research* 2013;13(3):1060-1069.
- [14] Mirzaii, M, Emaneini, M., Maleknejad, P., Jonaidi, N., Fooladi, A.A., Aligholi, M., Jabalameli, F., Halimi, S., Taherikalani, M. and Kasaeian, A. Distribution of bacterial contamination in a teaching hospital in Tehran—A special focus on *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2012;59(1):1-11.
- [15] Gehanno, J.F., Louvel, A., Nouvellon, M., Caillard, J.F. and Pestel-Caron, M. Aerial dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital rooms by infected or colonised patients. *Journal of Hospital Infection* 2009;71(3):256-262.
- [16] Schulz, J., Formosa, L., Seedorf, J. and Hartung, J. Measurement of culturable airborne *Staphylococci* downwind from a naturally ventilated broiler house. *Aerobiologia* 2011;27(4):311-318.
- [17] Schulz, J., Friese, A., Klees, S., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Rösler, U. and Hartung, J. Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology* 2012;78(16): 5666-5671.
- [18] Friese, A., Schulz, J., Hoehle, L., Fetsch, A., Tenhagen, B.A., Hartung, J. and Roesler, U. Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns. *Veterinary Microbiology* 2012;158(1):129-135.
- [19] Friese, A., Schulz, J., Zimmermann, K., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Hartung, J. and Rösler, U. Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity. *Applied and environmental microbiology* 2013;79(8):2759-2766.

- [20] Willeke, K., Lin, X. and Grinshpun, S.A. Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion. *Aerosol Science and Technology* 1998;28(5):439-456.
- [21] Wang, Z., Reponen, T., Grinshpun, S.A., Górný, R.L. and Willeke, K. Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. *Journal of Aerosol Science* 2001;32(5):661-674.
- [22] Han, T. and Mainelis, G. Investigation of inherent and latent internal losses in liquid-based bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science* 2012;45: 58-68.
- [23] Chang, C.W. and Chou, F.C. Assessment of bioaerosol sampling techniques for viable *Legionella pneumophila* by ethidium monoazide quantitative PCR. *Aerosol Science and Technology* 2011;45(3):343-351.
- [24] Chang, C.W. and Hung, P.Y. Evaluation of sampling techniques for detection and quantification of airborne legionellae at biological aeration basins and shower rooms. *Journal of Aerosol Science* 2012;48(0):63-74.
- [25] Reanprayoon, P. and Yoonaiwong, W. Airborne concentrations of bacteria and fungi in Thailand border market. *Aerobiologia* 2012;28(1):49-60.
- [26] Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., Schwab, K.. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives* 2005;113(2):137.
- [27] Li, C.S. and Lin, Y.C. Storage effects on bacterial concentration: determination of impinger and filter samples. *Science of the total environment* 2001;278(1):231-237.
- [28] Thorne, P.S., Kiekhaefer, M.S., Whitten, P. and Donham, K.J. Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Applied and Environmental Microbiology* 1992;58(8):2543-2551.
- [29] Chang, C.W., and Chou, F.C. Methodologies for quantifying culturable, viable, and total *Legionella pneumophila* in indoor air. *Indoor Air* 2011;21(4):291-9.30.
- [30] Li, C.S., Hao, M.L., Lin, W.H., Chang, C.W. and Wang, C.S., Evaluation of Microbial Samplers for Bacterial Microorganisms. *Aerosol Science and Technology* 1999;30(2):100-108.
- [31] Dutil, S., Veillette, M., Mériaux, A., Lazure, L., Barbeau, J., Duchaine, C. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environmental microbiology* 2007;9(11):2836-2843.

- [32] Rule, A.M., Kesavan, J., Schwab, K.J., Buckley, T.J. Application of Flow Cytometry for the Assessment of Preservation and Recovery Efficiency of Bioaerosol Samplers Spiked with *Pantoea agglomerans*. *Environmental Science & Technology* 2007;41(7):2467-2472.
- [33] Chen, P.S. and Li, C.S. Sampling Performance for Bioaerosols by Flow Cytometry with Fluorochrome. *Aerosol Science and Technology* 2005;39(3):231-237.
- [34] Lai, M., Moschandreas, D. and Pagilla, K. Airborne bacteria control under chamber and test-home conditions. *Journal of Environmental Engineering* 2003;129(3):202-208.
- [35] Chang, C.W., Li, S.Y., Huang, S.H., Huang, C.K., Chen, Y.Y. and Chen, C.C. Effects of ultraviolet germicidal irradiation and swirling motion on airborne *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* under various relative humidities. *Indoor Air* 2013;23(1):74-84
- [36] Tseng, C.H., Wang, H.C., Xiao, N.Y. and Chang, Y.M. Examining the feasibility of prediction models by monitoring data and management data for bioaerosols inside office buildings. *Building and Environment* 2011;46(12): 2578-2589.
- [37] Li, C.S., Tseng, C.C., Lai, H.H. and Chang, C.W. Ultraviolet germicidal irradiation and titanium dioxide photocatalyst for controlling *Legionella pneumophila*. *Aerosol Science & Technology* 2003;37(12):961-966.
- [38] Tseng, C.C. and Li, C.S. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *Journal of Aerosol Science* 2005;36(5-6):593-607.
- [39] Macher, J. and Burge, H. Sampling biological aerosols. in *Air Sampling Instruments* (Cohen BS, McGammon CS, eds). 9th ed. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2001.
- [40] Deloge-Abarcan, M., Ha, T.L., Robine, E., Zmirou-Navier, D., Mathieu, L. Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH). *Journal of environmental monitoring* 2007;9(1):91-97.
- [41] Thompson, M.W., Donnelly, J., Grinshpun, S.A., Juozaitis, A. and Willeke, K. Method and test system for evaluation of bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science* 1994;25(8):1579-1593.
- [42] Stewart, S.L., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Terzieva, S., Ulevicius, V. and Donnelly, J. Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Applied and Environmental Microbiology* 1995;61(4): 1232-9.

- [43] Sato, M.I.Z., Sanchez, P.S., Alves, M.N., Stoppe, N.C. and Martins, M.T. Evaluation of culture media for *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* recovery in swimming pools. *Water Research* 1995;29(10):2412-2416.
- [44] Kim, H.J. and Oh, S.W. Performance comparison of 5 selective media used to detect *Staphylococcus aureus* in foods. *Food Science and Biotechnology* 2010;19(4):1097-1101.
- [45] Saito, E., Yoshida, N., Kawano, J., Shimizu, A. and Igimi, S., Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation to culture methods. *Journal of Veterinary Medical Science* 2011;73(3):287-292.
- [46] Baird-Parker, A.C. and Davenport, E. The Effect of Recovery Medium on the Isolation of *Staphylococcus aureus* after Heat Treatment and after the Storage of Frozen or Dried Cells. *Journal of Applied Microbiology* 1965;28(3):390-402.
- [47] De Buyserfl, M.L., Audinet, N., Delbart, M.O., Maire, M. and Françoise, F. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive *Staphylococci* in cheeses made from raw milk. *Food Microbiology* 1998;15(3):339-346.
- [48] Carricajo, A., Treny, A., Fonsale, N., Bes, M., Reverdy, M.E., Gille, Y., Aubert, G. and Freydiere, A.M. Performance of the chromogenic medium CHROMagar *Staph aureus* and the Staphychrom coagulase test in the detection and identification of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39(7):2581-2583.
- [49] Perez, J. M., Cavalli, P., Roure, C., Renac, R., Gille, Y. and Freydiere, A. M. Comparison of Four Chromogenic Media and Hektoen Agar for Detection and Presumptive Identification of *Salmonella* Strains in Human Stools. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41(3):1130-1134.
- [50] Chapman, G.H., The significance of sodium chloride in studies of *Staphylococci*. *Journal of bacteriology* 1945;50(2):201.
- [51] Sharp, S.E. and Searcy, C. Comparison of mannitol salt agar and blood agar plates for identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* in specimens from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(12):4545-4546.

- [52] Bautista-Trujillo, G.U., Solorio-Rivera, J.L., Rentería-Solórzano, I., Carranza-Germán, S.I., Bustos-Martínez, T.A., Arteaga-Garibay, R.I., Baizabal-Aguirre, V.M., Cajero-Juárez, M., Bravo-Patiño, A. and Valdez-Alarcón, J.J. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of medical microbiology* 2013;62(Pt 3):369-376.
- [53] Buttner, M.P. and Stetzenbach, L.D. Evaluation of four aerobiological sampling methods for the retrieval of aerosolized *Pseudomonas syringae*. *Applied and environmental microbiology* 1991;57(4):1268-1270.
- [54] Li, C.S. and Y.C. Lin, Sampling Performance of Impactors for Bacterial Bioaerosols. *Aerosol Science and Technology* 1999;30(3):280-287.
- [55] Li, C.S. and Lin, Y.C. Sampling Performance of Impactors for Fungal Spores and Yeast Cells. *Aerosol Science and Technology* 1999;31(2-3):226-230.
- [56] Francisco, J.P., Manuel, F., Oscar M.N., Maria, V.C., Miguel, A., Fuensanta, R. and Antonio, B., Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology Techniques* 1998;12(3):183-186.
- [57] Emanuilova, E., Kambourova, M., Dekovska, M. and Manolov, R. Thermoalkalophilic lipase-producing *Bacillus* selected by continuous cultivation. *FEMS Microbiology Letters* 1993;108(2):247-250.
- [58] Gould, S.W., Chadwick, M., Cuschieri, P., Easmon, S., Richardson, A.C., Price, R.G. and Fielder, M.D. The evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of lipolytic activity in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and MRSA from two European study groups. *FEMS Microbiology Letters* 2009;297(1):10-16.
- [59] Prema, P., Bharathy, S., Palavesam, A., Sivasubramanian, M. and Immanuel, G. Detection, purification and efficacy of warnerin produced by *Staphylococcus warneri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006;22(8):865-872.
- [60] Gray, V.L., Müller, C.T., Watkins, I.D. and Lloyd, D. Peptones from diverse sources: pivotal determinants of bacterial growth dynamics. *Journal of Applied Microbiology* 2008;104(2):554-565.
- [61] Chang, C.W., Chou, F.C. and Hung, P.Y. Evaluation of bioaerosol sampling techniques for *Legionella pneumophila* coupled with culture assay and quantitative PCR. *Journal of Aerosol Science* 2010;41(12):1055-1065.

- [62] Grinshpun, S.A., Willeke, K., Ulevicius, V., Juozaitis, A., Terzieva, S., Donnelly, J., Stelma, G.N. and Brenner, K.P. Effect of impaction, bounce and reaerosolization on the collection efficiency of impingers. *Aerosol Science and Technology* 1997;26(4):326-342.
- [63] Terzieva, S., Donnelly, J., Ulevicius, V., Grinshpun, S.A. Willeke, K., Stelma, G.N. and Brenner, K.P. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and environmental microbiology* 1996;62(7):2264-2272.
- [64] Lin, X., Reponen, T.A., Willeke, K., Grinshpun, S.A., Foarde, K.K. and Ensor, D.S. Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid. *Atmospheric Environment* 1999;33(26):4291-4298.
- [65] Rule, A.M., Schwab, K.J., Kesavan, J. and Buckley, T.J. Assessment of Bioaerosol Generation and Sampling Efficiency Based on *Pantoea agglomerans*. *Aerosol Science and Technology* 2009;43(6):620-628.
- [66] Li, C.S. Tseng, C.C., Lai, H.H. and Chang, C.W. Ultraviolet Germicidal Irradiation and Titanium Dioxide Photocatalyst for Controlling *Legionella pneumophila*. *Aerosol Science and Technology* 2003;37(12):961-966.
- [67] Albrecht, A., Kiel, K. and Kolk, A. Strategies and methods for investigation of airborne biological agents from work environments in Germany. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics* 2007;13(2):201.
- [68] Tebbe, C.C. and Vahjen, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and environmental microbiology* 1993;59(8):2657-2665.
- [69] Perez, J.M., Cavalli, P., Roure, C., Renac1, R., Gille, Y. and Freydiere, A.M. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41(3):1130-1134.
- [70] Perry, J.D., Davies, A., Butterworth, L.A., Hopley, A.L.J., Nicholson, A. and Gould, F.K. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42(10):4519-4523.

- [71] Alvarez, A.J., Buttner, M.P. and Stetzenbach, L.D. PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference. *Applied and environmental microbiology* 1995;61(10):3639-3644.
- [72] Perry, J.D., Riley, G., Gould, F.K., Perez, J.M., Boissier, E., Ouedraogo, R.T. and Freydière, A.M. Alafosfalin as a selective agent for isolation of Salmonella from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40(11):3913-3916.
- [73] Luteijn, J.M., Hubben, G.A., Pechlivanoglou, P., Bonten, M.J. and Postma, M.J. Diagnostic accuracy of culture- based and PCR- based detection tests for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a meta- analysis. *Clinical Microbiology and Infection* 2011;17(2):146-154.

國家圖書館出版品預行編目(CIP)資料

致病菌空氣採樣方法效能評估：金黃色葡萄球菌 /
洪柏宸，張靜文研究主持。 -- 1 版。 -- 新北
市：勞動部勞研所，民 103.03
面；公分
ISBN 978-986-04-0755-6(平裝)

1. 職業衛生

412.53

103004978

致病菌空氣採樣方法效能評估-金黃色葡萄球菌

著（編、譯）者：洪柏宸、張靜文

出版機關：勞動部勞動及職業安全衛生研究所

22143 新北市汐止區橫科路 407 巷 99 號

電話：02-26607600 <http://www.ilosh.gov.tw/>

出版年月：中華民國 103 年 3 月

版（刷）次：1 版 1 刷

定價：200 元

展售處：

五南文化廣場

台中市區中山路 6 號

電話：04-22260330

國家書店松江門市

台北市松江路 209 號 1 樓

電話：02-25180207

- 本書同時登載於本所網站之「出版中心」，網址為
<http://www.ilosh.gov.tw/wSite/np?ctNode=273&mp=11>
- 授權部分引用及教學目的使用之公開播放與口述，並請注意需註明資料來源；有關重製、公開傳輸、全文引用、編輯改作、具有營利目的公開播放行為需取得本所同意或書面授權。

【版權所有，翻印必究】

GPN: 1010300895

ISBN: 978-986-04-0755-6