

國立台灣大學公共衛生學院環境衛生研究所

碩士論文

Institute of Environmental Health

College of Public Health

National Taiwan University

Master Thesis

大台北都會區車輛雨刷水之退伍軍人菌污染調查

A Survey of *Legionellae* Contamination in Windshield

Wiper Fluid of Vehicles in Taipei Metropolitan Area



許雅婷

Ya-Ting Hsu

指導教授：張靜文 博士

Ching-Wen Chang, Ph.D

中華民國一百零一年十一月

November, 2012

## 致謝

首先感謝我的指導老師張靜文教授，謝謝老師兩年多來的耐心且細心的指導，從老師身上我學到很多，不僅僅是學術上的專業知識，老師也是時常孜孜不倦教導我們很多做人處事的道理，謝謝老師，總是不厭其煩的教導且苦口婆心希望我們更好，永遠尊敬且以老師為榜樣！另外更要謝謝擔任我口試委員的林嘉明老師和趙馨老師，兩位老師都給了我很多對於研究及論文上的意見，深深的謝謝老師們，讓我能夠在論文上有更為清楚的改善方向，且肯定我在研究上的努力，謝謝老師們。

謝謝實驗室的藝瑋，一路走來，沒有你的幫忙就不會有這個研究的完成，有你這個貼心的學妹真的很幸福！還有一起奮鬥兩年的實驗室夥伴念慈和忠龍，有好多酸甜苦辣的回憶阿～讓我們一起闖關成功吧！謝謝乃慈、維真、聆文、星儀和珮瑜學姐們對我的關心和鼓勵！謝謝佳蓉、儷瑾、凱鈞和楚雲學弟妹們，謝謝你們總是為我打氣～

謝謝慧明寶貝，研究所一路走來，我們互相分享了多少又走過了多少風雨，有姐妹在同一個研究所真的是幸福呀！雖然我都重色輕友～但是你懂我的哈哈！謝謝環衛所的同班同學們，雖然大家都忙於研究，但是還是很珍惜和你們在一起的這些日子！謝謝親愛的～沒有你我走不過來，謝謝你總是陪我實驗到凌晨，總是買好早午晚餐等我出實驗室吃，總是不斷連哄帶騙陪伴我完成每一個關卡，謝謝在研究所遇見你，讓我從一個愛哭鬼變成愛笑鬼！愛你！謝謝我的好姐妹們，每次見面約會就是一臉憔悴樣，好窩心有你們聽我哀嚎啦！

還有更要謝謝在環境採樣一路上曾經幫助過我的人，不管是汽車維修廠、計程車服務站、勞檢處、經濟部工業局、安養院、工業區服務中心和各個公司行號，謝謝各位長官們的幫忙讓我的研究更加順利！最後，謝謝爸媽和妹妹，一路支持我，有你們的支持讓我更加充滿勇氣完成這個階段，也感恩你們辛苦拉拔我長大，我會好好孝順你們的！

## 摘要

過去文獻指出職業駕駛或長時間開車者有較高的退伍軍人菌感染風險，而暴露來源可能為車體雨刷水系統遭退伍軍人菌污染，且添加雨刷精之車輛使用者的感染風險顯著較低，然目前缺少詳細的暴露調查數據。研究目的除了評估及定量車輛中之雨刷水其退伍軍人菌污染狀況，另收集相關影響因子，以探討「水質條件」、「車體資訊及用車習慣」和「雨刷水操作維護」如何影響雨刷水中退伍軍人菌檢出及孳生。本研究於台北大都會地區以立意採樣方式，採集民眾自用車及計程車中的雨刷水桶內及其雨刷水出水口的水樣，除進行培養法分析外，並以聚合酶連鎖反應搭配核酸染劑定量樣本中活性及總退伍軍人菌濃度。

在 59 輛的研究對象中，雨刷水中之總退伍軍人菌屬陽性檢出率介於 90.4%-98.3%，陽性樣本之濃度介於  $3.8 \times 10^1 - 1.9 \times 10^8$  cells/mL，而總嗜肺性退伍軍人菌陽性檢出率為 75.4%-78.9%；陽性樣本之檢出濃度介於  $5.7 \times 10^0 - 7.6 \times 10^3$  cells/mL；活性方面，活性退伍軍人菌屬陽性檢出率介於 88.5%-94.7%，其陽性樣本濃度介於  $4.9 \times 10^0 - 1.8 \times 10^8$  cells/mL，而活性嗜肺性退伍軍人菌陽性檢出率為 59.6%-57.9%，陽性樣本之檢出濃度介於  $1.1 \times 10^1 - 4.0 \times 10^3$  cells/mL；在可培養性部分，退伍軍人菌屬陽性檢出率為 42.3%-56.1%，但嗜肺性退伍軍人菌只有 28.1%-32.7%。計算其雨刷水出水口濃度/雨刷水桶濃度 (O/T) 比值大於 1，顯示雨刷出水口的 *Legionella* 平均濃度較雨刷水桶內高，顯示雨刷水管線可能有 *Legionella* 污染現象。

雨刷水的基質為自來水，比較自來水與雨刷水之水質條件發現自來水之濁度、導電度、總溶解固體 (TDS)、溶解性有機碳 (DOC) 與異營性細菌 (HPC) (1.8NTU、87.8 $\mu$ S/cm、41.6 mg/L、小於 1ppm 和  $4.4 \times 10^3$  CFU/mL) 顯著低於雨刷水 (27.5NTU、382.2 $\mu$ S/cm、204.1mg/L、3259.7ppm 和  $6.2 \times 10^6$  CFU/mL, P=0.02、0.01、0.01、0.01 和 0.003)，且自來水中總退伍軍人菌屬 ( $1.9 \times 10^2$  cells/mL) 及其活性退伍軍人菌屬 ( $2.0 \times 10^1$  cells/mL) 均顯著低於雨刷水 ( $4.2 \times 10^6$  及  $3.5 \times 10^6$  cells/mL)，約分別為

21842 和 175000 倍，顯示雨刷水的水質富含有機營養物質，使其利於退伍軍人菌孳生與存活，因而導致其雨刷水的汙染狀況較自來水嚴重。

以 Generalized estimating equation (GEE)分析雨刷水退伍軍人菌汙染之影響因子的模式中，總及活性之退伍軍人菌屬的檢出濃度顯著受到硬度負向影響 ( $\beta=-0.011, P<0.0001$  和  $\beta=-0.01, P=0.001$ )；在嗜肺性退伍軍人菌方面，硬度亦負向顯著影響總及活性之嗜肺性退伍軍人菌濃度 ( $\beta=-0.007, P<0.0001$  和  $\beta=-0.007, P=0.01$ )，另外在導電度越高時，其總及活性嗜肺性退伍軍人菌之濃度也會增高 ( $\beta=0.0003, P<0.0001$  和  $\beta=0.0005, P=0.0001$ )，在模式中亦可發現雨刷清潔劑添加頻率小於每 6 個月添加 1 次者其車中雨刷水中總及活性嗜肺性退伍軍人菌的濃度顯著低於添加頻率大於每 6 個月添加 1 次者 ( $\beta=-0.24, P=0.0013$  和  $\beta=-0.58, P<0.001$ )，而若欲控制雨刷水中退伍軍人菌汙染時應考量上述危險因子。

在 59 輛的研究對象中包括計程車輛 (職業駕駛)及民眾自用車 (非職業駕駛)，發現職業駕駛者其車輛平均車齡較非職業駕駛車輛低，由於職業駕駛開車頻率高且開車時數長，加上職業駕駛添加雨刷清潔劑及雨刷水的頻率較高，因而發現在職業駕駛者其車輛雨刷水中總及活性退伍軍人菌屬濃度 ( $1.5 \times 10^6$  和  $1.9 \times 10^5$  cells/mL)低於非職業駕駛 ( $4.9 \times 10^6$  和  $4.6 \times 10^6$  cells/mL)，顯示在用車頻繁的情況下，能夠定期進行雨刷水操作及維護者，可降低雨刷水中的退伍軍人菌汙染情況。整體而言，本研究發現添加雨刷清潔劑無法完全抑制雨刷水中的退伍軍人菌滋生，但其雨刷水的操作維護及用車習慣會影響雨刷水中的退伍軍人菌檢出及孳生。

關鍵字:嗜肺性退伍軍人菌、退伍軍人菌、雨刷水、雨刷精、職業駕駛

## Abstract

Previous studies show that occupational drivers infecting Legionnaires' disease significantly greater than the general population, which is considered to be associated with *Legionella* contamination in windshield wiper fluid. The use of screen wash seems to reduce the infection risk; however, thorough environmental surveillance is unavailable. The objectives of this study is evaluating the concentration of *Legionella* in windshield fluids of vehicles and collecting the impact factors of "water quality", "information of vehicles" and "maintenance of wiper fluid" to determine how they affect the presence and abundance of *Legionella* in wiper fluid samples. Thus, water samples were collected from the tank and outlet of the windshield wiper system of the vehicles selected in Taipei metropolitan area with purposive sampling. Except of culture assay for culturable *Legionella*, total and viable *Legionella* were quantified using quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) coupled with ethidium monoazide.

Total and viable *Legionella* spp. was detected in the range of 90.4%-98.3% and 88.5%-94.7%, for which the range of concentrations were  $3.8 \times 10^1$  -  $1.9 \times 10^8$  and  $4.9 \times 10^0$  -  $1.8 \times 10^8$  cells/mL, respectively. Total and viable *L. pneumophila* was detected in the range of 75.4%-78.9% and 59.6%-57.9%, respectively, and the range of concentration was  $5.7 \times 10^0$  -  $7.6 \times 10^3$  and  $1.1 \times 10^1$  -  $4.0 \times 10^3$  cells/mL. In addition, culturable *Legionella* spp. and *L.pneumophila* were detected in range of 42.3%-56.1% and 28.1%-32.7%. In the 59 subjects' vehicles, *Legionella* concentration in outlet samples was greater than that in tank samples, indicating that *Legionella* contamination in their wiper fluid pipeline.

Because wiper fluid came from tap water, we compared the water quality between wiper fluid and tap water samples. It indicated that the turbidity, conductivity, TDS, DOC and HPC of tap water (1.8 NTU、87.8  $\mu$ S/cm、41.6 mg/L、less than 1 ppm and  $4.4 \times 10^3$

CFU/mL) is significantly higher than the wiper fluid's (27.5 NTU 、 382.2  $\mu\text{S}/\text{cm}$  、 204.1 mg/L 、 3259.7 ppm and  $6.2 \times 10^6$  CFU/mL,  $P=0.02$  、 0.01 、 0.01 、 0.01 and 0.003). Besides, total and viable *Legionella* spp. concentration in tap water ( $1.9 \times 10^2$  and  $2.0 \times 10^1$  cells/mL) was significantly lower (21842x and 175000x) than wiper fluid ( $4.2 \times 10^6$  and  $3.5 \times 10^6$  cells/mL), respectively. It indicated that the abundant organic materials in wiper fluid which accelerated the propagation and viability of *Legionella*.

Generalized estimating equation (GEE) model analyzed the association between impact factors and *Legionella* contamination. Total and viable *Legionella* spp. concentrations were negatively associated with hardness ( $\beta=-0.011$ ,  $P<0.0001$  and  $\beta=-0.01$ ,  $P=0.001$ ). On the other hand, total and viable *L. pneumophila* concentrations were increased with conductivity ( $\beta=0.0003$ ,  $P<0.0001$  and  $\beta=0.0005$ ,  $P=0.0001$ ). Furthermore, the total and viable *L. pneumophila* concentrations in wiper fluid samples which were added detergent solution below every six months was significantly lower than the vehicles which were adding detergent solution over every six months ( $\beta=-0.24$ ,  $P=0.0013$  and  $\beta=-0.58$ ,  $P<0.001$ ). These risk factors should be considered in the control of *Legionella* contamination in wiper fluid.

In this study, Professional driver's vehicle age was younger than non-professional driver. Besides, the frequency of adding detergent solution in professional drivers were higher than non-professional drivers ; it might associated with high driving frequency and average driving time per day of professional drivers. Therefore, it found that total and viable *Legionella* spp. concentration in professional driver's wiper fluid ( $1.5 \times 10^6$  and  $1.9 \times 10^5$  cells/mL) was lower than the non-professional driver's ( $4.9 \times 10^6$  and  $4.6 \times 10^6$  cells/mL,  $p=0.13$  and 0.07). In conclusion, even in the high driving frequency condition, the proper and frequent maintenance for wiper fluid might decrease the contamination of *Legionella*. Moreover, adding screen wash in windshield could not

significantly inhibit the growth of *Legionella*, but the habit of vehicle use and maintenance of wiper fluid could affect the presence and abundance of *Legionella* in wiper fluid samples.

Key words: *Legionella pneumophila*, *Legionella*, windshield wiper fluid, screen wash, professional driver



## 目錄

致謝 .....	i
摘要 .....	ii
Abstract.....	iv
圖目錄 .....	xi
表目錄 .....	xiii
第一章 文獻回顧 .....	1
1.1 退伍軍人菌及其環境影響因子.....	1
1.2 退伍軍人病.....	6
1.3 職業駕駛與退伍軍人病.....	7
1.4 車內空調系統與退伍軍人病.....	9
1.5 雨刷水與退伍軍人病.....	11
1.6 車輛雨刷系統之原理與結構.....	12
1.7 車體退伍軍人菌汙染之可能的暴露機制.....	14
1.8 研究動機及其重要性.....	15
第二章 研究目的 .....	16
第三章 研究架構 .....	17
第四章 材料與方法 .....	18
4.1 環境採樣策略.....	18
4.1.1 採樣對象.....	18
4.1.2 採樣位置.....	18
4.1.3 採樣方式.....	18
4.1.4 採樣時間及採樣數量.....	19
4.1.5 運送條件.....	20
4.2 培養基及緩衝液.....	20



4.2.1 R2A 培養基.....	20
4.2.2 NA 培養基.....	20
4.2.3 BCYE $\alpha$ 培養基.....	20
4.2.4 DGVP 培養基.....	21
4.2.5 磷酸鹽緩衝液 (PBS).....	22
4.2.6 TE 緩衝液.....	22
4.2.7 酸性緩衝液 (KCl-HCl buffer).....	22
4.3 樣本分析.....	23
4.3.1 樣本前處理.....	24
4.3.2 EMA 分析.....	25
4.3.3 DNA 萃取.....	25
4.3.4 Real-time 分析.....	25
4.3.5 培養法分析.....	29
4.4 物化因子量測.....	31
4.4.1 餘氯.....	31
4.4.2 濁度.....	32
4.4.3 硬度.....	32
4.4.4 pH 值.....	32
4.4.5 導電度及總固體溶解質.....	33
4.4.6 溶解性有機碳.....	33
4.5 影響因子的評估.....	33
4.6 評估指標.....	34
4.7 統計分析.....	34
4.7.1 數據處理.....	34
4.7.2 統計方法.....	35

第五章 結果.....	38
5.1 採樣對象.....	38
5.1.1 採樣對象之用车資訊.....	38
5.1.2 採樣對象之雨刷水操作維護.....	39
5.2 雨刷水之 <i>Legionella</i> 分析 .....	41
5.2.1 雨刷水 <i>Legionella</i> 陽性樣本數與陽性檢出率 .....	41
5.2.2 雨刷水 <i>Legionella</i> 陽性樣本之檢出濃度 .....	44
5.2.3 雨刷水桶與其出水口之 <i>Legionella</i> .....	46
5.3 雨刷水之水質因子.....	62
5.3.1 雨刷水桶與其出水口之水質檢出情形.....	62
5.3.2 雨刷水桶與其出水口各水質指標陽性樣本之數值分布.....	63
5.3.4 異營性細菌濃度與其他水質因子之相關性分析.....	67
5.4 雨刷水 <i>Legionella</i> 污染之單變項分析 .....	68
5.4.1 有無檢出 <i>Legionella</i> .....	68
5.4.2 <i>Legionella</i> 濃度 .....	77
5.5 雨刷水 <i>Legionella</i> 污染之多變項分析 .....	90
5.5.1 有無檢出 <i>Legionella</i> 之多變項模式 .....	90
5.5.2 <i>Legionella</i> 濃度與之多變項模式 .....	92
5.6 職業駕駛與非職業駕駛之車輛資訊、雨刷水操作維護與雨刷水中 <i>Legionella</i> .....	99
5.6.1 職業駕駛與非職業駕駛其車輛的退伍軍人菌污染.....	99
5.6.2 職業駕駛與非職業駕駛之車輛資訊及雨刷水操作維護.....	100
5.7 自來水之 <i>Legionella</i> 與水質因子 .....	104
5.7.1 自來水之 <i>Legionella</i> .....	104
5.7.2 自來水之水質因子.....	105

5.8 自來水與雨刷水之比較.....	106
5.8.1 <i>Legionella</i> .....	106
5.8.2 比較自來水與雨刷水之水質.....	110
第六章 討論 .....	114
第七章 結論 .....	120
第八章 文獻引用 .....	123
附錄 .....	129



## 圖目錄

Figure 1 The system of windshield wiper fluid .....	14
Figure 2 The exposure mechanism of <i>Legionella</i> contamination in vehicles to driver and passenger .....	15
Figure 3 Determination of the impact factors to <i>Legionella</i> contamination in vehicles .....	17
Figure 4 Sampling at the tank (A) and the outlet (B) of wiper fluid samples.....	19
Figure 5 The study design of determining the concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid and tap water samples.....	24
Figure 6 Ratio of of <i>Legionella</i> spp. concentration in outlet and tank (O/T) of wiper fluid samples .....	47
Figure 7 Ratio of of <i>L.pneumophila</i> concentration in outlet and tank (O/T) of wiper fluid samples .....	50
Figure 8 Percentage of total (above) and viable (below) <i>L.pneumophila</i> positive and negative samples in different dilution of detergent solution (*:Non-detected).....	72
Figure 9 Percentage of viable <i>L.pneumophila</i> in different frequency of adding detergent solution (*:Non-detected).....	73
Figure 10 Average vehicle ages of <i>L.pneumophila</i> positive and negative samples ..	75
Figure 11 Percentage of total (above) and viable (below) <i>L.pneumophila</i> in different average driving time (*:Non-detected) .....	76
Figure 12 Concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples of washing tank or not .....	81
Figure 13 Concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples of adding detergent solution or not .....	82
Figure 14 Concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples of adding commercial	

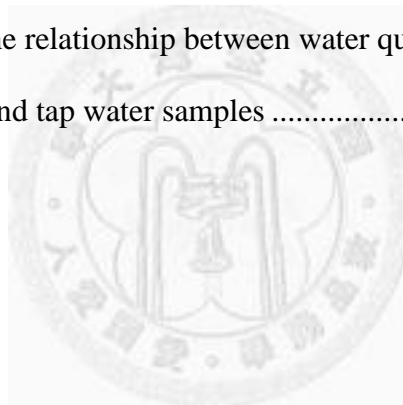
screen wash or household cleaner.....	83
Figure 15 Concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples in different dilution of detergent solution (*:Non-detected).....	84
Figure 16 Concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples in different frequency of adding detergent solution .....	85
Figure 17 Total and viable <i>Legionella</i> spp. concentration in different frequency of adding tap water .....	86
Figure 18 Concentration of total <i>Legionella</i> spp. in different driving frequency .....	89
Figure 19 Prevalence of taxi and private car in wiper fluid samples .....	99
Figure 20 Abundance of taxi and private car in wiper fluid samples .....	99
Figure 21 Comparison of positive rate of <i>Legionella</i> between wiper fluid and tap water samples (*:Non-detected, detection limit for <i>Legionella</i> spp. and <i>L. pneumophila</i> : 4.60 cells/mL and 3.03 cells/mL) .....	106
Figure 22 Comparison of concentration of <i>Legionella</i> between wiper fluid and tap water samples.....	107
Figure 23 Comparison of <i>Legionella</i> concentration between wiper fluid and tap water samples collected from five different locations .....	109
Figure 24 Comparison of the water quality between tap water and wiper fluid samples (*:Non-detected) .....	111

## 表目錄

Table 1 The relationship between the water quality and detection of <i>Legionella</i> .....	3
Table 2 The risk factors of <i>Legionella</i> disease in the epidemiology study .....	8
Table 3 The researches of occupational drivers and Legionnaires' Disease .....	10
Table 4 The environmental studies of <i>Legionella</i> contamination in vehicles.....	13
Table 5 The direct-reading instruments for detecting the water quality .....	19
Table 6 The vehicle information of private cars and taxis .....	38
Table 7 Wiper fluid maintenance of all vehicles.....	40
Table 8 Prevalence of <i>Legionellae</i> in wiper fluid samples of tank and outlet <sup>a</sup> .....	43
Table 9 Concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples of tank and outlet.....	45
Table 10 Number of wiper fluid samples with detection of <i>Legionella</i> spp. in tank and outlet of wiper fluid .....	46
Table 11 Ratio of <i>Legionella</i> spp. concentration in Outlet and Tank samples (O/T) <sup>a</sup> ..	48
Table 12 Number of wiper fluid samples with detection of <i>L. pneumophila</i> in tank and outlet of wiper fluid system .....	49
Table 13 Ratio of <i>L. pneumophila</i> concentration in Outlet and Tank samples (O/T) <sup>a</sup> ..	50
Table 14 Number of wiper fluid samples with detection of total, viable, and culturable <i>Legionella</i> spp. in tank and outlet.....	52
Table 15 Number of wiper fluid samples with detection of total, viable, and culturable <i>L. pneumophila</i> in tank and outlet.....	53
Table 16 Viability of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples of tank and outlet.....	54
Table 17 Number of wiper fluid samples with detection of total <i>L. pneumophila</i> and <i>Legionella</i> spp.....	58
Table 18 Number of wiper fluid samples with detection of viable <i>L. pneumophila</i> and <i>Legionella</i> spp.....	59

Table 19 Concentration of <i>L. pneumophila</i> relating to that of <i>Legionella</i> spp. (Lp/Leg,%) in wiper fluid samples collected from tank and outlet .....	61
Table 20 Number of wiper fluid samples with detection of values of water quality indicators.....	62
Table 21 Levels of water quality indicators in wiper fluid samples of tank and outlet <sup>a</sup> .....	66
Table 22 Association between HPC concentration and water quality in wiper fluid samples.....	67
Table 23 Effect of water quality on detention of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples...	68
Table 24 Determine the impact factors of wiper fluid maintenance with detection of <i>Legionella</i> .....	70
Table 25 Determine the impact factors of car information with detection of <i>Legionella</i> .....	74
Table 26 Effect of water quality on abundance of <i>Legionella</i> in wiper fluid samples <sup>a</sup>	77
Table 27 Determination of the impact factors of wiper fluid maintenance with abundance of <i>Legionella</i> .....	79
Table 28 Determination the impact factors of vehicle information with abundance of <i>Legionella</i> .....	88
Table 29 Risk factors of wiper fluid maintenance for <i>Legionellae</i> presence in wiper fluid samples (n=42) <sup>a</sup> .....	91
Table 30 Association between water quality and <i>Legionella</i> abundance in wiper fluid samples <sup>a</sup> .....	95
Table 31 Association between wiper fluid maintenance and <i>Legionella</i> abundance in wiper fluid samples <sup>a</sup> .....	96
Table 32 Association between driving habits and <i>Legionella</i> abundance in wiper fluid	

samples <sup>a</sup> .....	97
Table 33 Association between risk factors and <i>Legionella</i> abundance in wiper fluid samples <sup>a</sup> .....	98
Table 34 Wiper fluid maintenance characteristics for taxis and private cars.....	101
Table 35 Positive rate of <i>Legionella</i> in tap water samples <sup>a</sup> .....	104
Table 36 Concentration of <i>Legionella</i> in tap water <sup>a</sup> .....	105
Table 37 Water quality of tap water samples .....	105
Table 38 Comparisons of viability of <i>Legionella</i> in wiper fluid and tap water.....	108
Table 39 Dermination of the relationship between water quality and detection of <i>Legionella</i> in wiper fluid and tap water samples .....	112
Table 40 Dermination of the relationship between water quality and concentration of <i>Legionella</i> in wiper fluid and tap water samples .....	113





## 第一章 文獻回顧

### 1.1 退伍軍人菌及其環境影響因子

退伍軍人菌屬為革蘭氏陰性菌，無莢膜且不產孢子，廣泛存於各種自然環境水體中 (Stout et al., 1985)，也普遍存於人工水體包括冷卻水塔 (Gilmour et al., 2007)、熱水系統 (Deloge-Abarkan M, 2007)、SPA 池 (Guillemet et al., 2010)、牙科管線 (Dutil et al., 2007)和生物曝氣池等等 (Blatny JM, 2008)。

導致退伍軍人症的暴露途徑是經由吸入受污染的氣膠而非經由食入 (Fields, 1996); (Sabria et al., 2002)，但除了經由吸入氣膠外，在醫院病患中也常發生經由吸嚥入受污染之水而致病的案例 (Sabria et al., 2002)。過去研究認為感染發生時，最常見的暴露途徑為易感受族群吸入由淋浴噴頭產生的生物氣膠或吸嚥入受退伍軍人菌污染的飲用水(Muder et al., 1986); (Brown et al., 1982)。

退伍軍人菌的生長繁殖會受到水質特性的影響(Table 1)，過去研究指出退伍軍人菌喜好生長於25–42°C的溫暖水體中 (Fields, 1996)，且當水溫高過60°C可以降低嗜肺性退伍軍人菌的陽性檢出率;另外，退伍軍人菌最適生長的pH值範圍為6.0到8.0 (Ohno A, 2003)，在過去研究中，測量其熱水系統、醫療用水等水質皆為中性偏鹼 (7.35~8.0)，但多數研究並未發現pH值與退伍軍人菌有顯著相關 (Edagawa et al., 2008); (Patterson et al., 1997); (Zanetti F, 2000)。

退伍軍人菌的增生也受到加氯消毒影響，若在自然水管線中沒有適當的有效加氯消毒系統，就可能造成退伍軍人病的暴露風險提高，有研究發現通常在輸水管線系統中的退伍軍人菌對於氯的耐受性較高 (Pryor et al., 2004)。在環境水體中，有研究指出熱水系統中的餘氯濃度與可培養性及總*Legionella* spp.的陽性檢出率有負向的影響 (Edagawa et al., 2008)，但在牙科用水系統的研究裡，則是發現與可培養性*L. pneumophila* (*Legionella pneumophila*)檢出濃度與餘氯有正相關 (Zanetti F, 2000)，認為低餘氯可能會抑制其他與退伍軍人菌競爭的細菌群，間接

使其退伍軍人菌的數量增加。

根據研究指出退伍軍人菌能夠在自由生長於含有生物膜的水體環境中，由於生物膜提供營養物質及遮蔽作用，使退伍軍人菌能夠抵抗水中的氯和抗菌成分 (Borella et al., 2005)。而代表水質營養程度的濁度和總有機碳，則被指出與可培養性 *Legionella* spp. 具有正向的相關 (Edagawa et al., 2008); (Valster et al., 2011); (Leoni et al., 2005)，其濁度在熱水及飲用水中的濁度範圍甚低 (0.16~2.2NTU)，當細菌濃度增高時會顯著影響其濁度。

在異營性細菌的部分，研究顯示在熱水中與可培養性 *Legionella* spp. 在陽性檢出率及濃度皆有正向的顯著相關 (Bargellini et al., 2011; Edagawa et al., 2008)，顯示水中的異營性細菌濃度及檢出率也反應了退伍軍人菌的孳生；但另外一篇於牙科用水的研究則是發現可培養性 *L. pneumophila* 和異營性細菌濃度有負向相關 (Zanetti F, 2000)，此時的異營性細菌和退伍軍人菌可能扮演互相競爭的角色，另外在冷卻水塔中水質中也是發現總細菌濃度亦呈現負向相關 (Kusnetsov. et al., 1993)。

在 States 等人的研究顯示自然水中含有微量的必需礦物質，例如鐵、鋅及鉀，是支持嗜肺性退伍軍人菌存活與生長的重要因子，且當這些礦物質濃度過高時則反而有害其生長 (States et al., 1985)。硬度代表其水中可溶性鈣、鎂離子及其他重金屬離子的濃度，其中有研究在醫院用水中發現在極低的可培養性 *Legionella* spp. 下，硬度與其陽性率有正向相關 (Lasheras et al., 2006)，而另外同樣在醫院用水中的研究則發現與可培養性 *Legionella* spp. 濃度呈現負向相關 (Kusnetsov. et al., 2003)，最近一篇研究則發現，硬度與可培養性 *Legionella* spp. 的關係式呈現 U 型趨勢，其總硬度在 2.5~3.5 mmol/L 範圍時有較低的 *Legionella* 濃度 (Bargellini et al., 2011)。

Table 1 The relationship between the water quality and detection of *Legionella*

指標	環境樣本	菌種	濃度範圍	統計檢定	影響	文獻
濁度 (NTU)	熱水	可培養性及總 <i>Legionella</i> spp.	0.4-2.2 NTU	T 檢定 (sig.)	與陽性率有正向影響	(Edagawa et al., 2008)
	飲用水	可培養性 <i>Legionella</i> spp.	0.16-0.3 NTU	線性迴歸分析 (sig.)	與濃度有正向影響 (相 關係數 R 值=0.821)	(Valster et al., 2011)
總有機碳 (mg/L)	熱水	可培養性 <i>L. pneumophila</i> 和 <i>Legionella</i> spp.	0.5-0.9 mg/L	相關性分析 (sig.)	與濃度有正向影響	(Leoni et al., 2005)
自由餘氯 (mg/L)	洗澡水	可培養性 <i>L. pneumophila</i>	- <sup>a</sup>	-	建議自由餘氯被控制在 0.2–0.4 mg/L 的範圍	(Fujimura et al., 2006)
	熱水	可培養性及總 <i>L. pneumophila</i>	0.01-0.08mg/L	卡方檢定 (non-sig.)	與陽性率無顯著相關	(Edagawa et al., 2008)
	熱水	可培養性及總 <i>Legionella</i> spp.	0.09-0.19 mg/L	T 檢定 (sig.)	與陽性率有負向影響	(Edagawa et al., 2008)
	牙科用水	可培養性 <i>L. pneumophila</i>	0.01-0.05 mg/L	-	餘氯與濃度有正向影響	(Borella et al., 2005)
導電度 ( $\mu\Omega\cdot l\cdot cm^{-1}$ )	熱水	可培養性 <i>Legionella</i> spp.	390-855 $\mu\Omega\cdot l\cdot cm^{-1}$	Wald 檢定 (sig.)	與陽性率有顯著相關 (58.2%的陽性樣本其導 電度低於 500 $\mu\Omega\cdot l\cdot cm^{-1}$ )	(Lasheras et al., 2006)

Table 1 The relationship between the water quality and detection of *Legionella* (continued)

指標	環境樣本	菌種	濃度範圍	統計檢定	影響	文獻
pH 值	熱水	可培養性及總 <i>Legionella</i> spp.	7.35-7.46	T 檢定 (non-sig.)	與陽性率無顯著相關	(Edagawa et al., 2008)
	移植手術用水		-a	多變項邏輯氏迴歸 (non-sig.)	與陽性率無顯著相關	(Patterson et al., 1997)
	醫院用水		7.6-8.0	Wald 檢定 (sig.)	與濃度有正向影響	(Lasheras et al., 2006)
	牙科用水	可培養性 <i>L. pneumophila</i>	7.69-7.75	T 檢定 (non-sig.)	與濃度無顯著相關	(Zanetti F, 2000)
30°C 異營性細菌 (CFU/mL)	熱水	可培養性及總 <i>Legionella</i> spp.	0.6x10 <sup>4</sup> -2.8x10 <sup>4</sup> (CFU/mL)	T 檢定 (sig.)	與陽性率有正向影響	(Edagawa et al., 2008)
37°C 異營性細菌 (CFU/mL)	熱水	可培養性 <i>Legionella</i> spp.	0-8x10 <sup>5</sup> (CFU/mL)	多變項迴歸分析 (sig.)	與濃度有正向影響	(Bargellini et al., 2011)
	牙科用水	可培養性 <i>L. pneumophila</i>	1.0x10 <sup>3</sup> -3.4x10 <sup>3</sup> (CFU/mL)	T 檢定 (sig.)	與濃度有負向影響	(Zanetti F, 2000)
總細菌 (cells/mL)	冷卻水塔水樣	可培養性 <i>Legionella</i> spp.	1.4x10 <sup>3</sup> -3.40x10 <sup>5</sup> (cells/mL)	單因子分析	與陽性率有負向影響	(Kusnetsov et al., 1993)

a:“-” 表示文獻並未寫明

Table 1 The relationship between the water quality and detection of *Legionella* (continued)

指標	環境樣本	菌種	濃度範圍	統計檢定	影響	文獻
總硬度 (mmol/L)	醫院用水	可培養性 <i>Legionella</i> spp.	-a	迴歸分析 (sig.)	與濃度有負向影響	(Kusnetsov. et al., 2003)
			1.44-2.76 mmol/L	Wald 檢定 (sig.)	與濃度有正向影響	(Lasheras et al., 2006)
			1.23-3.61 mmol/L		發現總硬度為 U 型趨勢的相關， 總硬度在 2.5~3.5 mmol/L 範圍時 有較低的 <i>Legionella</i>	(Bargellini et al., 2011)
	牙科用水	可培養性 <i>L. pneumophila</i>	1.2-1.7 mmol/L	T 檢定 (non-sig.)	與陽性率無顯著相關	(Zanetti F, 2000)
	醫院用水	可培養性 <i>L. pneumophila</i>	1.5 mmol/L (boundary)	卡方檢定 (non-sig.)	與陽性率無顯著相關	(Bonetta et al., 2010)
		可培養性 <i>L. pneumophila</i> serogroups 1	1.84 mmol/L (geometric means)	Bonferroni 事後 檢定 (sig.)	<i>L. pneumophila</i> 血清型 1 樣本的硬 度顯著高於未檢出 <i>L. pneumophila</i> 或是其他血清型的樣本	(Borella et al., 2005)

a:“-” 表示文獻並未寫明

## 1.2 退伍軍人病

嗜肺性退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)是退伍軍人菌屬中為主要的致病菌 (Blatny JM, 2008)，退伍軍人病 (Legionnaires' disease, LD)及龐提亞克熱 (Pontiac fever, PF)皆屬退伍軍人症 (Legionellosis)的病徵表現，感染嚴重者會導致退伍軍人病 (LD)，造成呼吸衰竭和肺出血等症狀 (Lin et al., 1998)；而退伍軍人菌另外可導致龐提亞克熱 (PF)，其症狀類似流行性感冒因此常被忽略，導致疾病診斷有低估的情形，但龐提亞克熱仍可作為退伍軍人病風險的指標 (M Bauer, 2008)；過去退伍軍人菌在肺炎主因中佔居第二 (Sopena et al., 1999)，因此在公共衛生議題上仍受到高度的重視。

Marston等人曾提出退伍軍人病的危險因子包括年齡、性別、吸煙、酗酒量和免疫缺陷相關的慢性病 (如糖尿病、癌症和腎臟疾病等等) (Marston et al., 1994)；過去研究發現退伍軍人病的發生率有男性高於女性的趨勢，且隨著年齡增加其退伍軍人病的風險也會隨之提高 (David et al., 2005)；其中免疫系統缺陷和有吸煙習慣的宿主是暴露退伍軍人菌屬導致肺炎的易感受族群 (Janet E. Stout, 1997) (Carratala et al., 1994); (Roig et al., 2003)；Nguyen等人的研究結果顯示，有吸煙習慣、患有矽肺症和每天花至少100分鐘從事戶外活動的人會顯著增加退伍軍人病的風險 (Nguyen et al., 2006)；因此，具有上述宿主特性的人則可能為退伍軍人病的高風險族群 (Table 2)。

過去有許多退伍軍人病感染爆發的事件發生，且其爆發是由共同的污染源所傳染致病，而這些污染源通常是一些能夠產生生物氣膠的人工水體遭受到退伍軍人菌的污染，包括冷卻水塔、噴泉溫泉或是空調設備等等；除了聚集性的感染爆發事件外，還有一些病例則是屬於非聚集性的零星個案，在 Table 2 中有研究指出經常在外夜宿 (Den Boer et al., 2006); (Che et al., 2008)，或是暴露到工業區的氣膠 (D Che, 2003)，皆為非聚集性退伍軍人病的危險因子；但目前非聚集性退伍軍人病病例的感染源及危險因子仍未被釐清，只透過流行病學的證據來篩選可

能的危險因子，再加上非聚集性退伍軍人病常常未被檢驗出退伍軍人菌，而在疾病趨勢上有低估的情況，國內目前應重視及調查非聚集性退伍軍人病的盛行率，並積極了解非聚集性退伍軍人病病例的危險因子，以降低非聚集性退伍軍人病的發生率。

### 1.3 職業駕駛與退伍軍人病

Table 3 中指出 Den Boera 等人為評估非聚集性退伍軍人病目前未知的危險因子 (Den Boer et al., 2006)，以為期 3 年的病例對照研究，收集荷蘭國內 228 位退伍軍人病病例組以及 293 位對照組，實驗設計主要以問卷方式調查涵蓋宿主特性以及環境因子的探討，結果顯示在多變項分析中職業駕駛的退伍軍人病得病風險為非職業駕駛的三倍 (OR=3.0, 95% CI= 0.8–11)，是達到統計顯著之重要得病因子。

英國報告發現2006年夏天有不尋常的退伍軍人病個案數增加，因而特別針對高危險族群進行研究調查，其資料來自英國勞工統計局 (The Office for National Statistics on the UK workforce)，病例對照研究中納入851,000位職業駕駛 (包括貨車、計程車和公車司機等)中有145位退伍軍人病個案，結果顯示職業駕駛有高達5.9倍的退伍軍人病得病風險 (RR = 5.90, 95% CI: 5.04–6.90, P<0.0001)。車子與退伍軍人病的相關性逐漸被發現極受到重視，但其明確的污染源及其致病機制皆尚未明瞭，需要更一步的研究來深入探討職業駕駛長期暴露於車體的相關機制。

Table 2 The risk factors of *Legionella* disease in the epidemiology study

種類	危險因子	統計方法	勝算比 (Odds ratio)	文獻
宿主因子	具有糖尿病病史者	多變項統計分析	OR=5.4 ,95% CI=1.0–29	(Den Boer et al., 2006)
	具有抽菸史者	多變項統計分析	OR=5.5 , 95% CI=2.6–12	
	男性，老人，抽菸者，免疫能力抑制患者，慢性疾病患者	-	-	(Diederens, 2008) ; (Marston et al., 1994)
環境因子	經常外宿於旅館或其他住宿者	-	-	(Che et al., 2008)
	經常暴露於工業區產生的氣膠者	-	-	(D Che, 2003)
	在外洗澡或淋浴者	-	-	(Ahmet Pinar, 2002)
	經常開車經過工業區者	多變項統計分析	OR=7.2, 95%,CI=1.5–33.7	(Wallensten et al., 2010)
	駕駛或乘坐於未添加雨刷精於雨刷水中之車輛者	多變項統計分析	OR=47.2, 95%CI=3.7–603.6	
	離家旅宿在外多天者	多變項統計分析	OR=4.0,95% CI= 1.1–15	(Den Boer et al., 2006)
	經常出國海外者	多變項統計分析	OR=33 , 95%CI=14–78	
專業駕駛	多變項統計分析	OR=3.0 , 95%CI=0.8–11		



#### 1.4 車內空調系統與退伍軍人病

Table 3 中指出 2002 年 Pinar 等人針對一疑似感染退伍軍人症之個案採集其臨床檢體，並於個案發病五天後採集個案所使用車子之故障空調系統所流出的水 (Ahmet Pinar, 2002)，經由病人的咽喉抹拭及血清樣本確立為退伍軍人病個案，空調系統所流出的環境水樣則以聚合酶鏈反應 (PCR) 分析並呈現退伍軍人菌陽性，且以直接螢光抗體分析出含有高濃度的嗜肺性退伍軍人菌血清 1~6 型 (7,500/mL)，但在培養法中並未有退伍軍人菌生長。此研究指出故障空調流出的水極可能為一個新的人為汙染源能使退伍軍人菌傳播至易感宿主，但未來仍需更進一步進行分子指紋技術 (molecular fingerprinting techniques) 來建立臨床樣本和環境樣本的相關性，以及證明其傳播機制；因此，其他類似的空調系統可能也有退伍軍人菌生長繁殖的問題存在。

2007 年 Polat 等人曾調查巴士駕駛的嗜肺性退伍軍人菌血清陽性率是否因長期直接暴露於空調循環系統所致 (Polat Y, 2007)，研究於 2004 年 2 月到 8 月共納入 63 位巴士駕駛以及 16 位司機助手，且分別長途開車於土耳其的高溫地區以及低溫地區，除了採集 79 位的血清樣本進行嗜肺性退伍軍人菌血清型鑑定外，也採集血清陽性駕駛車上空調產生之水氣的樣本，並以培養法及聚合酶鏈反應 (PCR) 進行分析退伍軍人菌屬；研究結果顯示長途開車且行經高溫地區 (30-35°C) 之駕駛，其嗜肺性退伍軍人菌之血清陽性率 (27.8%) 顯著高於開往低溫地區者 (4.6%) ( $P < 0.05$ )，推測與天氣熱而開啟空調系統並使用內部循環有關，但在空調樣本中並未檢測出退伍軍人菌屬；未來需要更多的研究來佐證巴士上的空氣中含有退伍軍人菌，因而能夠了解巴士司機的暴露風險。2009 年 Sakamoto 等人針對健康的職業駕駛進行退伍軍人菌抗體檢測且施以問卷測量 (Sakamoto, 2009)，並於報廢車體空調系統中的蒸發器採集抹拭樣本，在蒸發器的鋁製熱交換片上進行抹拭，以應用恆溫環形核酸增幅法 (loop-mediated isothermal amplification

Table 3 The researches of occupational drivers and Legionnaires' Disease

研究族群	研究設計	研究期間	研究主體	分析方法	研究結果	國家	文獻
職業駕駛 (計程車、公司、卡 車、公車、電車司機 及火車工程師) 長途客運司機	前瞻性病 例對照研 究	1998年7月 至2001年7 月	228名退伍軍人病 患者及293名非退 伍軍人病患者	施測問卷， 了解其潛在 的宿主及環 境危險因子 以間接免疫 螢光法測量 血清樣本中 嗜肺性退伍 軍人菌 1-14 特定抗原	校正其性別、年齡和季節後，在單變 項分析中的勝算比 (OR) 為 3.1 (95% CI=1.2-7.7); 在多變項分析中的勝算 比 (OR) 則是 3.0 (95% CI=0.8-11) 公車司機的嗜肺性退伍軍人菌血清陽 性率為 19% (12/63); 司機助理則為陰 性，且開往熱帶地區司機之血清陽性 率 (10/36, 27.8%) 顯著高於開往寒帶 地區者 (2/43, 4.6%)	荷蘭      土耳其	(Den Boer et al., 2006)      Polat Y, 2007)
職業駕駛 (重型貨 車、客貨車、公車及 計程車司機)	病例對照 研究	2001年至 2006年	851,000名職業駕 駛中有145名 LD; 27,061,000名 非職業駕駛中有 782名LD	-	職業駕駛比一般人有顯著的退伍軍人 病得病風險 (RR = 5.90, 95%CI: 5.04-6.90, P<0.0001), 且職業駕駛中為 零星式個案的比率比期望值高出五倍	英國	(Wallensten et al., 2010)
交通運輸業工作者	流行病學 調查	2006年4月 至2007年3 月	527名退伍軍人病 患者，其中有189 名患者為職業駕駛 (35.9%)	-	交通運輸業工作者於退伍軍人病患者 中占 13.8% (95% CI 8.9-18.7), 顯著高 於交通運輸業工作者對於一般民眾之 得病期望值 7.7% (已校正年齡和性別)	日本	(Sakamoto, et al., 2009)

method,LAMP)分析退伍軍人菌屬，結果發現 50%抹拭樣本檢出退伍軍人菌屬，培養法分析則因雜菌干擾而被抑制無法評估，在抗體檢測的結果發現有時會使用空調系統的駕駛其抗體效價大於 1:32 之盛行率也顯著較高，因此汽車空調系統可能是退伍軍人病的潛在風險，須更進一步的研究來支持及證明開車與退伍軍人病的相關性，且逐漸重視空調系統的退伍軍人菌暴露危害。

過去研究為了解空調系統中微生物孳生情況，所造成的過敏現象或是霉味產生等問題，透過進行空氣採樣了解 VOC (Rose et al., 2000)、微粒 (Asmi et al., 2009) 或總細菌含量 (Vonberg et al., 2010)，亦有研究採集空調出風口 (Simmons et al., 1997)、蒸發器中的散熱片和絕熱材質 (insulation materials) 上的抹拭樣本 (Simmons et al., 1999) 分析其真菌或生物膜，結果顯示因空調系統提供適合微生物孳生的生長條件而導致過敏或霉味產生，同時建議定期維護及保養有助於減低空調所產的不良健康效應，例如定期更換空氣過濾網。

### 1.5 雨刷水與退伍軍人病

Table 4 中指出 Wallensten 等人透過病例對照研究調查長時間開車或乘車者其退伍軍人病的暴露風險 (Wallensten et al., 2010)，研究中的病例組選取英國國內 2008 年 7 月到 2009 年 3 月間得到非聚集性退伍軍人病的 75 個病例，對照組則以郵遞區號、性別和年齡進行配對共有 67 位；以問卷方式調查包括駕駛的開車習慣，車子可能的暴露源例如空調系統，以及退伍軍人病已知的危險因子等等；研究結果以多變項分析發現有兩個與使用車子有關的因子會顯著增加退伍軍人病的得病風險，一為常開車經過工業區之駕駛其得病機率是不常經過的 7.2 倍 (OR 7.2, 95%CI 1.5–33.7)，另一個則是未加入雨刷精於雨刷水中之駕駛，其得病機率是有使用雨刷精者的 47 倍 (OR =47.2, 95%CI =3.7–603.6)。

Wallensten 等人研究中也指出英國 Health Protection Agency 曾進行初步環境調查，發現在五輛未加入雨刷精的車子中有一輛檢出退伍軍人菌，而 16 台加入

雨刷精的車子則未測得退伍軍人菌；而目前推測未加入雨刷精於雨刷水中，可能使退伍軍人菌於儲存雨刷水桶的容器內孳生，經由噴濺到擋風玻璃時，產生含有退伍軍人菌的生物氣膠，因而透過空調系統而被車內的人吸入，因此提高了退伍軍人症的暴露風險，但此傳播機制仍需更進一步的證據證明及釐清。

## 1.6 車輛雨刷系統之原理與結構

雨刷系統由貯水壺、噴水馬達、噴嘴及連接水管等所組成 (Figure 1)。雨刷水桶通常為PP (Polypropylene, PP)材質，體積約2.5~2.7公升不等，位置通常位於引擎區的左側或右側，會因車種有異但廠牌上大同小異，而引擎區域溫度可達70~80°C，會影響到雨刷水桶中雨刷水的溫度變化。雨刷水桶一般無法取出，因為有加蓋設計，因此降低了外物進入的可能性，且水桶損壞需更換的頻率不高，通常是車禍有碰撞而造成破損須更換。

雨刷水管線為PVC(Polyvinylchloride,PVC)材質，長為2.5公尺左右，更換的頻率通常也不太高，若為掀背車則其後擋風玻璃的管線，則可長至4.5公尺，水源來自同一個雨刷水桶，且雨刷馬達有兩顆。

而雨刷水通常是於進廠保養維修時，會添加雨刷清潔劑或適時補充雨刷水，且依照駕駛對於雨刷水操作維護的習慣，添加雨刷清潔劑或通只加入純水作雨刷水使用，若是自行購買雨刷精，則通常會依其產品建議稀釋比例作添加；水桶內有設置水尺可判別目前的雨刷水水量，但一般是以目視判定是否需要補充雨刷水或是經由雨刷水柱強度來判別，在高級轎車部分則有感測器會做偵測。

Table 4 The environmental studies of *Legionella* contamination in vehicles

位置	汙染源	採樣樣本	分析方法	結果	可能的傳播路徑	文獻
車輛外部	路上積水	積水水樣	培養法 (經酸處理後推盤於 WYO $\alpha$ 培養基)	從路面低窪的雨水積水中其嗜肺性退伍軍人菌檢出率為 39% (7/18)	路面積水中若含有退伍軍人菌屬，可能會產生生物氣膠氣入車體的空調系統	Sakamoto et al.,2008
車輛內部	空調系統	報廢車輛內蒸發器的熱交換片進行抹拭樣本採集	培養法和等溫核酸增幅法 (LAMP kits)	退伍軍人菌屬檢出率為 50% (11/22)	空調系統可能為退伍軍人菌屬的滋生窩，尤其是在蒸發器和駕駛座中無特別的過濾網隔離	Sakamoto et al.,2009
		從 LD 病患者的卡車中發現空調排水管有阻塞情況	-	由於排水管的阻塞使得其空調系統內有大約 130 mL 的積水	空調排水管若阻塞可能會使冷凝水亭滯，而使其滋生退伍軍人菌屬	Sakamoto et al.,2009
	冷凝器	採集空調系統冷凝器中的冷凝水	聚合酶反應 (PCR)和直接螢光抗體分析	冷凝水中含有高濃度的嗜肺性退伍軍人菌血清型 1-6 (7,500/mL)	空調氣流轉動滴落的冷凝水可能使其部分的水氣膠化	Pinar et al.,2002
	出風口	在公車的空調出風口採集排氣樣本 (exhaust samples)	培養法及聚合酶連鎖反應 (PCR)	退伍軍人菌屬皆為陰性	某些車輛其退伍軍人菌屬可能直接吹至司機臉部，使得長途運輸的司機長期暴露	Polat et al.,2007
雨刷系統	雨刷水	-	以問卷方式進行危險因子評估	駕駛或乘坐於未加入雨刷精的車輛中其得病風險之勝算比 (OR)為 47.2 (95%CI=3.7-603.6)	雨刷水中的退伍軍人菌可能在噴刷過程中產生氣膠，而部分氣膠會透過進氣口進入車內	Wallensten et al.,2010

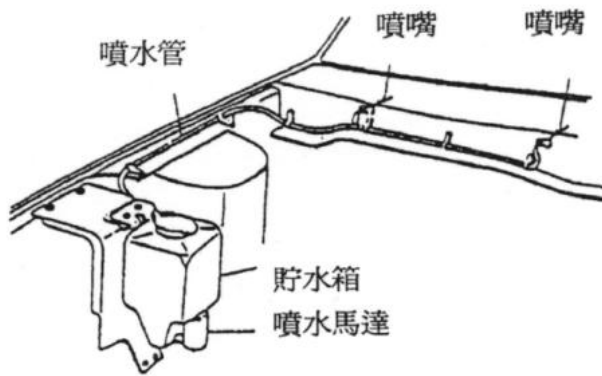


Figure 1 The system of windshield wiper fluid

### 1.7 車體退伍軍人菌污染之可能的暴露機制

根據過去研究指出專業駕駛的退伍軍人病得病風險為非專業駕駛的 3 倍，而職業駕駛的感染來源可能與雨刷水或空調系統遭到退伍軍人菌污染有關。其中雨刷水的污染可能透過噴刷時產生生物氣膠，經開窗或空調進氣口進入車內，而對人體有暴露風險，另外空調系統內部可能也有退伍軍人菌污染，因而使吹出的空調含有生物氣膠，Figure 2 為目前從系統原理推測其雨刷水中退伍軍人菌可能的暴露機制，並配合其環境採樣數據來驗證其可能的暴露途徑。

Figure 2 顯示當雨刷水桶內的雨刷水中有退伍軍人菌滋生後，其含有退伍軍人菌之雨刷水則會經由雨刷水管線送至噴嘴，噴刷至擋風玻璃上時可能產生含有退伍軍人菌的生物氣膠，而造成污染源的散布，其外部空氣中的退伍軍人菌污染源也可能來自其他貢獻源，包括冷卻水塔和曝氣池等等，當其含有退伍軍人菌的生物氣膠可能經由空調進氣孔，而在空調系統內的蒸發器附著且孳生，因此當空調運作時，可能送出的空調中含有退伍軍人菌污染，而導致車體內部空氣的污染，其外部的污染源也可能透過開窗的行為而進入到車內，當其車內內部有退伍軍人菌污染時，即有可能對人造成暴露風險，由其實長期在車內工作的職業駕駛族群，或者是經常搭乘交通工具者也可能是退伍軍人菌暴露的高風險族群。

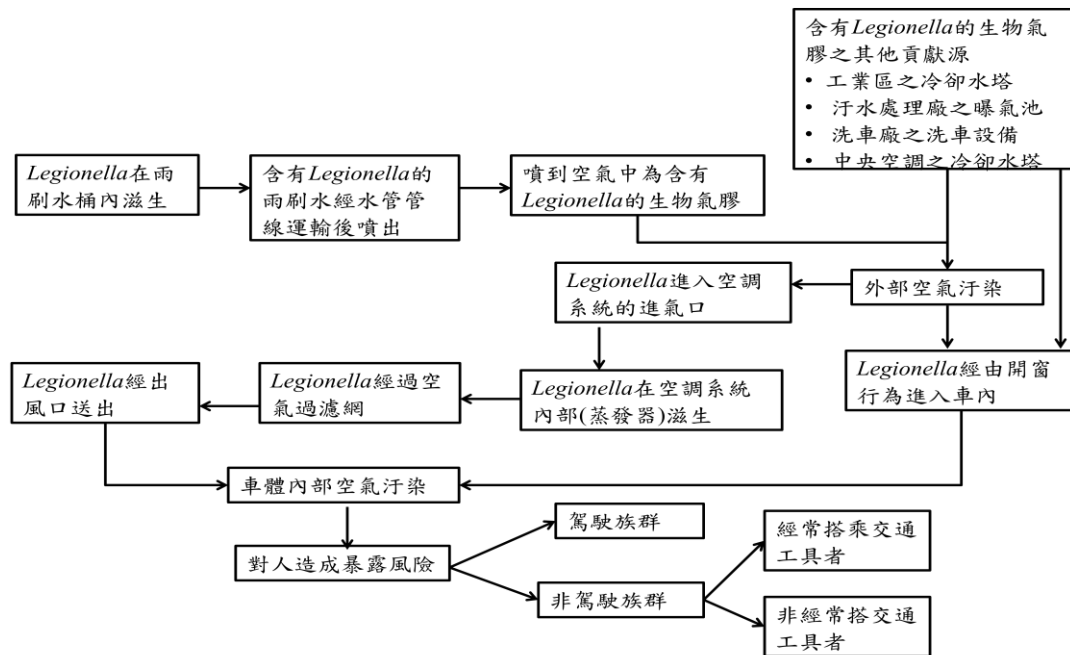


Figure 2 The exposure mechanism of *Legionella* contamination in vehicles to driver and passenger

### 1.8 研究動機及其重要性

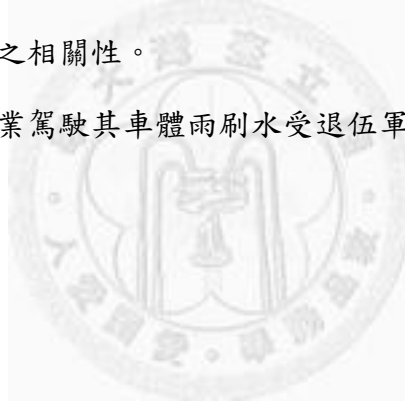
對於非聚集性退伍軍人病的危險因子及致病源，從流行病學研究以及國家病例報告中發現職業駕駛或長時間開車及乘車的人有較高的得病風險，因而需進一步了解車體中可能的退伍軍人菌汙染源，過去研究指出雨刷水極有可能受到退伍軍人菌的汙染，且從先前的環境調查證實退伍軍人症的存在，當車體受到退伍軍人菌滋生時，可能使職業駕駛長期暴露於含有退伍軍人菌的環境中，宿主特性加上環境因子的配合即能提高退伍軍人病的暴露風險，尤其在台灣的空調以內循環為主，更值得重視其暴露風險，但目前雨刷水退伍軍人菌汙染原因及影響因子都需要更一步的環境驗證來探討，進而了解暴露風險及其傳播的機制。

## 第二章 研究目的

職業駕駛或長時間開車的人有較高的退伍軍人病感染風險或是較高的暴露退伍軍人菌風險，值得重視。而其暴露來源則指向可能為雨刷水系統遭退伍軍人菌的污染。然目前國內尚未有雨刷水中退伍軍人菌污染情況之數據，也缺乏探討導致退伍軍人菌污染的影響因子。

有鑑於此，本研究主要目的如下：

- (1) 進行環境採樣及分析，以評估車體雨刷水退伍軍人菌污染狀況。
- (2) 進行環境因子調查，以解析車體雨刷水受退伍軍人菌污染之原因。
- (3) 探討雨刷水出水口與雨刷水桶中退伍軍人菌檢出及檢出濃度是否有差異。
- (4) 探討水質因子、車輛資訊和用車習慣、以及雨刷水操作維護與雨刷水退伍軍人菌檢出及檢出濃度之相關性。
- (5) 比較職業駕駛與非職業駕駛其車體雨刷水受退伍軍人菌污染狀況。





### 第三章 研究架構

為了解造成車體內雨刷水系統退伍軍人菌污染原因，須了解其退伍軍人菌污染濃度的影響因子，影響變項透過問卷調查、物化因子分析以及紀錄表單蒐集，將其變項與退伍軍人菌污染濃度進行統計分析，從中了解雨刷水系統中退伍軍人菌的顯著影響因子 (Figure 3)，同時評估大台北地區職業駕駛及非職業駕駛車輛其退伍軍人菌之污染盛行率情況，進一步進行建議及改善措施。

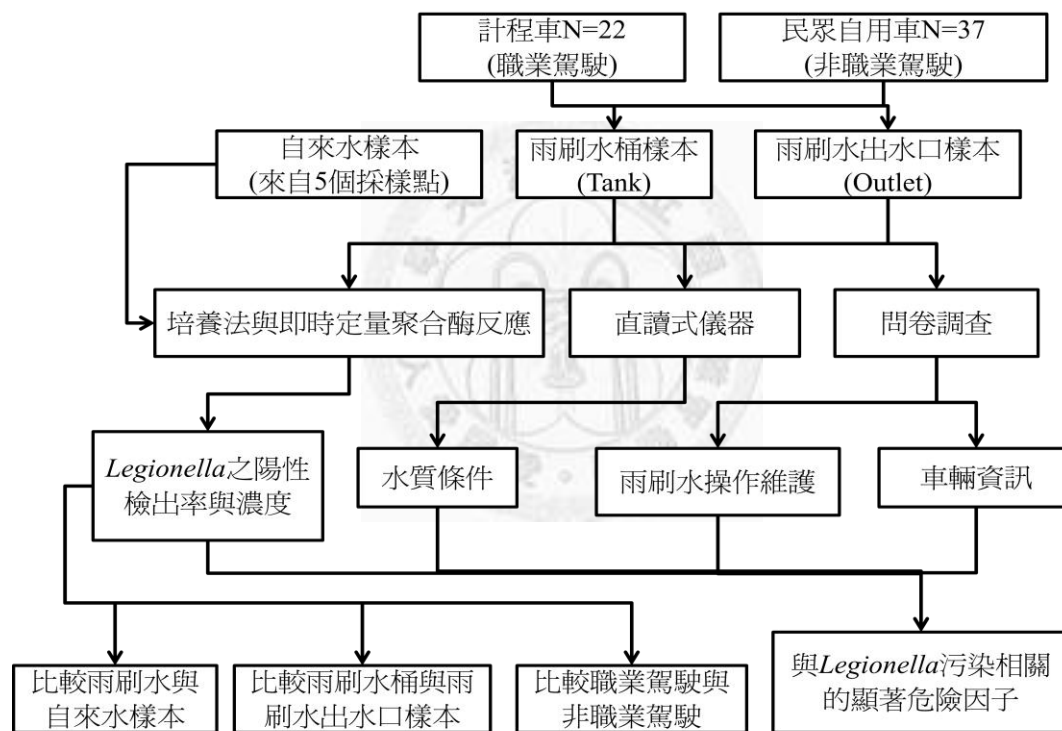


Figure 3 Determination of the impact factors to *Legionella* contamination in vehicles

## 第四章 材料與方法

### 4.1 環境採樣策略

#### 4.1.1 採樣對象

採樣對象主要針對市區內行駛的車輛，包括民眾自用車與計程車，分別代表職業駕駛與非職業駕駛兩個族群，以立意採樣(Purposive sampling)的方式在不同的地方針對兩個族群進行收樣。其民眾自用車主要來自台北市以及新北市的汽車維修廠，而計程車則是於政府單位設立的計程車休息服務站，皆採集同意進行採樣的車主。

#### 4.1.2 採樣位置

於每輛車體進行雨刷水的採集，雨刷水樣本採集引擎區中之雨刷水桶內的雨刷水作為雨刷水桶樣本 (Tank)，另外採集經由雨刷水管線噴出的雨刷水，作為雨刷水出水口樣本 (Outlet)；自來水樣本則是於各採樣點的水龍頭進行水樣收集。



#### 4.1.3 採樣方式

雨刷水的採樣方式如 Figure 4 所示，雨刷水桶(Tank)樣本用無菌吸管吸取雨刷水桶內的水並裝入無菌離心管中，雨刷水出水口(Outlet)則是將無菌離心管直接於雨刷噴嘴下方裝取噴出的雨刷水，兩種樣本類型各採集兩瓶 50 mL 的水樣，一管供給 qPCR 及培養法分析，另一管則供給物化因子分析，並在現場進行物化因子的分析，利用直讀式儀器量測(Table 5)，加入 0.025mL 的 10% 硫代硫酸鈉於每個裝有 50mL 水樣的採樣瓶中。將水樣保存於冰桶中運送回實驗室進行 qPCR 及培養法分析。

自來水水樣採集的部分，先打開水龍頭讓水流出 5 秒後再進行採樣，利用滅菌過的廣口採樣瓶 (Sanko, Shizuoka, Japan)，收集 1000mL 的自來水水樣，並在

現場利用直讀式儀器進行物化因子分析，加入 0.5mL 的 10% 硫代硫酸鈉於每個裝有 1L 水樣的採樣瓶中，將水樣保存於冰桶中運送回實驗室進行分析。

Table 5 The direct-reading instruments for detecting the water quality

物化因子	直讀式儀器
餘氯	直讀式儀器/Pocket colorimeter, Hach Company
濁度	直讀式儀器/2100 P, Hach company
硬度	直讀式儀器/ HI 93735, Hanna company
pH	直讀式儀器/ SENSION 156, Hach company
導電度、總溶解固體	直讀式儀器/ SENSION 156, Hach company

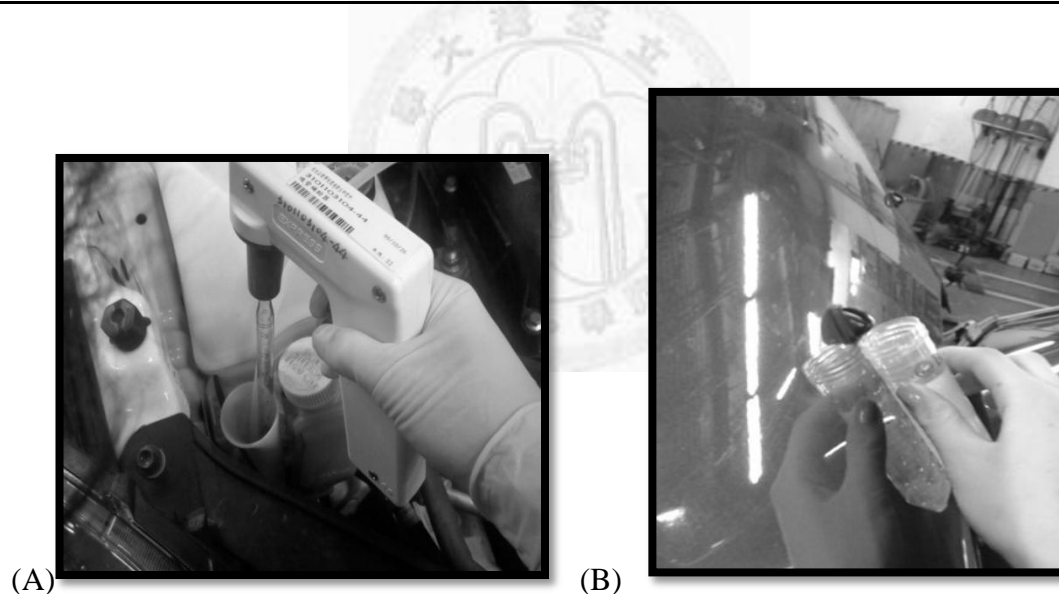


Figure 4 Sampling at the tank (A) and the outlet (B) of wiper fluid samples

#### 4.1.4 採樣時間及採樣數量

詢問車主同意進行採樣後，即會對車體著手進行環境採樣，包括雨刷水桶及雨刷水出水口樣本的蒐集，接著進行問卷訪談，了解車體資訊及車主對於雨刷水系統的使用及維護，整個流程約需 20~30 分鐘，本研究於 101 年 2 到 5 月間，於 5 個採樣點共進行 8 次的環境採樣，每次採樣約蒐集約 6~8 輛車。

#### 4.1.5 運送條件

水樣樣本保存於含碎冰的 4°C 冰桶中並避光帶回實驗室，於採樣完成後兩小時內運送回實驗室進行樣本分析。所有樣本其培養法分析者於採樣當天將全部進行分析處理，其 EMA-qPCR 及 qPCR 分析之樣本，則於隔日進行 DNA 萃取後，3 日內進行樣本分析。

### 4.2 培養基及緩衝液

#### 4.2.1 R2A 培養基

成分	廠牌	重量
R2A agar powder	Difco	18.2 g

將 18.2 g 的 R2A agar powder 加至 1 L 的去離子水中，以高壓滅菌鍋進行滅菌後 (121°C，20 分鐘)，將溶液均勻混和後，分裝至無菌培養皿中。

#### 4.2.2 NA 培養基

成分	廠牌	重量
Nutrient agar powder	Difco	23 g

將 23 的 Nutrient agar powder 加至 1 L 的去離子水中，以高壓滅菌鍋進行滅菌後 (121°C，20 分鐘)，將溶液均勻混和後，分裝至無菌培養皿中。

#### 4.2.3 BCYE $\alpha$ 培養基

成分	廠牌	重量
ACES	Sigma	10 g
Bacto Agar	Difco	17 g
Yeast extract	Difco	10 g
$\alpha$ -ketoglutarate	Sigma	1 g

Charocoal	Sigma	2 g
Fe <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	Sigma	0.25 g
L-cystine HCl · H <sub>2</sub> O	Sigma	0.4 g

將上述配方除了 Fe<sub>4</sub> (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O 和 L-cystine HCl · H<sub>2</sub>O 外，均勻溶解於 980 mL 的去離子水中，利用 HCl 調整其酸鹼值使其溶液 pH 值介於 6.8~6.85 之間，以高壓滅菌鍋進行滅菌後 (121°C，20 分鐘)後，將其溶液於水浴槽中降溫至 50°C，接著利用 0.2µm 無菌濾紙 (Millipore)加入過濾後的 Fe<sub>4</sub> (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O 和 L-cystine HCl · H<sub>2</sub>O，將溶液均勻混和後，分裝至無菌培養皿中。

#### 4.2.4 DGVP 培養基

成分	廠牌	重量
ACES	Sigma	10 g
Bacto Agar	Difco	17 g
Yeast extract	Difco	10 g
α-ketoglutarate	Sigma	1 g
Charocoal	Sigma	2 g
Fe <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	Sigma	0.25 g
L-cystine HCl · H <sub>2</sub> O	Sigma	0.4 g
Glycine	Sigma	3 g
Vancomycin	Sigma	0.001 g
Polymyxin B	Sigma	50000 U
Bromothymol blue	Acros Organics	0.1 g
Bromocresol purple	Acros Organics	0.1 g

DGVP agar 為 BCYEα agar 為基底添加抗生素的培養基，配置方法為將上述配方除了 Fe<sub>4</sub> (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O 和 L-cystine HCl · H<sub>2</sub>O 外，均勻溶解於 980 mL 的去

離子水中，利用 HCl 調整其酸鹼值使其溶液 pH 值介於 6.8~6.85 之間，以高壓滅菌鍋進行滅菌後 (121°C，20 分鐘)後，將其溶液於水浴槽中降溫至 50°C，接著利用 0.2µm 無菌濾紙 (Millipore)加入過濾後的 Fe<sub>4</sub>(P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O 和 L-cystine HCl·H<sub>2</sub>O，將溶液均勻混和後，分裝至無菌培養皿中。

#### 4.2.5 磷酸鹽緩衝液 (PBS)

成分	重量
NaCl	8.2 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g

將上述配方加至 1 L 的去離子水中，以高壓滅菌鍋進行滅菌後 (121°C，20 分鐘)，置於室溫下冷卻及保存，此緩衝液使用於自來水樣前處理時，環境細菌所用之保存液。

#### 4.2.6 TE 緩衝液

成分	濃度	體積
Tris-HCl	1M	10 mL
EDTA	0.5M	2 mL

將 1M 的 Tris-HCl 和 0.5M 的 EDTA 於 988 mL 的去離子水中，以高壓滅菌鍋進行滅菌後 (121°C，20 分鐘)，置於室溫下冷卻及保存，此緩衝溶液使用於 DNA 樣本的稀釋液。

#### 4.2.7 酸性緩衝液 (KCl-HCl buffer)

成分	濃度	體積
----	----	----

HCl	0.2 mol/L	3.9 mL
KCl	0.2 mol/L	25 mL
HCl	6 mol/L	2~7 mL

在 800 mL 的去離子水中，加入 0.2 mol/L 的 KCl 和 HCl 均勻混和後，量測其 pH 值，利用 6 mol/L 的 HCl 調整其溶液 pH 值為 2.2 後，補充去離子水使總體積為 1L，以高壓滅菌鍋進行滅菌後 (121°C，20 分鐘)，置於室溫下冷卻及保存，此緩衝溶液使用於培養法中對環境樣本加入酸性緩衝液進行酸處理。

### 4.3 樣本分析

過去已開發即時聚合酶反應定量水中退伍軍人菌之方法 (Chang et al.,2010)，本研究延續之前的方法以即時聚合酶連鎖反應(Quantitative Polymerase Chain Reaction，qPCR)搭配核酸染劑定量水中總及活性之 *Legionella* spp. 濃度，並同步進行 IIC (Internal Inhibitor Control) 測試不同稀釋倍數下的樣本中是否已無 PCR 抑制物存在，再以最佳的稀釋倍數進行 *L. pneumophila* - qPCR 分析。另外，同時搭配培養法進行可培養性退伍軍人菌分析，鑑定是否為陽性樣本，為避免偽陽性及偽陰性的出現，將進行兩種培養法前處理方式，包括經濃縮且酸處理及未經濃縮且未酸處理兩種。透過整套流程分析 (Figure 5)，針對計程車及民眾自用車，採集及分析其兩刷水系統退伍軍人菌的污染濃度，用以評估其暴露風險及環境影響因子之探討，其分析方法的 QAQC (Quality Assurance and Quality Control) 請參照附錄四。

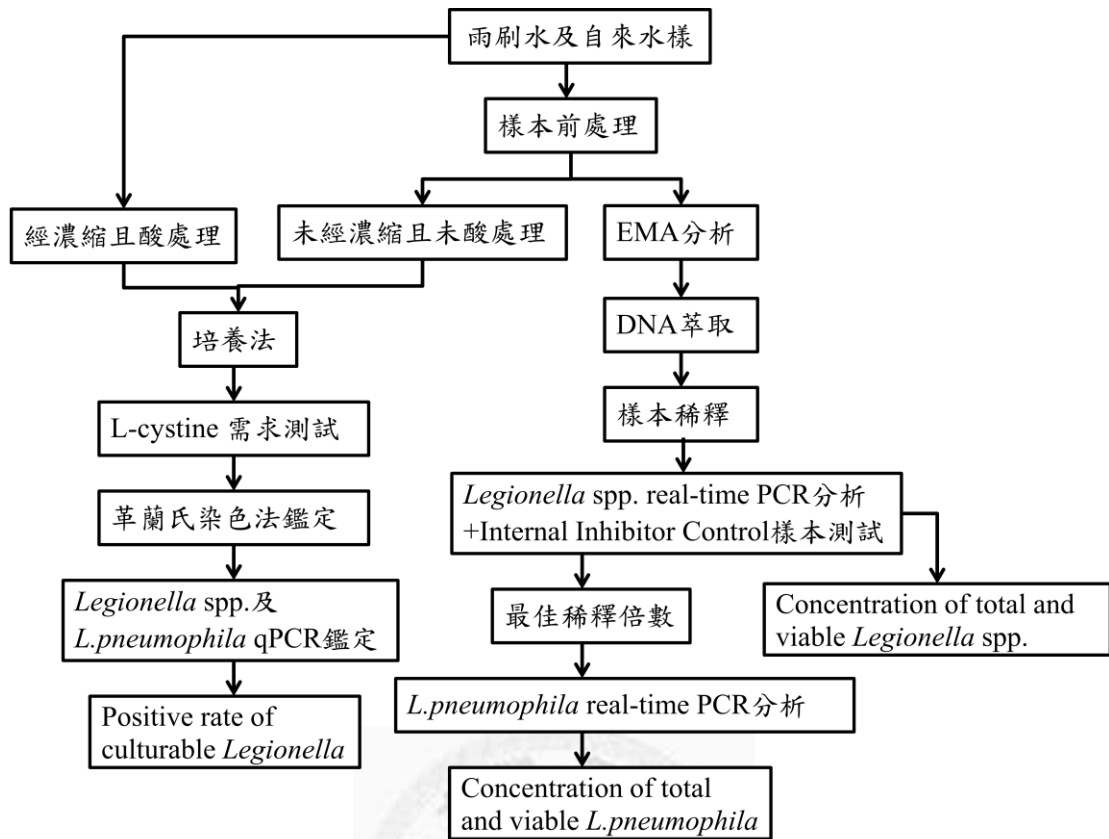


Figure 5 The study design of determining the concentration of *Legionella* in wiper fluid and tap water samples

### 4.3.1 樣本前處理

#### 4.3.1.1 雨刷水樣本

水桶內雨刷水樣本及末端噴出雨刷水樣本採集約 50 mL，震盪 5 秒後，取 1 mL 進行未酸處理的培養法分析，另取 40 mL 水樣以 8200 x g 在 4°C 下離心 10 分鐘，移除上清液後，使其 pellet 濃縮回溶於 3mL 中，震盪 30 秒後分為兩部分，其中 1 mL 供給 EMA-qPCR 及 qPCR 分析，另外 2 mL 供給經酸處理的培養法分析。

#### 4.3.1.2 自來水樣本

每個採樣瓶先震盪 5 秒，取 1mL 進行未酸處理的培養法分析，取 1L 水樣過濾於孔徑 0.4μm 直徑 47 mm 材質 PC 的 HTPP 濾紙 (Millipore, Ireland) 上，並抽氣使其水樣完全過濾，將濾紙剪碎置於含有 3 mL PBS 的無菌離心管中，將菌液



震盪 5 分鐘後取出濾紙，震盪 30 秒後從 3mL 中取出 1mL 供 qPCR 分析。

### 4.3.2 EMA 分析

經前處理後的雨刷水樣本，其中 1 mL 供給 EMA-qPCR 及 qPCR 分析，震盪均勻 30 秒後，分為兩部分，其中 0.5 mL 不進行 EMA 染劑染色處理直接 DNA 萃取，另外 0.5 mL 則進行 EMA 染劑染色處理，加入 0.05 mL 的 25 $\mu$ g/mL EMA 染劑 (Sigma)，使其最後樣本的 EMA 染劑濃度為 2.3 ug/mL，均勻震盪 5 秒後，在室溫下避光 5 分鐘使染劑作用，置於碎冰上並以 500W，110V 鹵素燈 (R7s，OSRAM, Taipei, Taiwan) 距離 15 公分進行光照 20 分鐘，光照結束後，將有經 EMA 染劑處理及未經 EMA 染劑處理的樣本皆進行 DNA 萃取。

### 4.3.3 DNA 萃取

有經 EMA 染劑處理及未經 EMA 染劑處理的樣本，皆以 20000 x g 在 4°C 下離心 10 分鐘後，利用 QIAamp DNA mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, German)，依據製造廠商的操作手冊進行 DNA 萃取步驟，僅於最終步驟中加入 Buffer AE 的步驟中，為避免環境樣本濃度過低，將 0.2 mL 改為將 DNA 溶於 0.1 mL 中。

### 4.3.4 Real-time 分析

#### 4.3.4.1 Internal Inhibitor Control (IIC) 樣本測試

環境樣本中的 DNA 萃取物中可能含有 PCR 放大抑制物，會造成 qPCR 分析時未能有效放大 DNA 而被儀器偵測，使得 DNA 濃度定量上有低估的情形，當樣本進行適當稀釋後，PCR 抑制物也會同步被稀釋，因此可藉由稀釋方式使抑制物達到去除或不影響 DNA 放大的效果 (C.A Heid, J Stevens, K.J Livak, et al, 1996)，本研究將雨刷水 DNA 樣本則進行 5 倍及 10 倍的 DNA 稀釋，自來水樣本則是進行 5 倍的 DNA 稀釋。

用 LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) 進行各樣本中 IIC 分析，其 IIC 為 neomycin phosphotransferase gene (GenBank Accession No. V00618)的片段 (bp 472-603)中截取之 DNA (Chen et al., 2010)，故研究中可同步進行分析 *Legionella* spp. 及 IIC 測試。

每個待測樣本中加入 1µl internal inhibitor control (IIC, Biotech)及 300 nM 的 IIC probe (5'-Red610-TGCAATGCGGCGGC-3')於 *Legionella* spp. PCR 混合試劑中，並加入 5µl 環境 DNA 樣本同步進行 IIC 樣本抑制及 *Legionella* spp.濃度測試，每批次分析中皆含有 IIC control，以 PCR 無菌水 (Roche Diagnostics)取代 5µl *Legionella* DNA 樣本於添加有 IIC 的 PCR 混合試劑中，藉此確認每批次 IIC 測試皆有正常範圍的放大效率。

試劑	體積 / 樣本 (µl)	最終濃度
2× probe master mix (Roche)	10	1×
Leg_forward primer (10µM)	0.6	300nM
Leg_reverse primer (10µM)	0.6	300nM
Leg probe (10µM)	0.6	300nM
IIC probe (10µM)	0.6	300nM
IIC	1	25fg/PCR
Sterile water	1.6	-

利用在樣本中添加已知 DNA 濃度範圍的 IIC，確認最佳稀釋濃度樣本未受到抑制物影響，選取 IIC 已知濃度標準為其 Ct 平均值+SD 作為濃度範圍標準值，若環境樣本之 IIC Ct 值低於此標準值，則視為通過 IIC 測試，而當環境樣本之 IIC Ct 值高於此標準值，視為樣本中的 PCR 抑制物尚未完全去除，則 IIC 濃度會同步抑制而無正常放大，必須再次進行更多倍數稀釋，並於稀釋後重複進行 *Legionella* spp.濃度及 IIC 測試，直至 IIC 測試符合標準，並以 IIC 測試符合標

準時所得樣本稀釋倍數及濃度視為該樣本的 *Legionella. spp.*濃度。

#### 4.3.4.2 *Legionella. spp.* real-time PCR 分析

Real-time PCR 之分析方法用 LightCycler<sup>®</sup> 480 System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) 進行各樣本中 *Legionella. spp.*濃度分析，並利用 LegF (5'-CGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT) 及 LegR (5'-GTCACCGGCAGTCTCATTA GAG) 兩種 primer 來辨識及定量 16S rRNA 中的 67-bp 區域之基因，並將其基因片段進行放大後，搭配 *Legionella*-specific TaqMan MGB probe (5'-FAM-TCCCC GCCATTACATG -MGBNFQ-3') 來進行偵測 (Chen and Chang. 2010)。

定量 *Legionella. spp.* 的混合試劑 (20 µl) 中含有 10µl 之 LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics)，300 nM 之 primers (Mission Biotech Co., Taipei, Taiwan)，300 nM 的 TaqMan MGB probe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，及 5µl 環境 DNA 樣本或是 *Legionella spp.* DNA 標準品，因 *Legionella spp.* 樣本與 Internal Inhibitor Control 樣本進行同步分析，於 *Legionella spp.* 混合試劑中另外亦會加入 IIC control。

用以 *L. pneumophila* 分析之 PCR 反應設定如下，先進行 10 分鐘於 95°C 下之活化作用後，進行 50 次的放大步驟 (95°C 下 10 秒及 60°C 下 1 分鐘)，最後在 40°C 下冷卻 10 秒鐘完成 real-time PCR 之結果分析與定量。

Program	Cycle	Temperature	Time
Pre-incubation	1 cycle	95°C ,	10 mins
Amplification	50 cycles	95°C	10 secs
		60°C	1 min
Cooling	1cycle	40°C	10 secs

*Legionella spp.* 標準品利用 DNA 萃取生長於 BCYE $\alpha$  agar 上之 *L. pneumophila* SG1 (ATCC33152)，並以吸光值 A260nm 定量其濃度，再利用 TE buffer 進行標

準品稀釋後，配置 *Legionella* spp. 標準品檢量線濃度範圍在  $2.33 \sim 2.33 \times 10^5$  cells/ $\mu$ l，其範圍含蓋本研究中環境樣本之濃度分布。

#### 4.3.4.3 *L. pneumophila* real-time PCR 分析

選擇有最高的 *Legionella* spp. 濃度以及通過 IIC 測試的稀釋倍數，進行 *L. pneumophila* real-time PCR 分析，其分析同樣使用 LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) 進行，並利用 mip-LpF (5'-ACAC TGGTCGTCTGAT) 及 mip-LpR (5'-CCAATAGGTCCGCCAA) 來辨識及定量 *L. pneumophila* 中的 193-bp 區域之基因，並將其進行放大後，搭配 mip-specific TaqMan MGB probe (5'-FAM-CCATAAGCAAGACCTGC-MGBNFQ-3') 來進行偵測 (Chen and Chang. 2010)。

PCR 偵測定量 *L. pneumophila* 之混合試劑 (20  $\mu$ l) 中含有 12.5  $\mu$ l 之 LightCycler® 480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics)，375 nM 之 primers (Mission Biotech Co., Taipei, Taiwan)，及 375 nM 的 TaqMan MGB probe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，最後加入 5 $\mu$ l 萃取之環境 DNA 樣本或是 *L. pneumophila* DNA 標準品，每批次分析樣本會有一組加入 PCR 無菌水 (Roche Diagnostics) 作為陰性樣本。

試劑	體積 / 樣本 ( $\mu$ l)	最終濃度
2 $\times$ probe master mix (Roche)	12.5	1x
Lp_forward primer (10 $\mu$ M)	0.75	375 nM
Lp_reverse primer (10 $\mu$ M)	0.75	375 nM
Lp probe (10 $\mu$ M)	0.75	375 nM
Sterile water	0.25	1x

標準品為利用 Mission Biotech 公司合成之 *L. pneumophila*，並偵測其基因表

現量 (copies/ng) 為  $3.1 \times 10^8$  copies/ng, 本研究利用 TE buffer 進行標準品稀釋後, 配置 *L. pneumophila* 標準品檢量線濃度範圍在  $3.1 \times 10^{-1} \sim 3.1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l 此範圍含蓋本研究中環境樣本分析結果之濃度分布情形。

用以 *L. pneumophila* 分析之 PCR 反應設定如下, 先進行 10 分鐘於 95°C 下之活化作用後, 進行 50 次的放大步驟 (95°C 下 10 秒及 60°C 下 1 分鐘), 最後在 40°C 下冷卻 10 秒鐘完成 real-time PCR 之結果分析與定量。

Program	Cycle	Temperature	Time
Pre-incubation	1 cycle	95°C ,	10 mins
Amplification	50 cycles	95°C	10 secs
		60°C	1 min
Cooling	1cycle	40°C	10 secs

每批次標準品於 real-time PCR 分析完後, 利用各濃度 *L. pneumophila* DNA 標準品所得之 Ct 值與已知的相對應 log DNA copy numbers 製作 *L. pneumophila* 標準檢量線, 每批次 real-time PCR 反應的放大效率及檢量線迴歸係數之  $R^2$  將經由 real-time PCR 反應後確認結果是否正常, 而每批次所得的檢量線將用以定量環境樣本中 *L. pneumophila* 濃度。

### 4.3.5 培養法分析

#### 4.3.5.1 可培養性總細菌

##### 4.3.5.1.1 兩刷水樣樣本

將環境水樣震盪均勻後, 取 1 mL 進行可培養性總細菌分析, 以無菌水進行序列稀釋 100 倍及 1000 倍後, 取 0.1 mL 推於 R2A agar 上, 每個樣本各推兩盤, 皆培養於 28°C 下 7 天, 7 天後計數其菌落數並換算成濃度。

#### 4.3.5.1.2 自來水樣本

將環境水樣震盪均勻後，取 1 mL 進行可培養性總細菌分析，以無菌水進行 10 倍的序列稀釋後，取 0.1 mL 的原倍和 10 倍稀釋液推於 R2A agar 上，每個樣本各推兩盤，皆培養於 28°C 下 7 天，7 天後計數其菌落數並換算成濃度。

#### 4.3.5.2 可培養性退伍軍人菌

##### 4.3.5.2.1 經濃縮且酸處理的培養法

雨刷水樣本經前處理之後，最後濃縮回溶液體中的 2 mL 供給經酸處理的培養法分析，於 2 mL 樣本中加入 2 mL 的酸性緩衝溶液，震盪均勻後靜置 5 分鐘，再加入 1 mL 的 0.1 N KOH 作為中和劑進行中和，即為已進行酸處理的樣本溶液。經酸處理後的雨刷水樣本，以無菌水稀釋樣本，進行 20 倍及 100 倍稀釋，並於原倍、20 倍及 100 倍稀釋液中各取 0.1 mL 進行培養法分析，每個樣本於 BCYE $\alpha$  agar 及 DGVP agar 兩種培養基各推兩盤，並將培養皿培養於 37°C 下含有 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 7 天，7 天後進行培養法後續鑑定。

##### 4.3.5.2.2 未經濃縮且未酸處理的培養法

將原液震盪均勻後，取未經樣本前處理的水樣 1 mL，以無菌水稀釋樣本，雨刷水樣本將進行原倍及 20 倍及 100 倍菌液進行推盤，自來水樣本則是進行原倍及 20 倍菌液進行推盤，每個樣本於 BCYE $\alpha$  agar 及 DGVP agar 兩種培養基各推兩盤，並將培養皿培養於 37°C 下含有 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 7 天，7 天後進行培養法後續鑑定。

#### 4.3.5.2.3 L-cystine 需求測試

於 37°C 下含有 5% CO<sub>2</sub> 中培養 7 天後的 BCYE $\alpha$  agar 及 DGVP agar 上，若長出型態疑似嗜肺性退伍軍人菌的菌落，將進行 L-cysteine 需求測試作為判定標準，將疑似菌落轉植到 BCYE $\alpha$  agar 及 NA agar 上，並再次培養於 37°C 下含有 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中培養 7 天，其若於 BCYE $\alpha$  agar 上生長但於 NA agar 上無生長隻疑似菌落，將會再進行革蘭氏染色法以鑑定菌種。

#### 4.3.5.2.4 革蘭氏染色法鑑定

於 L-cysteine 需求測試中檢測為疑似菌落者，利用革蘭氏染色劑 Rapid Gram Stain kit (Baso diagnostic, Inc. Taiwan) 進行染色，並於顯微鏡下觀察染色結果，染色結果為紅色桿菌者，則被認定為疑似嗜肺性退伍軍人菌，將會再進行 DNA 萃取，以 qPCR 分析作最後菌種的鑑定。

#### 4.3.5.2.5 *Legionella* spp. 及 *L.pneumophila* qPCR 鑑定

經由革蘭氏染色呈現革蘭式陽性反應的紅色桿菌菌落，進行 DNA 萃取後，若能由 qPCR 分析中以 *L. pneumophila* 及 *Legionella* spp. 特定基因的探針偵測放大之菌落，才會視被認定為可培養性的 *L. pneumophila* 及 *Legionella* spp.，並進行陽性檢出率的樣本計算。

### 4.4 物化因子量測

#### 4.4.1 餘氯

將水樣樣本震盪均勻後，取 10 mL 的待測水樣裝入樣本瓶中，加入餘氯試劑 (DPD Total Chlorine Reagent)，避光進行均勻震盪 20 秒後，用餘氯計 Pocket

colorimeter (Hach Company , Loveland , Co ., USA)進行量測，在量測樣本前需利用去離子水進行校正，以確保樣本的準確性。

#### 4.4.2 濁度

將水樣樣本震盪均勻後，取 10 mL 的待測水樣裝入樣本瓶中，並使其無氣泡產生，用濁度計 2100P Turbidimeter (Hach Compant , Loveland , Co ., USA)進行量測，在量測樣本前會進行校正，依序將不同濁度的校正液 (<0.1,20,100,800 NTU)放入測量位置進行校正，以確保樣本的準確性。

#### 4.4.3 硬度

將水樣樣本震盪均勻後，取 0.5 mL 的待測水樣裝入樣本瓶中，選擇適合的硬度試劑範圍 (低硬度 0~250 ppm)，加入 9.5 mL 硬度試劑 Hardness Reagent A-B (Hanna instrument,Inc., Woonsocket, RI,USA)於樣本品中，並滴入兩滴的硬度緩衝液 Hardness Buffer Reagent B，利用滴管均勻混合其溶液後，放入硬度計 Hardness meter (Hanna instrument,Inc., Woonsocket, RI,USA)中進行校正，15 秒後取出樣本瓶，加入硬度試劑粉 Hardness Reagent C (Ion Specific Meters Reagents Set, Hanna instrument,Inc., Woonsocket, RI,USA)，經過 2 分鐘後記錄其硬度數值。

#### 4.4.4 pH 值

pH 值以可攜式多參數計 Sension 156 portable multiparameter meter (Hach Company , Loveland , Co ., USA)量測，進行樣本量測前，將探針放入校正液進行校正，依序進行 pH 4、pH 7 及 pH 11 的校正，而儀器內部會自動建立一條檢量線，而後將探針以無菌水沖洗並擦乾後，放入待測水樣中，直到數值穩定紀錄其 pH 數值。



#### 4.4.5 導電度及總固體溶解質

導電度同樣以可攜式多參數計 Sension 156 portable multiparameter meter (Hach Company, Loveland, Co., USA) 量測，進行樣本量測前，將探針放入校正液 (1000 $\mu$ s/cm) 進行校正，而後將探針以無菌水沖洗並擦乾後，放入待測水樣中，直到數值穩定紀錄其導電度，根據可攜式多參數計 Sension 156 portable multiparameter meter 的說明書指出，儀器內建公式會自動將導電度換算成總固體溶解質 TDS (mg/L) 的數值。

#### 4.4.6 溶解性有機碳

分析溶解性有機碳所使用的儀器為濕式氧化法 TOC 分析儀 Aurora Model 1030 TOC Analyzer (OI Analytical, College Station, TX, USA)，為分析溶解性有機碳，雨刷水樣本透過無菌針筒加裝含有直徑 25 mm 孔徑 0.45 $\mu$ m 材質為 MCE membrane 的濾紙進行過濾，取其過濾液利用去離子水進行樣本稀釋，每個樣本皆會進行 200 倍的稀釋，使其濃度落於檢量限範圍內，其檢量線置備使用 KHP (Potassium Biphthalate) 標準液進行稀釋配置，製備的檢量線濃度範圍為 0.625 ppm 至 10 ppm，其分析水樣須保存於 4 $^{\circ}$ C 下，並於 7 天內分析完畢。

#### 4.5 影響因子的評估

為了解在雨刷水系統上，其操作及維護的行為是否影響其雨刷水污染情況，本研究利用問卷方式，以面對面訪談方式進行問卷調查，主要了解車主對於車體內雨刷水的操作及維護，評估其雨刷水內有無添加雨刷清潔劑及其濃度是否與污染濃度有顯著相關性。另外同時於採樣同步紀錄，採樣車輛的車體資訊，包括車種、廠牌及用車習慣等等，問卷內容參照附錄。

## 4.6 評估指標

### (1) 陽性率

$$\text{陽性率 (\%)} = \frac{\text{陽性樣本數}}{\text{總樣本數}} \times 100\%$$

### (2) qPCR 分析總 cell 及活性 cell 濃度

$$\text{濃度} \left( \frac{\text{cells}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{qPCR 定量 total 或 viable cell 數 (cells)} \times \text{稀釋倍數}}{\text{分析之水樣體積或保存液體積 (mL)}}$$

### (3) 活性率 (Viability)

$$\text{活性率 (\%)} = \frac{\text{活性細菌濃度 (cells/mL)}}{\text{總細菌濃度 (cells/mL)}} \times 100\%$$

### (4) 雨刷水出水口與雨刷水桶之濃度比值 (Ratio of Outlet/Tank)

$$\text{Ratio of} \frac{\text{Outlet}}{\text{Tank}} = \frac{\text{雨刷水出水口 (Outlet) 之濃度 (cells/mL)}}{\text{雨刷水桶 (Tank) 之濃度 (cells/mL)}}$$

### (5) 退伍軍人菌中嗜肺性退伍軍人菌之比率 (*L.pneumophila* % in *Legionella* spp.)

$$L.pneumophila \text{ in } Legionella \text{ spp. (\%)} =$$

$$= \frac{\text{嗜肺性退伍軍人菌濃度 (cells/mL)}}{\text{退伍軍人菌屬濃度 (cells/mL)}} \times 100\%$$

## 4.7 統計分析

### 4.7.1 數據處理

對於雨刷水操作維護、車體資訊對退伍軍人菌的檢出及檢出濃度之統計檢定之資料處理則以車輛為單位。在退伍軍人菌濃度部分，係將每輛車之雨刷水桶和雨刷水出水口所得退伍軍人菌濃度（未檢出者以零代入）平均；至於有無檢出退伍軍人菌部分若雨刷水桶或出水口中至少有一樣本為陽性，即屬陽性樣本，若均為陰性樣本時，則屬陰性樣本。

在各項水質因子中，除了 pH 值呈常態分布外，其他水質因子皆為非常態分布，因此在統計分析檢定相關性時將使用無母數分析。而在不同的活性菌種之檢出濃度中，絕對數值皆為非常態分布，將其絕對數值轉 log 值後則為常態分布，因此在單變項分析部分，以絕對數值進行無母數分析，但在多變項分析，則是以轉 log 值進行有母數分析。

#### 4.7.2 統計方法

##### (1) 比較 Tank 和 Outlet 有無差異

對於 Tank 和 Outlet 的 *Legionella* 檢出，以對稱檢定(McNemar test)統計方法，需為 Tank 和 Outlet 皆為有採樣且分析的配對樣本，檢定 Tank 和 Outlet 檢出有無差異，設定其  $\alpha$  值為 0.05。

##### (2) 比較 HPC 和其他水質條件的相關性

對於 HPC 和其他水質條件，以斯皮爾曼等級相關係數 (Spearman correlation) 統計方法，需為 HPC 和其他水質條件皆為陽性樣本，檢定 HPC 和其他水質條件的相關性，設定其  $\alpha$  值為 0.05。

##### (3) 以單變項分析探討影響因子與 *Legionella* 的相關性

對於影響因子和雨刷水中 *Legionella* 的檢出，以簡單邏輯氏迴歸分析 (Simple logistic regression) 統計方法，其影響因子為有收集或陽性者，而雨刷水為有採樣有分析之樣本，檢定影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出的相關性，設定其  $\alpha$  值為 0.05；另外對於欲放入多變項進行統計分析者，設定其  $\alpha$  值為 0.2。

對於連續變項之影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度，以斯皮爾曼等級相關係數 (Spearman correlation) 統計方法，其影響因子為有收集或陽性者，而雨刷水為陽性樣本，檢定影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度的相關性，設定

其  $\alpha$  值為 0.05；另外對於欲放入多變項進行統計分析者，設定其  $\alpha$  值為 0.2。對於兩組變項之影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度，以魏可遜等級和考驗 (Wilcoxon rank sum test) 統計方法，其影響因子為有收集或陽性者，而雨刷水為陽性樣本，檢定影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度的相關性，設定其  $\alpha$  值為 0.05；另外對於欲放入多變項進行統計分析者，設定其  $\alpha$  值為 0.2。對於三組以上變項之影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度，以克-瓦二氏單因子等級變異數分析 (Kruskal-Wallis test) 統計方法，其影響因子為有收集或陽性者，而雨刷水為陽性樣本，檢定影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度的相關性，設定其  $\alpha$  值為 0.05；另外對於欲放入多變項進行統計分析者，設定其  $\alpha$  值為 0.2。

#### (4) 以多變項分析探討影響因子與 *Legionella* 的相關性(附錄二)

分為三種模式，分別為車體資訊、雨刷水操作維護和水質條件，對於影響因子和雨刷水中 *Legionella* 的檢出，以多變項邏輯氏逐步迴歸 (Multiple logistic regression with stepwise procedure) 統計方法，其影響因子為單變項有顯著者 ( $P < 0.2$ )，而雨刷水為有採樣有分析，檢定影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出的相關性，設定其  $\alpha$  值為 0.02，主要是為了篩選重要變項進入最後模式。

分為三種模式，分別為車體資訊、雨刷水操作維護和水質條件，對於影響因子和雨刷水中 *Legionella* 的檢出濃度，以多變項線性逐步迴歸 (Multiple linear regression with stepwise procedure) 統計方法，其影響因子為單變項有顯著者 ( $P < 0.2$ )，而雨刷水為陽性樣本，檢定影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度的相關性，設定其  $\alpha$  值為 0.02，主要是為了篩選重要變項進入最後模式。對於在各 3 個多變項模式顯著的影響因子和雨刷水中 *Legionella* 的檢出濃度，由於全部納入 Tank 和 Outlet 的 *Legionella* 檢出濃度及水質條件，且重複放入雨刷水操作維護及用車習慣，屬於重複性樣本，故以廣義估計方程式 (Generalized estimating equation) 統計方法，其影響因子為個別多變項模式有顯著者 ( $P < 0.2$ )，而雨刷水為

陽性樣本，檢定影響因子和雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度的相關性，設定其  $\alpha$  值為 0.05。

#### (5) 比較職業駕駛與非職業駕駛

對於職業駕駛和非職業駕駛的 *Legionella* 檢出，以費雪精確性檢定 (Fisher exact test) 統計方法，需為職業駕駛和非職業駕駛皆為有採樣的樣本，檢定職業駕駛和非職業駕駛的 *Legionella* 檢出有無差異，設定其  $\alpha$  值為 0.05。對於職業駕駛和非職業駕駛的 *Legionella* 檢出濃度，以魏可遜等級和考驗 (Wilcoxon rank sum test) 統計方法，需為職業駕駛和非職業駕駛皆為有採樣的樣本，檢定職業駕駛和非職業駕駛的 *Legionella* 檢出濃度有無差異，設定其  $\alpha$  值為 0.05。對於職業駕駛和非職業駕駛的雨刷水操作維護及車體資訊，以魏可遜等級和考驗 (Wilcoxon rank sum test) 和費雪精確性檢定 (Fisher exact test) 統計方法，需為雨刷水操作維護及車體資訊皆為有收集的樣本，檢定職業駕駛和非職業駕駛的雨刷水操作維護及車體資訊有無差異，設定其  $\alpha$  值為 0.05。

#### (6) 比較自來水與雨刷水

對於自來水和雨刷水的水質條件與 *Legionella* 檢出濃度，以斯皮爾曼等級相關係數 (Spearman correlation) 統計方法，需為自來水和雨刷水的水質條件與 *Legionella* 皆為陽性樣本，檢定自來水和雨刷水的水質條件與 *Legionella* 檢出濃度是否有差異，設定其  $\alpha$  值為 0.05。對於自來水和雨刷水的 *Legionella* 檢出，以簡單邏輯氏迴歸分析 (Simple logistic regression) 統計方法，需為自來水和雨刷水皆為有採樣且有分析的樣本，檢定自來水和雨刷水的檢出有無差異，設定其  $\alpha$  值為 0.05。對於自來水和雨刷水的 *Legionella* 檢出濃度，以克-瓦二氏單因子等級變異數分析 (Kruskal-Wallis test) 統計方法，需為自來水和雨刷水皆為陽性樣本，檢定自來水和雨刷水的檢出濃度有無差異，設定其  $\alpha$  值為 0.05。

## 第五章 結果

### 5.1 採樣對象

#### 5.1.1 採樣對象之車輛資訊

本研究在 3 個汽車維修廠及 2 個計程車休息服務站，以立意採樣方式進行環境樣本的收集，共採集 59 輛車，Table 6 顯示其中有 37 輛 (62.7%) 為民眾自用車，22 輛 (37.3%) 為計程車。全部 59 輛車的平均車齡為 7.2 年；在車行公里數方面，全部車輛的平均值為 15 萬 5172 公里；在廠牌部分，以 T 牌為最大宗，共有 26 輛 (44.1%)，其次依序為 F 牌有 8 輛 (13.6%) 與 N 牌有 6 輛 (10.2%)，計程車中亦以 T 牌為主 (68.2%)；而 T 牌和 L 牌在目前台灣的市場占有率為 31.8%，N 牌和 I 牌共有 11.8%、F 牌為 5.1% 的市場占有率 (2012 年 6 月份臺灣汽車市場銷售報告)。在車種部分，以四門房車 (Sedan) 為最大宗有 54 輛 (91.5%)，其他另有 3 輛 (5.1%) 休旅車 (MPV) 和 1 輛 (3.4%) 廂型車 (Van)。

Table 6 The vehicle information of private cars and taxis

	All vehicles	Private cars	Taxis
N (%)	59 (100.0)	37 (62.7)	22 (37.3)
Vehicle age (year, mean± SD)	7.2 ± 5.3	9.6 ± 5.3	4.2 ± 3.3
Mileage (km, mean± SD)	155172.5 ± 113568.9	124804.3 ± 83200.7	194218.5 ± 135886.3
Vehicle brand	T brand	11 (29.7)	15 (68.2)
, N (%)	F brand	8 (21.6)	0 (0.0)
	N brand	4 (10.8)	2 (9.1)
	Others	13 (35.1)	2 (9.1)
	Unkown	1 (2.7)	3 (13.6)
Vehicle	Sedan	32 (86.5)	22 (100.0)

classification,	MPV <sup>a</sup>	3	(5.1)	3	(8.1)	0	(0.0)
N (%)	Van	2	(3.4)	2	(5.4)	0	(0.0)

a:Multi-Purpose Vehicle (MPV)

### 5.1.2 採樣對象之雨刷水操作維護

以問卷方式針對車主進行訪談，了解車主對車輛中雨刷水操作維護的狀況，Table 7 中的問卷內容共有 8 個問題；(1)為是否更換或清洗雨刷水桶，其中只有 5 輛車 (9.6%)的雨刷水曾經被更換過，另外 47 輛 (90.4%)則是從未更換或清洗雨刷水桶；(2)只針對 5 輛有更換或清洗雨刷水桶者，詢問其距離上次更換或清洗的時間，平均天數為 771.2 天。

(3)為是否添加雨刷精潔劑，其中有 42 輛車 (80.8%)有添加雨刷清潔劑，只有 10 輛車 (19.2%)沒有添加與刷清潔劑；(4)只針對 42 輛有添加雨刷清潔劑者，詢問添加雨刷清潔劑種類，其中有 24 輛車 (57.2%)添加的是市售雨刷精，另外 9 輛車 (21.4%)則是添加家用清潔劑，而有 9 輛車 (21.4%)的清潔劑種類為未知；(5)同樣只針對有 42 輛添加雨刷清潔劑者，詢問添加雨刷清潔劑的稀釋比率，主要有 16 輛車 (38.1%)的雨刷清潔劑稀釋比率為 1:50，其次為 7 輛車 (16.7%)的雨刷清潔劑稀釋比率為 1:10，稀釋比率為 1:1 的有 3 輛車 (7.1%)，依照產品說明的有 3 輛 (7.1%)，未進行雨刷清潔劑稀釋的有 1 輛車 (2.4%)；(6)只針對有添加雨刷清潔劑者，了解其雨刷清潔劑的添加頻率，有 12 輛車 (28.6%)為每 6 個月-1 年添加 1 次，另外有 10 輛車 (23.8%)為每 2-6 個月，各有 4 輛車 (9.5%)為每月及每周添加，而有 3 輛 (7.1%)添加頻率為 1 年以上，最後，有 1 輛 (2.4%)因為是新車購入，尚未添加過。

(7)為針對 10 輛未添加雨刷清潔劑者，其添加自來水的頻率，有 3 輛車 (30%)為每月添加，各有 1 輛車 (10%)是每周及每 2-6 個月添加 1 次自來水，再者，其中有 1 輛車 (10%)因為是新車購入，尚未添加過；(8)不論有無添加雨刷精者，

皆收集車主距離上次添加雨刷水的時間，共有 45 輛車的資訊被收齊，其平均天數為 85.5 天。

Table 7 Wiper fluid maintenance of all vehicles

		所有車輛, N(%)
是否更換/清洗過雨刷水	是	5 (9.6)
桶 (N=52)	否	47 (90.4)
距離上次更換/清洗雨刷	Mean	771.2
水桶之時間 (day, N=5)	SD	815.9
是否有添加過雨刷清潔劑 (N=52)	是	42 (80.8)
	否	10 (19.2)
添加雨刷清潔劑的種類 (N=42)	市售雨刷精	24 (57.2)
	家用清潔劑	9 (21.4)
	未知	9 (21.4)
添加雨刷清潔劑的稀釋比率(N=42)	否	1 (2.4)
	1:1	3 (7.1)
	1:10	7 (16.7)
	1:50	16 (38.1)
	按產品使用說明	3 (7.1)
	未知	12 (28.6)
添加雨刷清潔劑的頻率 (N=42)	從未	1 (2.4)
	每 1 年以上	3 (7.1)
	每 6 個月~1 年	12 (28.6)
	每 2-6 個月	10 (23.8)
	每月	4 (9.5)



	每周	4 (9.5)
	未知	8 (19.1)
未添加雨刷清潔劑者其	從未	1 (10.0)
添加自來水的頻率	每 1 年以上	2 (20.0)
(N=10)	每 6 個月~1 年	2 (20.0)
	每 2-6 個月	1 (10.0)
	每月	3 (30.0)
	每周	1 (10.0)
距離上次補充雨刷水的	Mean	85.5
時間 (day, N=45)	SD	177.1

## 5.2 雨刷水之 *Legionella* 分析

### 5.2.1 雨刷水 *Legionella* 陽性樣本數與陽性檢出率

在 59 輛車輛中，其中有 7 件雨刷水桶 (Tank) 樣本因水量不足未採樣，共採集了 52 件雨刷水桶樣本。Table 8 顯示 52 樣本中測得總 *Legionella* spp. 者有 47 件 (90.4%)，未測得者有 5 件 (9.6%)；測得總 *L.pneumophila* 者有 41 件 (78.9%)，未測得者有 11 件 (21.1%)。在活性 *Legionella* spp. 方面，共有 46 件陽性樣本 (88.5%)，6 件為陰性 (11.5%)；活性 *L.pneumophila* 者共有 31 件陽性樣本 (59.6%)，陰性則有 21 件 (40.4%)。在可培養性 *Legionella* spp. 方面，陽性與陰性樣本各有 22 件 (42.3%) 與 30 件 (57.7%)；至於可培養性 *L.pneumophila* 之陽性樣本則為 17 件 (32.7%)，陰性有 35 件 (67.3%)。

在雨刷水出水口 (Outlet) 樣本部分，有 2 輛車因雨刷水出水口樣本採樣困難而無法取樣，故共收集 57 件雨刷水出水口樣本。Table 8 顯示測得總 *Legionella* spp. 者有 56 件 (98.3%)，未測得者有 3 件 (1.7%)；測得總 *L.pneumophila* 者有 43 件 (75.4%)，未測得者有 14 件 (24.6%)。在活性 *Legionella* spp. 之測量結果，共得到

54 件陽性樣本 (94.7%)，3 件為陰性 (5.3%)；活性 *L.pneumophila* 者共有 33 件陽性樣本 (57.9%)，陰性則有 24 件 (42.1%)。在可培養性 *Legionella* spp. 方面，陽性與陰性樣本各有 32 件 (56.1%)與 25 件 (43.9%)；至於可培養性 *L.pneumophila* 之陽性樣本則為 16 件 (28.1%)，陰性有 41 件 (71.9%)。

Table 8 (附錄 Figure C-1) 為比較雨刷水出水口和雨刷水桶之陽性檢出率，雨刷水桶樣本中的總、活性和可培養性 *L.pneumophila* 陽性檢出率 (78.9%、59.6% 和 32.7%) 皆略高於雨刷水出水口樣本 (75.4%、57.9% 和 28.1%)，但未達顯著差異 (McNemar test,  $P>0.05$ )；而在 *Legionella* spp. 方面，不論是總、活性和可培養性 *Legionella* spp.，雨刷水出水口樣本的陽性檢出率 (98.3%、94.7% 和 56.1%) 皆略高於雨刷水桶樣本 (90.4%、88.5% 和 42.3%)，但未達顯著差異 (McNemar test,  $p>0.05$ )。



Table 8 Prevalence of *Legionellae* in wiper fluid samples of tank and outlet<sup>a</sup>

	陽性率, % (N)					
	總細菌		活性細菌		可培養性細菌	
	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>
<b>Tank</b>	90.4	78.9	88.5	59.6	42.3	32.7
(N=52)	(47)	(41)	(46)	(31)	(22)	(17)
<b>Outlet</b>	98.3	75.4	94.7	57.9	56.1	28.1
(N=57)	(56)	(43)	(54)	(33)	(32)	(16)
<b>P value<sup>b</sup></b>	0.10	0.16	0.71	1.00	0.07	0.83

a:總車輛為 59 輛，其中有 7 輛車之 Tank 樣本因水量不足故未採樣；另有 2 輛車因 Outlet 樣本採樣困難而無法採樣；N 為樣本數

b:以 McNemar test 檢定雨刷水桶 (Tank)與雨刷水出水口 (Outlet)的陽性檢出率是否有差異

### 5.2.2 雨刷水 *Legionella* 陽性樣本之檢出濃度

Table 9 (附錄 Figure C-2)顯示，在 52 件雨刷水桶的樣本中，總 *Legionella* spp. 為陽性者有 47 件，平均濃度為  $4.4 \times 10^6$  cells/mL，範圍介於  $3.8 \times 10^1 - 1.9 \times 10^8$  cells/mL；總 *L. pneumophila* 為陽性者有 41 件，平均濃度為  $1.3 \times 10^3$  cells/mL，範圍為  $2.6 \times 10^1 - 7.6 \times 10^3$  cells/mL。活性 *Legionella* spp. 為陽性者有 46 件，平均濃度為  $4.0 \times 10^6$  cells/mL (範圍為  $4.9 \times 10^0 - 1.8 \times 10^8$  cells/mL)，而活性 *L. pneumophila* 為陽性則有 31 件，平均濃度為  $7.9 \times 10^2$  cells/mL (範圍為  $1.1 \times 10^1 - 4.0 \times 10^3$  cells/mL)。

雨刷水出水口 57 件樣本部分，總 *Legionella* spp. 為陽性者有 56 件，平均濃度為  $3.9 \times 10^6$  cells/mL (範圍為  $3.2 \times 10^2 - 1.5 \times 10^8$  cells/mL)；總 *L. pneumophila* 為陽性者有 43 件，平均濃度為  $1.3 \times 10^3$  cells/mL，(範圍為  $5.7 \times 10^0 - 5.1 \times 10^3$  cells/mL)。活性 *Legionella* spp. 為陽性者共有 54 件，平均濃度為  $3.0 \times 10^6$  cells/mL (範圍為  $2.0 \times 10^1 - 1.5 \times 10^8$  cells/mL)；活性 *L. pneumophila* 陽性者則有 33 件，平均濃度為  $5.3 \times 10^2$  cells/mL (範圍為  $1.5 \times 10^1 - 2.9 \times 10^3$  cells/mL)。

比較雨刷水出水口和雨刷水桶陽性樣本之檢出濃度(附錄 Figure C-2)，雨刷水桶樣本中總與活性的 *Legionella* spp. 平均濃度 ( $4.4 \times 10^6$  和  $4.0 \times 10^6$  cells/mL) 分別略高於雨刷水出水口的樣本 ( $3.9 \times 10^6$  和  $3.0 \times 10^6$  cells/mL)，而雨刷水桶與雨刷水出水口的總與活性 *Legionella* spp. 平均濃度皆達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test,  $P < 0.0001$ )；總與活性的 *L. pneumophila* 平均濃度在兩者亦達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test,  $P < 0.0001$ )；另外，雨刷水桶中陽性樣本的總及活性 *Legionella* spp. 平均濃度 ( $4.4 \times 10^6$  和  $4.0 \times 10^6$  cells/mL) 皆分別顯著高於總及活性 *L. pneumophila* 檢出濃度 ( $1.3 \times 10^3$  和  $7.9 \times 10^2$  cells/mL) (Wilcoxon Rank sum test,  $P < 0.0001$ )；在雨刷水出水口的部分，總及活性 *Legionella* spp. 平均濃度 ( $3.9 \times 10^6$  和  $3.0 \times 10^6$  cells/mL) 也分別顯著高於總及活性 *L. pneumophila* 檢出濃度 ( $1.3 \times 10^3$  和  $5.3 \times 10^2$  cells/mL) (Wilcoxon Rank sum test,  $P < 0.0001$ )。

Table 9 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples of tank and outlet

		總細菌 (cells/mL)		活性細菌 (cells/mL)	
		<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i> <sup>a</sup>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>
Tank	Mean	4.4 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>	4.0 x 10 <sup>6</sup>	7.9 x 10 <sup>2</sup>
	Median	1.3 x 10 <sup>4</sup>	4.7 x 10 <sup>2</sup>	4.3 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>2</sup>
	SD	2.8 x 10 <sup>7</sup>	1.7 x 10 <sup>3</sup>	2.7x 10 <sup>7</sup>	1.2 x 10 <sup>3</sup>
	Range	3.8 x 10 <sup>1</sup> – 1.9 x 10 <sup>8</sup>	2.6 x 10 <sup>1</sup> – 7.6 x 10 <sup>3</sup>	4.9 x 10 <sup>0</sup> – 1.8 x 10 <sup>8</sup>	1.1 x 10 <sup>1</sup> – 4.0 x 10 <sup>3</sup>
	N	47	41	46	31
Outlet	Mean	3.9 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>	3.0 x 10 <sup>6</sup>	5.3 x 10 <sup>2</sup>
	Median	4.2 x 10 <sup>4</sup>	4.8 x 10 <sup>2</sup>	8.3 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>2</sup>
	SD	2.1 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>3</sup>	2.1 x 10 <sup>7</sup>	8.0 x 10 <sup>2</sup>
	Range	3.2 x 10 <sup>2</sup> – 1.5 x 10 <sup>8</sup>	5.7 x 10 <sup>0</sup> – 5.1 x 10 <sup>3</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup> – 1.5 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>1</sup> – 2.9 x 10 <sup>3</sup>
	N	56	43	54	33
P value <sup>a</sup>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

a:以 Wilcoxon signed rank test 檢定雨刷水桶 (Tank)與雨刷水出水口 (Outlet)的陽性檢出率是否有差異

### 5.2.3 雨刷水桶與其出水口之 *Legionella*

#### 5.2.3.1 雨刷水桶與其出水口 *Legionella* 檢出情形

本研究計算雨刷水出水口中 *Legionella* 濃度與雨刷水桶內所得濃度之比值 (O/T, Ratio of Outlet/Tank)，若比值大於 1，代表雨刷水出水口退伍軍人菌濃度高於雨刷水桶。刪除 59 輛車中 7 輛因 Tank 水量不足未採樣，以及 2 輛因 Outlet 採樣困難而無法採樣後，雨刷水出水口與雨刷水桶皆有採集者共有 50 輛車。

Table 10 顯示 50 輛車在雨刷水桶與出水口處之 *Legionella* spp. 檢出情形，50 輛車中有 5 輛車 (10%) 的雨刷水桶檢出總 *Legionella* spp.，但其雨刷水出水口卻呈現陰性反應；反之，有 1 輛車 (2%) 的雨刷水出水口檢出總 *Legionella* spp.，但其雨刷水桶卻為陰性；另外，共有 44 輛車 (88%) 的雨刷水桶及雨刷水出水口皆為陽性檢出；在活性的部分，50 輛車中有 6 輛車 (12%) 的雨刷水桶檢出活性 *Legionella* spp.，但其雨刷水出水口卻呈現陰性反應；反之，有 2 輛車 (4%) 的雨刷水出水口檢出活性 *Legionella* spp.，但其雨刷水桶卻為陰性；共有 42 輛車 (84%) 的雨刷水桶及雨刷水出水口皆為陽性檢出。

Table 10 Number of wiper fluid samples with detection of *Legionella* spp. in tank and outlet of wiper fluid

	N (%)					
	總 <i>Legionella</i> spp. (N=50) <sup>a</sup>			活性 <i>Legionella</i> spp. (N=50) <sup>a</sup>		
	Tank + <sup>b</sup>	Tank - <sup>c</sup>	Total	Tank + <sup>b</sup>	Tank - <sup>c</sup>	Total
Outlet + <sup>b</sup>	44 (88.0)	1 (2.0)	45 (90.0)	42 (84.0)	2 (4.0)	44 (88.0)
Outlet - <sup>c</sup>	5 (10.0)	0 (0.0)	5 (10.0)	6 (12.0)	0 (0.0)	6 (12.0)
Total	49	1	50	48	2	50

( 98.0) ( 2.0) (100.0) ( 96.0) ( 4.0) (100.0)

a:總車輛為 59 輛，其中有 7 個 Tank 樣本因水量不足未採樣；而有 2 個 Outlet 樣本因採樣困難而無法採樣，故總樣本數為 50。

b:”+”代表陽性樣本

c:”-”代表陰性樣本

Figure 6 為雨刷水出水口 *Legionella* spp. 濃度與雨刷水桶 *Legionella* spp. 濃度之比值分布，另根據 Figure 6 顯示，有 4 輛車 (9.1%) 之總 *Legionella* spp. 濃度的 O/T 比值大於 100 (分別為 190.1、191.3、207.7 與 263.9)；另外，有 2 輛車 (4.8%) 的活性 *Legionella* spp. 濃度比值大於 100 (分別為 186.2 與 405.9)。

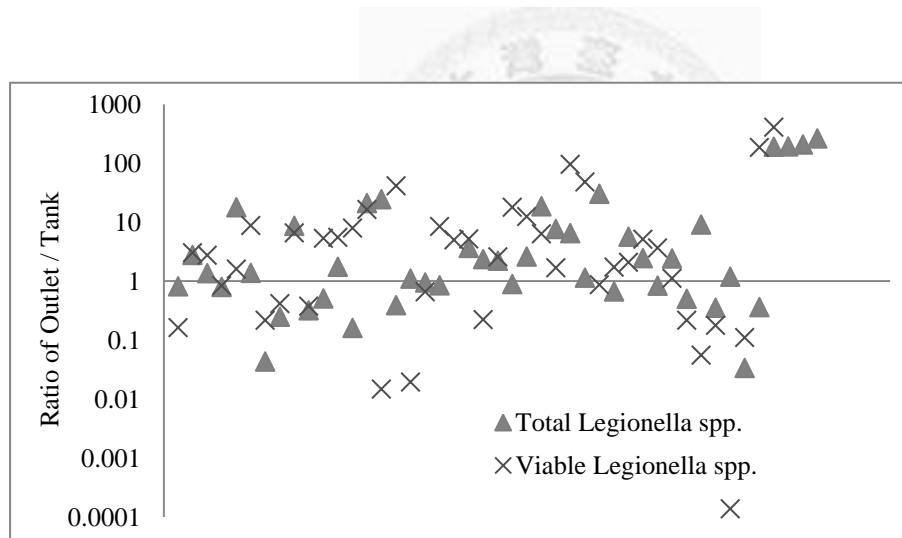


Figure 6 Ratio of of *Legionella* spp. concentration in outlet and tank (O/T) of wiper fluid samples

Table 11 為總及活性 *Legionella* spp. 之平均 O/T，44 件總 *Legionella* spp. 之平均 O/T 值為 23.6，範圍介於 0.03 – 44，而活性 *Legionella* spp. 之平均 O/T 值為 21.7，範圍介於 0.0001 – 42；為避免部分極端值的影響，在去除總 *Legionella* spp. 之 O/T 值大於 100 之 4 件樣本和活性 *Legionella* spp. 之 O/T 值大於 100 之 2 件樣本後，Table 11 顯示總 *Legionella* spp. 之平均 O/T 平均值為 4.6，顯示在雨刷水出

水口之總 *Legionella* spp. 濃度平均為雨刷水桶的 4.6 倍；活性 *Legionella* spp. 之平均 O/T 平均值為 8.0，顯示在雨刷水出水口之活性 *Legionella* spp. 濃度平均為雨刷水桶的 8 倍。

Table 11 Ratio of *Legionella* spp. concentration in Outlet and Tank samples (O/T)<sup>a</sup>

		總 <i>Legionella</i>	活性 <i>Legionella</i>
所有樣本	N	44	42
	Mean ± SD	23.6 ± 61.8	21.7 ± 68.8
	Range	0.03 - 44	0.0001 - 42
去除極端值後 的樣本 <sup>b</sup>	N	40	40
	Mean ± SD	4.6 ± 7.4	8.0 ± 17.5
	Range	0.03 - 30.3	0.0001 - 96

a: O/T = 雨刷水出水口 (Outlet) 退伍軍人菌濃度 / 雨刷水桶 (Tank) 濃度

b: 雨刷水桶 (Tank) 與雨刷水出水口 (Outlet) 皆為陽性且 O/T ≤ 100 之樣本數  
去除 O/T > 100 之

Table 12 顯示 50 輛車在雨刷水桶與出水口處之 *L. pneumophila* 檢出情形，50 輛車中有 3 輛車 (6%) 的雨刷水桶檢出總 *L. pneumophila*，但其雨刷水出水口卻呈現陰性反應；反之，有 4 輛車 (8%) 的雨刷水出水口檢出總 *L. pneumophila*，但其雨刷水桶為陰性，另外，共有 7 輛車 (14%) 的雨刷水桶及雨刷水出水口皆為陰性，共有 36 輛車 (72%) 的雨刷水桶及雨刷水出水口皆為陽性；在活性的部分，50 輛車中有 6 輛車 (12%) 的雨刷水桶檢出活性 *L. pneumophila*，但其雨刷水出水口卻呈現陰性反應；反之，有 6 輛車 (12%) 的雨刷水出水口檢出活性 *L. pneumophila*，但其雨刷水桶為陰性，另外，共有 6 輛車 (12%) 的雨刷水桶及雨刷水出水口皆為陰性，共有 25 輛車 (50%) 的雨刷水桶及雨刷水出水口皆為檢出。



Table 12 Number of wiper fluid samples with detection of *L. pneumophila* in tank and outlet of wiper fluid system

	N (%)					
	總 <i>L. pneumophila</i> (N=50) <sup>a</sup>			活性 <i>L. pneumophila</i> (N=50)		
	Tank + <sup>b</sup>	Tank - <sup>c</sup>	Total	Tank + <sup>b</sup>	Tank - <sup>c</sup>	Total
Outlet + <sup>b</sup>	36 (72.0)	4 (8.0)	40 (80.0)	25 (50.0)	6 (12.0)	31 (62.0)
Outlet - <sup>c</sup>	3 (6.0)	7 (14.0)	10 (20.0)	6 (12.0)	13 (26)	19 (38.0)
Total	39 (78.0)	11 (22.0)	50 (100.0)	31 (62.0)	19 (38.0)	50 (100.0)

a:總車輛為 59 輛，其中有 7 個 Tank 樣本因水量不足未採樣；而有 2 個 Outlet 樣本因採樣困難而無法採樣

b: "+" 代表陽性樣本

c: "-" 代表陰性樣本

Figure 7 為雨刷水出水口 *L.pneumophila* 濃度與雨刷水桶 *L.pneumophila* 濃度之比值分布，所有的總及活性 *L.pneumophila* 濃度的 O/T 比值皆小於 100。

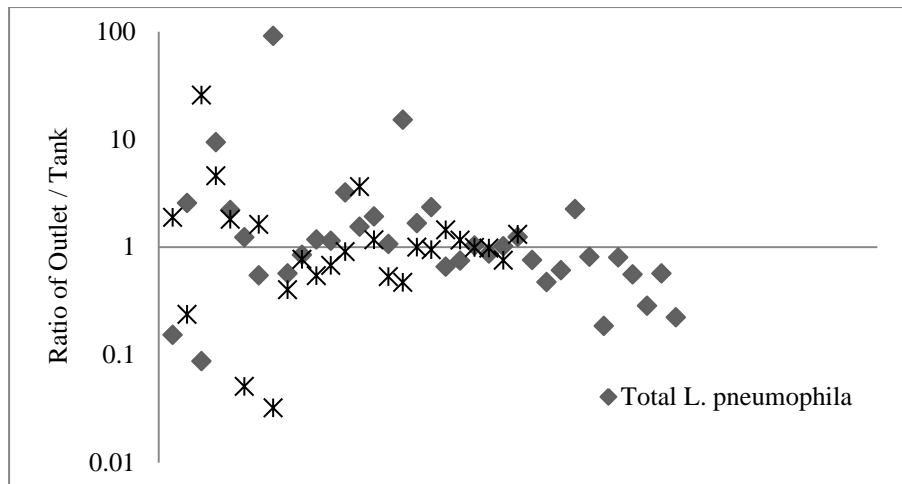


Figure 7 Ratio of of *L.pneumophila* concentration in outlet and tank (O/T) of wiper fluid samples

Table 13 顯示總 *L.pneumophila* 之平均 O/T 平均值為 4.2，顯示在雨刷水出水口之總 *L.pneumophila* 濃度平均為雨刷水桶的 4.2 倍；活性 *L.pneumophila* 之平均 O/T 平均值為 2.1，顯示在雨刷水出水口之活性 *L.pneumophila* 濃度平均為雨刷水桶的 2.1 倍。

Table 13 Ratio of *L. pneumophila* concentration in Outlet and Tank samples (O/T)<sup>a</sup>

	總 <i>Legionella</i> (N=36)	活性 <i>Legionella</i> (N=25)
Mean ± SD <sup>b</sup>	4.2 ± 15.2	2.1 ± 5.0
Range	0.09 - 91.2	0.03 - 25.7

a: O/T = 雨刷水出水口 (Outlet) 退伍軍人菌濃度 / 雨刷水桶 (Tank) 濃度

b: 雨刷水桶 (Tank) 與雨刷水出水口 (Outlet) 皆為陽性且 O/T ≤ 100 之樣本數

### 5.2.3.2 雨刷水桶 *Legionella* 活性率

在雨刷水桶和雨刷水出水口的樣本中，只有總及活性 *Legionella* 皆有檢出者 (亦即均為陽性樣本者)，才可納入計算其活性率 (viability, % = 活性 *Legionella* 濃度/總 *Legionella* 濃度)。

Table 14 顯示，在 52 件雨刷水桶樣本中，有 5 件樣本 (9.6%) 無法檢出總及活性 *Legionella* spp.，有 1 樣本 (1.9%) 可檢出總 *Legionella* spp. 但無法檢出活性 *Legionella* spp.，另則有 46 件樣本 (88.5%) 其總及活性 *Legionella* spp. 皆為陽性。進一步計算此 46 件樣本之 *Legionella* spp. 活性率 (viability)，其平均值為 37.0%，而其範圍介於 0.2- 95.2% (Table 16, 附錄 Figure C-3)。

在 *L. pneumophila* 方面，Table 15 顯示，52 件雨刷水桶樣本中有 11 件樣本 (21.2%) 其總及活性 *L. pneumophila* 皆為陰性，有 10 件樣本 (19.2%) 其總 *L. pneumophila* 為陽性但無法檢出活性 *L. pneumophila*；另共有 31 件樣本 (59.6%) 為總及活性 *L. pneumophila* 皆為陽性，計算此 31 件樣本，其活性率平均為 44.9%，範圍介於 4.7 - 106.9% (Table 16, 附錄 Figure C-3)。

Table 14 Number of wiper fluid samples with detection of total, viable, and culturable *Legionella* spp. in tank and outlet

	樣本數 (%)					
	Tank (N=52)			Outlet (N=57)		
	Total + <sup>a</sup>	Total - <sup>a</sup>	Overall	Total + <sup>a</sup>	Total - <sup>a</sup>	Overall
Viable + <sup>a</sup>	46 ( 88.5 )	0 ( 0.0 )	46 ( 88.5 )	54 ( 94.7 )	0 ( 0.0 )	54 ( 94.7 )
Viable - <sup>a</sup>	1 ( 1.9 )	5 ( 9.6 )	6 ( 11.5 )	2 ( 3.5 )	1 ( 1.8 )	3 ( 5.3 )
Culturable + <sup>a</sup>	22 ( 42.3 )	0 ( 0.0 )	22 ( 42.3 )	32 ( 56.1 )	0 ( 0.0 )	32 ( 56.1 )
Culturable - <sup>a</sup>	25 ( 48.1 )	5 ( 9.6 )	30 ( 57.7 )	24 ( 42.1 )	1 ( 1.8 )	25 ( 43.9 )
Overall	47 ( 90.4 )	5 ( 9.6 )	52 (100.0)	56 ( 98.2 )	1 ( 1.8 )	57 (100.0)

a :”+”代表陽性樣本，”-“代表陰性樣本

Table 15 Number of wiper fluid samples with detection of total, viable, and culturable *L. pneumophila* in tank and outlet

	樣本數 (%)					
	Tank ( n = 52 )			Outlet ( n = 57 )		
	Total + <sup>a</sup>	Total - <sup>a</sup>	Overall	Total + <sup>a</sup>	Total - <sup>a</sup>	Overall
Viable + <sup>a</sup>	31 ( 59.6 )	0 ( 0.0 )	31 ( 59.6 )	33 ( 57.9 )	0 ( 0.0 )	33 ( 57.9 )
Viable - <sup>a</sup>	10 ( 19.2 )	11 ( 21.2 )	21 ( 40.4 )	10 ( 17.5 )	14 ( 24.6 )	24 ( 42.1 )
Culturable + <sup>a</sup>	17 ( 32.7 )	0 ( 0.0 )	17 ( 32.7 )	16 ( 28.1 )	0 ( 0.0 )	16 ( 28.1 )
Culturable - <sup>a</sup>	24 ( 46.2 )	11 ( 21.2 )	35 ( 67.3 )	27 ( 47.4 )	14 ( 24.6 )	41 ( 71.9 )
Overall	41 ( 78.8 )	11 ( 21.2 )		43 ( 75.4 )	14 ( 24.6 )	

a: ”+”代表陽性樣本，”-“代表陰性樣本

Table 16 Viability of *Legionella* in wiper fluid samples of tank and outlet

	活性率, % <sup>a</sup>			
	<i>Legionella</i> spp.		<i>L. pneumophila</i>	
	Tank	Outlet	Tank	Outlet
Mean ± SD	37.0 ± 30.4	37.3 ± 30.4	44.9 ± 29.4	46.3 ± 26.2
Range	0.2 - 95.2	0.01 - 99.2	4.7 - 106.9	2.1 - 86.9
N <sup>b</sup>	46	54	31	33

a: 活性率 (Viability) = (活性 *Legionella* 濃度 / 總 *Legionella* 濃度) \* 100%

b: 只計算總及活性均為陽性的樣本

### 5.2.3.3 兩刷水出水口 *Legionella* 活性率

在 57 件兩刷水出水口樣本中，Table 14 顯示，有 1 件樣本 (1.8%) 無法測得總及活性 *Legionella* spp.，另有 2 件樣本 (3.5%) 可檢出總 *Legionella* spp. 但其活性 *Legionella* spp. 為陰性，另共有 54 件樣本 (94.7%) 為總及活性 *Legionella* spp. 皆為陽性。計算此 54 件樣本，其平均活性率為 37.3%，範圍介於 0.01 - 99.2% (Table 17)。

在 *L. pneumophila* 方面，Table 17 顯示，有 14 個兩刷水出水口樣本 (24.6%) 其總及活性 *L. pneumophila* 皆為陰性，另有 10 件樣本 (17.5%) 可檢出總 *L. pneumophila* 陽性但無法測得活性 *L. pneumophila*，另共有 33 件樣本 (57.9%) 為總及活性 *L. pneumophila* 皆為陽性，計算其 33 件樣本之平均活性率為 46.3%，範圍介於 2.1 - 86.9% (Table 17)。

### 5.2.3.4 兩刷水桶與其出水口 *Legionella* 活性率之比較

比較兩刷水桶與其出水口之 *Legionella* 活性率，Table 16 顯示，兩刷水出水口樣本中的 *Legionella* spp. 和 *L. pneumophila* 平均活性率皆高於兩刷水桶之值，

但兩刷水桶和兩刷水出水口的 *Legionella* spp.和 *L. pneumophila* 平均活性率活性率皆未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test,  $P=0.31$  和  $0.57$ )。

#### 5.2.3.5 兩刷水桶及其出水口 *Legionella* 可培養性

在 *Legionella* spp.可培養性部分, Table 14 顯示 52 件兩刷水桶樣本中, 有 22 件 (42.3%)樣本其總與可培養 *Legionella* spp.均屬陽性, 另有 25 件 (48.1%)樣本其總 *Legionella* spp.為陽性但可培養性 *Legionella* spp.為陰性, 另有 5 件 (9.6%)樣本則為總及可培養性 *Legionella* spp.皆屬陰性。在 *L. pneumophila* 方面, Table 15 顯示有 17 件 (32.7%)樣本可檢出總與可培養 *L. pneumophila*, 另有 24 件 (46.2%)樣本其總 *L. pneumophila* 為陽性但可培養性 *L. pneumophila* 為陰性, 另有 11 件 (21.2%)則是總及可培養性 *L. pneumophila* 皆為陰性。

對於 57 件兩刷水出水口樣本而言, Table 14 顯示 57 件兩刷水桶樣本中, 有 32 件 (56.1%)樣本其總與可培養 *Legionella* spp.均屬陽性, 另有 24 件 (42.1%)樣本其總 *Legionella* spp.為陽性但可培養性 *Legionella* spp.為陰性, 另有 1 件 (1.8%)樣本則為總及可培養性 *Legionella* spp.皆屬陰性。在 *L. pneumophila* 方面, Table 15 顯示有 16 件 (28.1%)樣本可檢出總與可培養 *L. pneumophila*, 另有 27 件 (47.4%)樣本其總 *L. pneumophila* 為陽性但可培養性 *L. pneumophila* 為陰性, 另有 14 件 (24.6%)則是總及可培養性 *L. pneumophila* 皆為陰性。

#### 5.2.3.6 兩刷水桶嗜肺性退伍軍人菌占退伍軍人菌屬之比率

在總 *Legionella* 方面, Table 17 顯示 52 件兩刷水桶樣本中, 有 5 件樣本 (9.6%)其總 *L. pneumophila* 及 *Legionella* spp.皆為陰性, 另有 6 件樣本 (11.5%)無法檢出總 *L. pneumophila* 但其總 *Legionella* spp.為陽性, 另共有 41 件樣本 (78.8%)其總 *L. pneumophila* 及總 *Legionella* spp.皆為陽性, 故進一步計算此 41 件樣本之總 *L. pneumophila* 濃度占其 *Legionella* spp.濃度之比率, 顯示其平均為 13.2%,

範圍則相當大，介於 0.00007 - 102.7% (Table 19)。

在活性 *Legionella* 方面，Table 18 顯示 52 件雨刷水桶樣本中，有 6 件樣本 (11.5%) 其活性 *L. pneumophila* 及 *Legionella* spp. 皆為陰性，另有 15 件樣本 (28.8%) 無法檢出活性 *L. pneumophila* 但其活性 *Legionella* spp. 為陽性，另共有 31 件樣本 (59.6%) 其活性 *L. pneumophila* 及總 *Legionella* spp. 皆為陽性，故進一步計算此 31 件樣本之活性 *L. pneumophila* 濃度占其 *Legionella* spp. 濃度之比率，顯示其平均為 22.6%，範圍則相當大，介於 0.00005 - 100 % (Table 19)。

### 5.2.3.7 雨刷水出水口嗜肺性退伍軍人菌占退伍軍人菌屬之比率

在總 *Legionella* 方面，Table 17 顯示 57 件雨刷水出水口樣本中，有 1 件樣本 (1.8%) 其總 *L. pneumophila* 及 *Legionella* spp. 皆為陰性，另有 13 件樣本 (22.8%) 無法檢出總 *L. pneumophila* 但其總 *Legionella* spp. 為陽性，另共有 43 件樣本 (75.4%) 其總 *L. pneumophila* 及總 *Legionella* spp. 皆為陽性，故進一步計算此 43 件樣本之總 *L. pneumophila* 濃度占其 *Legionella* spp. 濃度之比率，顯示其平均為 6.5%，範圍則相當大，介於 0.00022 - 91.9 % (Table 19)。

在活性 *Legionella* 方面，Table 18 顯示 57 件雨刷水出水口樣本中，有 3 件樣本 (5.3%) 其活性 *L. pneumophila* 及 *Legionella* spp. 皆為陰性，另有 21 件樣本 (36.8%) 無法檢出活性 *L. pneumophila* 但其活性 *Legionella* spp. 為陽性，另共有 33 件樣本 (57.9%) 其活性 *L. pneumophila* 及總 *Legionella* spp. 皆為陽性，故進一步計算此 33 件樣本之活性 *L. pneumophila* 濃度占其 *Legionella* spp. 濃度之比率，顯示其平均為 7.1%，範圍則相當大，介於 0.00012 - 75.6 % (Table 19)。

由於雨刷水桶與出水口樣本中，有 1 件車輛 (代號 C008) 之雨刷水中總 *Legionella* spp. 濃度極高 (雨刷水桶中為  $1.92 \times 10^8$  cells/mL，雨刷水出水口為  $1.53 \times 10^8$  cells/mL)，分別為其他車輛平均濃度值 (雨刷水桶中為  $3.7 \times 10^5$  cells/mL，雨刷水出水口為  $1.2 \times 10^6$  cells/mL) 的 524 和 133 倍，然該車輛之雨刷刷水中總



*L.pneumophila* 濃度甚低 (雨刷水桶中為  $1.3 \times 10^2$  cells/mL，雨刷水出水口為  $3.4 \times 10^2$  cells/mL)，致使該樣本的 *L. pneumophila* 占 *Legionella* spp. 比率 (雨刷水桶為 0.00007%，雨刷水出水口為 0.00022%) 極低。若去除該樣本重新計算 *L. pneumophila* 占 *Legionella* spp. 比率，其與所有樣本所得差異不大，以總 *Legionella* 為例，去除 C008 樣本後於雨刷水桶及出水口之平均值分別為 13.6% 與 6.7%，與未去除該樣本之平均值 (13.2% 與 6.5%) 甚為接近 (Table 19)。



Table 17 Number of wiper fluid samples with detection of total *L. pneumophila* and *Legionella* spp.

	樣本數 (%)					
	Tank ( N = 52 )			Outlet ( N= 57 )		
	<i>Legionella</i> spp. + <sup>a</sup>	<i>Legionella</i> spp. - <sup>b</sup>	Total	<i>Legionella</i> spp. + <sup>a</sup>	<i>Legionella</i> spp. - <sup>b</sup>	Total
<i>L. pneumophila</i> + <sup>a</sup>	41 ( 78.8 )	0 ( 0.0 )	41 ( 78.8 )	43 ( 75.4 )	0 ( 0.0 )	43 ( 75.4 )
<i>L. pneumophila</i> - <sup>b</sup>	6 ( 11.5 )	5 ( 9.6 )	11 ( 21.2 )	13 ( 22.8 )	1 ( 1.8 )	14 ( 24.6 )
Total	47 ( 90.4 )	5 ( 9.6 )	52 ( 100.0 )	56 ( 98.2 )	1 ( 1.8 )	57 ( 100.0 )

a :”+”陽性樣本

b :”-“陰性樣本

Table 18 Number of wiper fluid samples with detection of viable *L. pneumophila* and *Legionella* spp.

	樣本數 (%)					
	Tank ( N = 52 )			Outlet (N = 57 )		
	<i>Legionella</i> spp. + <sup>a</sup>	<i>Legionella</i> spp. - <sup>b</sup>	Total	<i>Legionella</i> spp. + <sup>a</sup>	<i>Legionella</i> spp. - <sup>b</sup>	Total
<i>L. pneumophila</i> + <sup>a</sup>	31 ( 59.6 )	0 ( 0.0 )	31 ( 59.6 )	33 ( 57.9 )	0 ( 0.0 )	33 ( 57.9 )
<i>L. pneumophila</i> - <sup>b</sup>	15 ( 28.8 )	6 ( 11.5 )	21 ( 40.4 )	21 ( 36.8 )	3 ( 5.3 )	24 ( 42.1 )
Total	46 ( 88.5 )	6 ( 11.5 )	52 ( 100.0 )	54 ( 94.7 )	3 ( 5.3 )	57 ( 100.0 )

a :”+”陽性樣本

b :”-“陰性樣本

### 5.2.3.8 雨刷水桶與其出水口嗜肺性退伍軍人菌占退伍軍人菌屬比率之比較

比較雨刷水桶與雨刷水出水口的 *L. pneumophila* 佔 *Legionella spp.* 比率，Table 19 顯示雨刷水桶和雨刷出水口在總 *Legionella* 比率上達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test,  $P=0.01$ )，其雨刷水桶的總 *Legionella* 比率高於雨刷出水口，另外兩者在活性 *Legionella* 比率上亦達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test,  $P=0.01$ )，其雨刷水桶的總 *Legionella* 比率高於雨刷出水口。



Table 19 Concentration of *L. pneumophila* relating to that of *Legionella* spp. (Lp/Leg,%) in wiper fluid samples collected from tank and outlet

		Lp/Leg, % <sup>a</sup>			
		總細菌		活性細菌	
		Tank	Outlet	Tank	Outlet
所有樣本 <sup>b</sup>	Mean ± SD	13.2 ± 22.5	6.5 ± 16.9	22.6 ± 31.5	7.1 ± 14.4
	Range	0.00007 - 102.7	0.00022 - 91.9	0.00005 - 100	0.00012 - 75.6
	N	41	43	31	33
去除極端值後的 樣本 <sup>c</sup>	Mean ± SD	13.6 ± 22.7	6.7 ± 17.1	23.4 ± 31.8	7.3 ± 14.6
	Range	0.012- 102.7	0.005 - 91.9	0.008 - 100	0.006 - 75.6
	N <sup>c</sup>	40	42	30	32

a:嗜肺性退伍軍人菌占退伍軍人菌屬之濃度比率 (Lp/Leg,%)=(*L. pneumophila* 濃度/*Legionella* spp.濃度)\*100%

b:僅納入 *L. pneumophila* 及 *Legionella* 均為陽性之樣本

c:去掉樣本 C008 之結果 (C008 之兩刷水桶中的總 *Legionella* spp.濃度為  $1.92 \times 10^8$  cells/mL，而活性 *Legionella* spp.濃度為  $1.83 \times 10^8$  cells/mL；兩刷水出水口中的總 *Legionella* spp.濃度為  $1.53 \times 10^8$  cells/mL，而活性 *Legionella* spp.濃度為  $1.52 \times 10^8$  cells/mL)

### 5.3 兩刷水之水質因子

#### 5.3.1 兩刷水桶與其出水口之水質檢出情形

在本研究中，部分兩刷水樣本之自由餘氯因受到水質影響而無法以直讀式儀器分析，主要因當水中含有大量懸浮微粒時，會影響利用分光光度計法測量自由餘氯的讀值準確性，因此當樣本濁度值大於 5 NTU 時，將不採計其自由餘氯的讀值。整體而言，如 Table 20 顯示，兩刷水桶與兩刷水出水口水質分析皆呈現陽性之車輛數，在自由餘氯部分共有 22 輛 (91.8%)，硬度則有 33 輛 (89.2%)，pH 部分有 37 輛 (100%)，而異營性細菌部分則有 34 輛 (89.5%)，至於在濁度、導電度、總溶解固體 (Total dissolved solid,TDS)和溶解性有機碳 (Dissolved organic carbon,DOC)方面則皆有 36 輛 (97.3%、100%、100%、97.3%)。

Table 20 Number of wiper fluid samples with detection of values of water quality indicators

指標	樣本數 (%)			
	Tank (+) <sup>a</sup>	Tank (-) <sup>b</sup>	Total	
餘氯	Oulet (+) <sup>a</sup>	22 (91.8)	1 (4.2)	23 (95.8)
	Oulet (-) <sup>b</sup>	1 (4.2)	0 (0)	1 (4.2)
	Total	23 (95.8)	1 (4.2)	
濁度	Oulet (+) <sup>a</sup>	36 (97.3)	0 (0)	36 (97.3)
	Oulet (-) <sup>b</sup>	1 (2.7)	0 (0)	1 (2.7)
	Total	37 (100)	0 (0)	
硬度	Oulet (+) <sup>a</sup>	33 (89.2)	0 (0)	33 (89.2)
	Oulet (-) <sup>b</sup>	0 (0)	4 (10.2)	4 (10.2)
	Total	33 (89.2)	4 (10.2)	

pH	Oultet (+) <sup>a</sup>	37 (100)	0 (0)	37 (100)
	Oultet (-) <sup>b</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	37 (100)	0 (0)	
導電度	Oultet (+) <sup>a</sup>	36 (100)	0 (0)	36 (100)
	Oultet (-) <sup>b</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	36 (100)	0 (0)	
總溶解固體	Oultet (+) <sup>a</sup>	36 (100)	0 (0)	36 (100)
	Oultet (-) <sup>b</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	36 (100)	0 (0)	
溶解性有機碳	Oultet (+) <sup>a</sup>	36 (97.3)	0 (0)	36 (97.3)
	Oultet (-) <sup>b</sup>	1 (2.7)	0 (0)	1 (2.7)
	Total	37 (100)	0 (0)	
異營性細菌	Oultet (+) <sup>a</sup>	34 (89.5)	3 (7.9)	37 (97.4)
	Oultet (-) <sup>b</sup>	1 (2.6)	0 (0)	1 (2.6)
	Total	35 (92.1)	3 (7.9)	

a:”+”：陽性樣本

b:”-“有採樣且分析結果為陰性之樣本

### 5.3.2 兩刷水桶與其出水口各水質指標陽性樣本之數值分布

分析兩刷水桶水質指標呈陽性樣本之數據，結果如 Table 21 顯示，兩刷水桶 36 件檢出自由餘氯之陽性樣本，其平均自由餘氯為 0.2 mg/L (範圍介於 0.04-2.2 mg/L)；至於兩刷水出水口 31 件陽性樣本的平均自由餘氯為 0.1 mg/L (範圍介於 0.05 - 2.2 mg/L)。兩刷水桶與兩刷水出水口之平均自由餘氯值未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test, P=0.85)。

在濁度方面，雨刷水桶 47 件檢出濁度之陽性樣本，其平均濁度為 23.1 NTU (範圍介於 0.6-671 NTU)；至於雨刷水出水口 46 件陽性樣本的平均濁度為 31.8 NTU (範圍介於 0.6-711 NTU)。雨刷水桶與雨刷水出水口濁度未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test, P=0.13)。

在硬度方面，雨刷水桶 44 件檢出硬度之陽性樣本，其平均硬度為 49.7mg/L (範圍介於 15-135 mg/L)；至於雨刷水出水口 44 件陽性樣本的平均硬度為 56.5mg/L (範圍介於 3-250 mg/L)。雨刷水桶與雨刷水出水口硬度未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test, P=0.29)。

在 pH 值方面，雨刷水桶和雨刷水出水口皆各有 48 件檢出 pH 值之陽性樣本，其平均 pH 值皆為 7.0 mg/L (範圍各介於 3.7-10.2 和 3.6-10)。雨刷水桶與雨刷水出水口 pH 值未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test, P=0.99)。

在導電度的部分，雨刷水桶和雨刷水出水口皆各有 46 件檢出導電度之陽性樣本，雨刷水桶其平均導電度為 383.8 $\mu$ S/cm (範圍介於 2.4-1880  $\mu$ S/cm)；至於雨刷水出水口的平均導電度為 380.5 $\mu$ S/cm (範圍介於 2.6-1882  $\mu$ S/cm)。雨刷水桶與雨刷水出水口導電度值未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test, P=0.99)。

在 TDS 的部分，雨刷水桶和雨刷水出水口皆各有 46 件檢出 TDS 之陽性樣本，雨刷水桶其平均 TDS 為 204.4 mg/L (範圍介於 0.4-1216 mg/L)；至於雨刷水出水口的平均 TDS 為 203.7 mg/L (範圍介於 0.4-1244 mg/L)。雨刷水桶與雨刷水出水口 TDS 值未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test, P=1.00)。

至於 DOC 的部分，雨刷水桶 48 件檢出 DOC 之陽性樣本，其平均 DOC 為 3007.7ppm (範圍介於 0.7-43307 ppm)；至於雨刷水出水口 47 件陽性樣本的平均 DOC 為 3511.6 ppm (範圍介於 88.1-42886 ppm)。雨刷水桶與雨刷水出水口 DOC 值未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test, P=0.67)。

在異營性細菌 (Heterogeneous plate counts,HPC)方面，雨刷水桶 47 件檢出 HPC 之陽性樣本，其平均 HPC 為  $1.4 \times 10^6$ cfu/mL (範圍介於  $5 \times 10^1$ - $2.5 \times 10^7$ )



cfu/mL)；至於雨刷水出水口 44 件陽性樣本的 HPC 為  $1.1 \times 10^7$  cfu/mL (範圍介於  $5 \times 10^1$ - $4.1 \times 10^8$  cfu/mL)。雨刷水桶與雨刷水出水口 HPC 值未達顯著差異 (Wilcoxon signed rank test,  $P=0.54$ )。整體而言，就如 Table 21 (附錄 Figure C-5) 所示，所有水質指標之陽性樣本的讀值在雨刷水桶與雨刷水出水口均未達統計顯著差異。



Table 21 Levels of water quality indicators in wiper fluid samples of tank and outlet<sup>a</sup>

	Tank					Outlet					P value <sup>b</sup>
	N	Median	Mean	SD	Range	N	Median	Mean	SD	Range	
餘氯 (mg/L)	36	0.1	0.2	0.2	0.04-2.2	31	0.1	0.1	0.1	0.05-2.2	0.85
濁度 (NTU)	47	4.2	23.1	96.7	0.6-671	46	5.3	31.8	107.1	0.6-711	0.13
硬度 (mg/L)	44	37.5	49.7	29.9	15-135	44	45.0	56.5	46.6	3-250	0.29
pH	48	7.1	7.0	1.2	3.7-10.2	48	7.1	7.0	1.2	3.6-10	0.99
導電度 (µS/cm)	46	288.0	383.8	381.0	2.4-1880	46	285.5	380.5	351.2	2.6-1882	0.99
總溶解固體 (mg/L)	46	138.2	204.4	241.4	0.4-1216	46	137.1	203.7	232.9	0.4-1244	1.00
溶解性有機碳 (ppm)	48	577.0	3007.7	7348.9	0.7-43307	47	654.1	3511.6	7575.9	88.1-42886	0.67
異營性細菌 (CFU/mL)	47	3.0 x 10 <sup>5</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	3.7 x 10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>1</sup> -2.5 x 10 <sup>7</sup>	44	7.0 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>7</sup>	6.2 x 10 <sup>7</sup>	5 x 10 <sup>1</sup> -4.1 x 10 <sup>8</sup>	0.54

a: 此表僅顯示陽性樣本之結果，而其中自由餘氯、濁度、硬度、DOC 和 HPC 的偵測下限各為 0.015 mg/L, 0.01 NTU, 0.01 mg/L, 0.625 ppm 與 50 cfu/mL

b: 以 Wilcoxon signed rank test 統計方法檢定兩刷水桶 (Tank)和兩刷水出水口 (Outlet)的水質條件是否有差異

### 5.3.4 異營性細菌濃度與其他水質因子之相關性分析

雨刷水中的異營性細菌濃度可能亦與水中其他物化因子有關，故以 Spearman correlation test 進行相關性分析。結果如 Table 22 所示，當水中濁度越高，異營性細菌濃度也越高 ( $r=0.31, p=0.002$ )，顯示硬度和異營性細菌濃度呈顯著正相關；另外，溶解性有機碳越高，異營性細菌濃度越高 ( $r=0.25, p=0.02$ )，顯示溶解性有機碳與異營性細菌呈顯著正相關。

Table 22 Association between HPC concentration and water quality in wiper fluid samples

指標	Spearman correlation test <sup>a</sup>		
	N <sup>b</sup>	r	P value
餘氯 (mg/L)	37	0.18	0.28
濁度 (NTU)	83	0.31	0.002 <sup>**c</sup>
硬度 (mg/L)	91	0.17	0.11
pH	88	-0.19	0.07
導電度 ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	87	0.02	0.86
總溶解固體 (mg/L)	84	0.16	0.14
溶解性有機碳 (ppm)	84	0.25	0.02 <sup>**</sup>

a: 以 Spearman correlation test 進行統計分析 HPC 與其他水質 (Free chlorine、Turbidity、Hardness、pH、Conductivity、TDS 和 DOC) 之相關性檢定，且 HPC 與其他水質均有檢出者始納入分析。

b: HPC 與其他水質均有檢出之樣本數

c:\*\*代表  $p < 0.05$

## 5.4 雨刷水 *Legionella* 污染之單變項分析

### 5.4.1 有無檢出 *Legionella* 之單變項分析

#### 5.4.1.1 水質因子與有無檢出 *Legionella*

為了解雨刷水水質特性對 *Legionella* 檢出與否及其濃度之影響，故將雨刷水桶與其出水口的水質數據與兩採樣點內 *Legionella* 檢測數據全數納入，以探討水質因子與 *Legionella* 之關係。Table 23 顯示以 Simple logistic regression 檢定各水質因子對各類 *Legionella* 檢出與否之統計結果，對雨刷水中可培養性 *Legionella* spp.之檢出而言，硬度的負面效應更為顯著 (OR=0.99,P=0.05)。此外，Table 23 亦顯示，HPC 濃度與可培養性 *Legionella* spp.亦呈顯著正向關係 (OR=1.38,P=0.04)。

Table 23 Effect of water quality on detention of *Legionella* in wiper fluid samples

指標 <sup>c</sup>	Simple logistic regression <sup>a</sup>							
	N <sup>d</sup>		Leg_T	Lp_T	Leg_V	Lp_V	Leg_C	Lp_C
餘氯 (mg/L)	61	OR	4.08	0.30	0.52	0.80	2.97	1.26
		P value	0.92	0.29	0.55	0.61	0.60	0.98
濁度 (NTU)	94	OR	1.02	1.00	1.04	1.00	1.00	1.00
		P value	0.58	0.65	0.38	0.39	0.34	0.43
硬度 (mg/L)	88	OR	1.00	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00
		P value	0.76	0.21	0.07 <sup>*e</sup>	0.08 <sup>*</sup>	0.05 <sup>**</sup>	0.70
pH	96	OR	0.58	1.00	0.68	0.93	0.88	1.16
		P value	0.13 <sup>#</sup>	0.96	0.20	0.69	0.47	0.42
導電度 (μS/cm)	92	OR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		P value	0.94	0.67	0.90	0.21	0.74	0.77
總溶解固體 (mg/L)	92	OR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

		P value	0.31	0.36	0.45	0.76	0.33	0.46
溶解性有機碳	95	OR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
(ppm)		P value	0.98	0.66	0.79	0.49	0.09*	0.14 <sup>#</sup>
異營性細菌 (log	88	OR	1.21	1.07	1.09	0.68	1.38	1.21
CFU/mL)		P value	0.46	0.70	0.70	0.57	0.04**	0.26

a: 以 Simple logistic regression 進行雨刷水桶及出水口兩處樣本之水質數據與退伍軍人菌檢出與否之統計分析 (有檢出者為 1, 未檢出者為 0)。退伍軍人菌種類包括總、活性與可培養性 *Legionella* spp. (Leg\_T、Leg\_V、Leg\_C) 以及 *L. pneumophila* (Lp\_T、Lp\_V、Lp\_C)。

b: OR 為勝算比 (Odds Ratio)

c: 除了 HPC 以對數數值呈現外, 其餘水質數值均為絕對值

d: 水質檢測為陽性者始納入分析樣本數

e: \*\*代表  $P < 0.05$ ; \*代表  $0.05 \leq P < 0.1$ ; #代表  $0.1 \leq p < 0.2$

#### 5.4.1.2 雨刷水操作維護與有無檢出 *Legionella*

針對雨刷水操作維護, 分析影響有無檢出 *Legionella* 的顯著影響因子, 共分析「是否更換/清洗雨刷水桶」、「是否添加雨刷清潔劑」、「添加雨刷清潔劑的種類」、「未添加雨刷清潔劑者其添加自來水的頻率」、「距離上次更換/清洗雨刷水桶的時間」、「距離上次添加雨刷水的時間」、「添加雨刷清潔劑的頻率」、「添加雨刷清潔劑的稀釋比率」8 個因子, 統計結果如 Table 24, 其中「是否更換/清洗雨刷水桶」、「添加雨刷清潔劑的頻率」及「添加的雨刷清潔劑的稀釋比率」為 *Legionella* spp. 檢出的顯著影響因子。

Table 24 Determine the impact factors of wiper fluid maintenance with detection of *Legionella*

影響因子	N	<i>Legionella</i> 有無檢出						
		Leg_T <sup>a</sup>	Lp_T	Leg_V	Lp_V	Leg_C	Lp_C	
是否有添加過雨刷清潔劑	52	OR	-	0.56	<0.001	0.96	0.77	0.55
是/否		P value	-	0.60	0.96	0.95	0.73	0.40
添加雨刷清潔劑的種類	33	OR	-	1.60	<0.001	1.17	0.40	0.80
市售雨刷精/ 家用清潔劑		P value	-	0.69	0.95	0.87	0.25	0.78
未添加雨刷清潔劑者其添加自來水的頻率	10	OR	-	1.32	-	0.62	0.96	1.07
從未/每 1 年以上/每 6 個月~1 年/每 2-6 個月/ 每月/ 每周		P value	-	0.69	-	0.35	0.93	0.87
距離上次更換/清洗雨刷水桶的時間 (day)	5	OR	-	1.00	-	1.00	1.00	1.00
		P value	-	0.72	-	0.72	0.57	0.72
距離上次添加雨刷水的時間 (day)								
1)未加雨刷清潔劑	9	OR	-	1.14	-	1.03	1.04	1.08
		P value	-	0.47	-	0.6	0.63	0.36
2)有加雨刷清潔劑	60	OR	-	0.99	0.99	0.99	1.00	1.00
		P value	-	0.69	0.25	0.42	0.80	0.95

a: “-“代表皆為陽性樣本無法進行統計分析

b:統計方法以 Simple logistic regression 進行相關性分析

Table 24 Determine the impact factors of wiper fluid maintenance with detection of *Legionella* (continue)

Factor	N	Detection of <i>Legionella</i> (P value)						
			Leg_T <sup>a</sup>	Lp_T	Leg_V	Lp_V	Leg_C	Lp_C
是否有更換/清洗過雨刷水桶	52	OR	-	<b>0.22</b>	>999	0.64	2.27	1.71
是/否		P value	-	<b>0.13<sup>#c</sup></b>	0.98	0.64	0.48	0.58
添加的雨刷清潔劑的稀釋比率	30	OR	-	<b>2.57</b>	1.79	<b>1.99</b>	1.14	0.73
無/1:1/1:10/1:50/ 依照產品說明		P value	-	<b>0.09<sup>*</sup></b>	0.54	<b>0.005<sup>**</sup></b>	0.75	0.45
添加雨刷清潔劑的頻率	34	OR	-	<b>0.50</b>	1.75	<b>0.39</b>	0.57	1.39
從未/每 1 年以上/每 6 個月~1 年/每 2-6 個月/ 每月/ 每周		P value	-	<b>0.12<sup>#</sup></b>	0.54	<b>0.03<sup>**</sup></b>	0.84	0.27

a: “-“代表皆為陽性樣本無法進行統計分析

b: \*\*代表  $P < 0.05$  ; \*代表  $0.05 \leq P < 0.1$  : #代表  $0.1 \leq p < 0.2$

c: 統計方法以 Simple logistic regression 進行相關性分析

### (1) 添加的兩刷清潔劑的稀釋比率

在有無檢出的部分，兩刷清潔劑的稀釋比率對雨刷水中總、活性 *L.pneumophila* 有無檢出的相關性並未達統計上顯著差異(Simple logistic regression,  $p=0.12$  和  $0.19$ ,  $OR=2.57$  和  $1.99$ )，Figure 9 為不同兩刷清潔劑稀釋比率下其陽性樣本和陰性樣本的分布，總 *L.pneumophila* 的陽性樣本中，稀釋比率為 1:50 者占 60%，反之，40% 陰性樣本中稀釋比率為 1:10 占最多；在活性 *L.pneumophila* 的分布類似，陽性樣本中稀釋比率為 1:50 者占 66.7%，但在 33% 陰性樣本中以稀釋比率為 1:10 占最多。

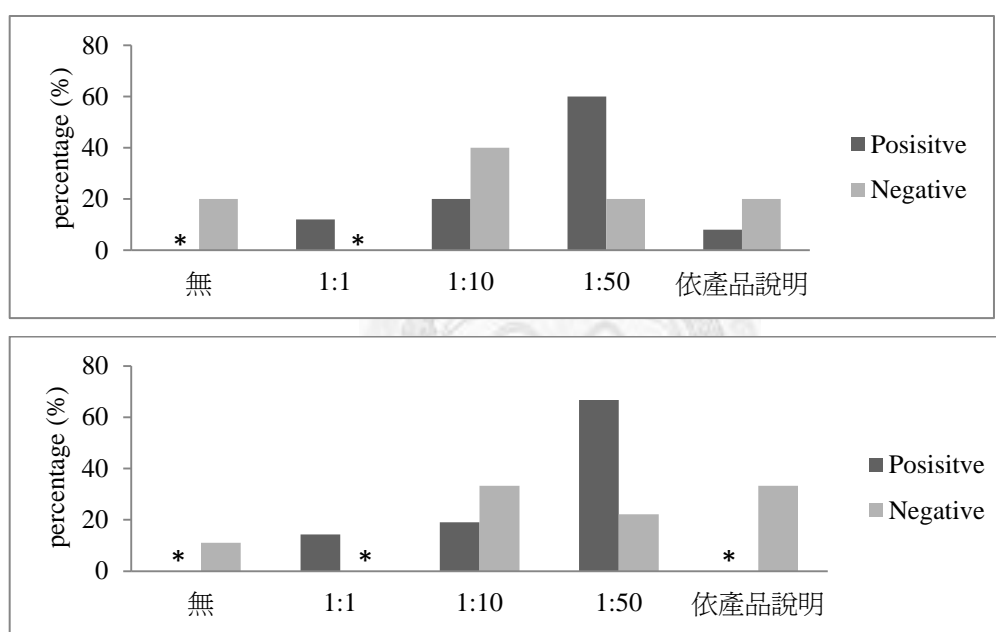


Figure 8 Percentage of total (above) and viable (below) *L.pneumophila* positive and negative samples in different dilution of detergent solution (\*:Non-detected)

### (2) 添加兩刷清潔劑的頻率

在有無檢出的部分，兩刷清潔劑添加頻率對雨刷水中活性 *L.pneumophila* 有無檢出有顯著影響 (Simple logistic regression,  $p=0.03$ ,  $OR=0.39$ )，Figure 9 為不同兩刷清潔劑添加頻率下其活性 *L.pneumophila* 陽性樣本和陰性樣本的分布，對活性 *L.pneumophila*，陽性樣本中添加頻率為半年-1 年占 34.8%，反之，在陰性樣本中以添加頻率為 2-6 個月占 63.6% 最多。



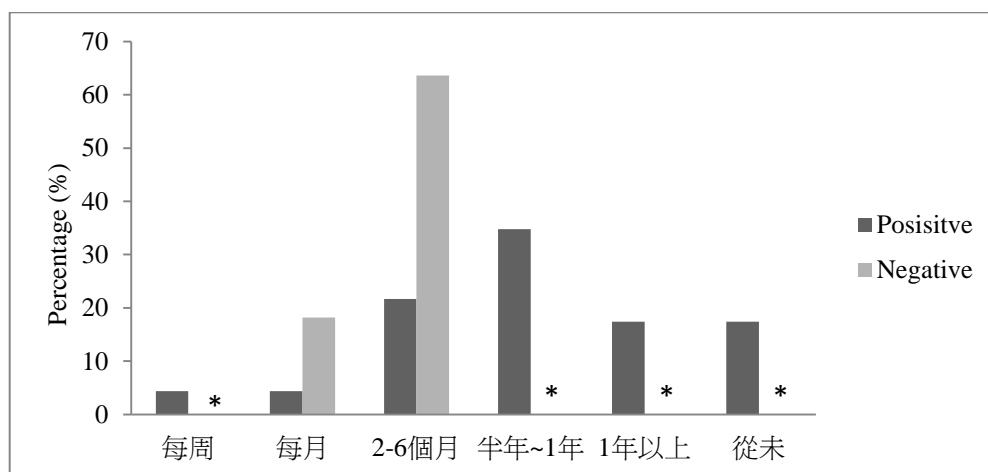


Figure 9 Percentage of viable *L.pneumophila* in different frequency of adding detergent solution (\*:Non-detected)

#### 5.4.1.3 車輛資訊及用車習慣與有無檢出 *Legionella*

針對車輛資訊及用車習慣，分析影響有無檢出 *Legionella* 的顯著影響因子，共分析「車齡」、「車行公里數」、「開車頻率」、「每天平均的開車時間」、「停車位置」5 個因子，統計結果如 Table 25，其中「車行公里數」、「開車頻率」、「停車位置」與總、活性和可培養性之 *Legionella* spp. 和 *L.pneumophila* 皆未達顯著相關。

Table 25 Determine the impact factors of car information with detection of *Legionella*

Factor	Detection of <i>Legionella</i>						
		Leg_T <sup>a</sup>	Lp_T	Leg_V	Lp_V	Leg_C	Lp_C
車行公里數 (km)	N	-	48	48	48	48	48
	OR	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	P value	-	0.48	0.25	0.66	0.96	0.54
開車頻率 1) 周間 2) 周末 3) 每天	N	-	52	52	52	52	52
	OR	-	0.94	<0.001	0.78	0.83	0.89
	P value	-	0.91	0.95	0.57	0.63	0.74
停車位置 1) 地下室 2) 地上室內 3) 有遮蔽物的室外 4) 無遮蔽物的室外	N	-	52	52	52	52	52
	OR	-	1.10	0.005	0.85	0.90	0.98
	P value	-	0.65	0.94	0.50	0.65	0.90
車齡 (year)	N	-	46	-	46	46	46
	OR	-	0.90	-	<b>1.15</b>	1.05	0.97
	P value	-	0.21	-	<b>0.05<sup>**b</sup></b>	0.45	0.57
每天平均開車的時間 1) 1 小時內 2) 1-3 小時 3) 3-6 小時 4) 超過 6 小時	N	-	52	52	52	52	52
	OR	-	<b>7.8</b>	<0.001	<b>2.1</b>	0.81	<b>1.51</b>
	P value	-	<b>0.001<sup>**</sup></b>	0.91	<b>0.02<sup>**</sup></b>	0.45	<b>0.13<sup>#</sup></b>

a: “-“代表皆為陽性樣本無法進行統計分析

b: \*\*代表  $P < 0.05$  ; \*代表  $0.05 \leq P < 0.1$  ; #代表  $0.1 \leq p < 0.2$

c: 統計方法以 Simple logistic regression 進行相關性分析

## (1) 車齡

統計結果顯示車齡會顯著影響雨刷水中活性 *L.pneumophila* 的檢出，且車齡每增加 1 年，雨刷水中活性 *L.pneumophila* 檢出的勝算比為 1.15 (Simple logistic regression,  $p=0.05$ )，在活性 *L.pneumophila* 的部分(Figure 10)，雨刷水為陽性樣本的平均車齡為 10 年高於陰性樣本的平均車齡 6.4 年。

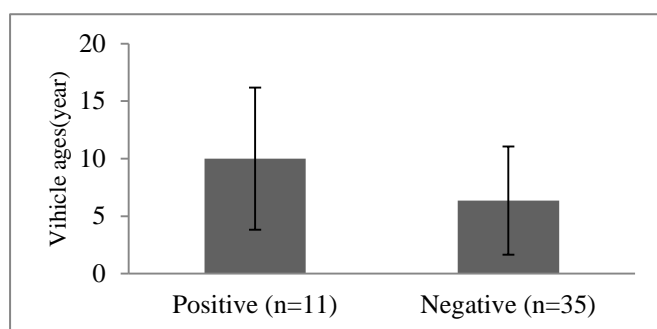


Figure 10 Average vehicle ages of *L.pneumophila* positive and negative samples

## (2) 每天平均開車的時間

統計結果顯示每天平均的開車時間會顯著影響雨刷水中總、活性 *L.pneumophila* 的檢出 (Simple logistic regression,  $P=0.001$  和  $0.02$ ,  $OR=7.8$  和  $2.1$ )，Figure 11 為不同的每天平均開車時間，其陽性樣本和陰性樣本的分布。不論是總還是活性 *L.pneumophila*，陽性樣本中每天平均開車時間 6 小時以上，其雨刷水中總 *L.pneumophila* 檢出陽性者占 47.7% 和 47.2%，反之，在陰性樣本中每天平均開車時間 1-3 小時占 62.5% 和 43.8% 為最多。

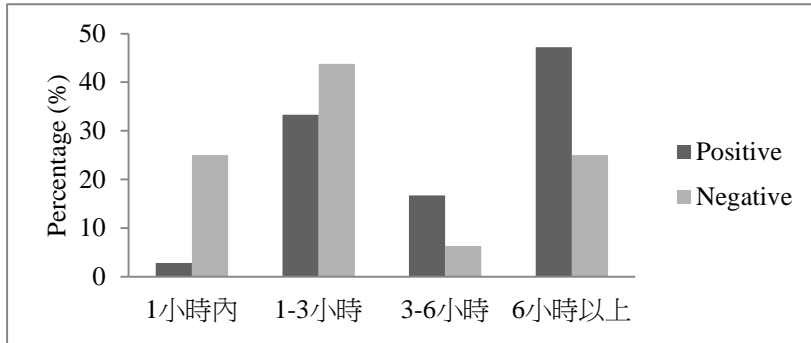
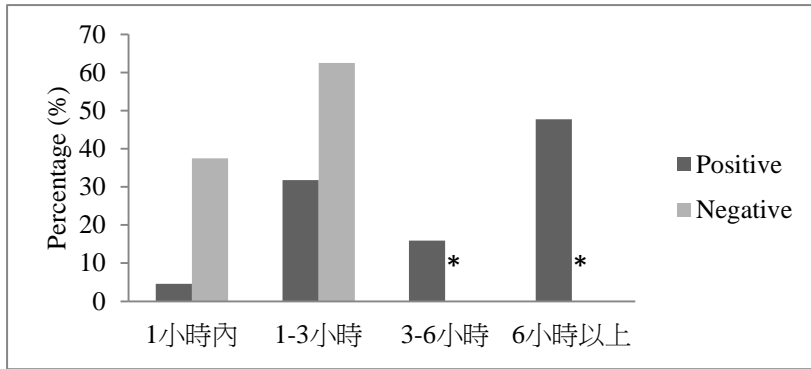
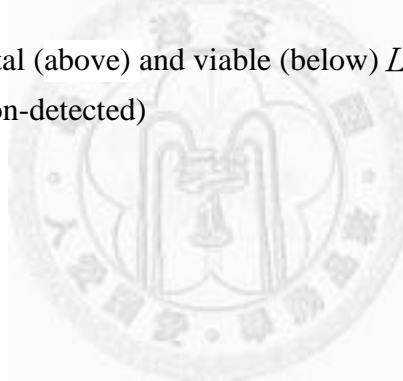


Figure 11 Percentage of total (above) and viable (below) *L.pneumophila* in different average driving time (\*:Non-detected)



## 5.4.2 *Legionella* 濃度之單變項分析

### 5.4.2.1 水質因子與 *Legionella* 濃度

將雨刷水桶與雨刷水出水口之水質數據與其內的 *Legionella* 檢出濃度，以 Spearman correlation test 進行相關性檢定分析，結果如 Table 26 所示。研究發現，雨刷水中硬度與總 *Legionella* spp. 呈顯著負相關 ( $r=-0.26, p=0.02$ )；而在 *L. pneumophila* 濃度方面，DOC 和活性 *L. pneumophila* 濃度達統計上顯著正相關 ( $r=0.39, p=0.002$ )。

Table 26 Effect of water quality on abundance of *Legionella* in wiper fluid samples<sup>a</sup>

Water quality indicator		Spearman correlation test			
		Leg_T	Leg_V	Lp_T	Lp_V
Free chlorine (mg/L)	r <sup>b</sup>	0.13	0.09	0.18	0.10
	N <sup>c</sup>	57	56	46	38
	P value	0.82	0.66	0.35	0.97
Turbidity (NTU)	r	0.08	0.06	0.14	0.17
	N	88	85	77	59
	P value	0.43	0.61	0.23	0.20
Hardness (mg/L)	r	<b>-0.26</b>	<b>-0.17</b>	-0.06	0.06
	N	<b>84</b>	<b>81</b>	73	56
	P value	<b>0.02**d</b>	<b>0.13<sup>#</sup></b>	0.59	0.66
pH	r	-0.06	0.00	<b>-0.16</b>	<b>-0.19</b>
	N	90	87	<b>78</b>	<b>60</b>
	P value	0.54	0.97	<b>0.16<sup>#</sup></b>	<b>0.15<sup>#</sup></b>
Conductivity (μS/cm)	r	-0.01	<b>0.17</b>	0.07	0.07
	N	86	<b>83</b>	74	58

	P value	0.90	<b>0.13<sup>#</sup></b>	0.56	0.59
TDS (ppm)	r	-0.13	0.07	0.08	0.11
	N	86	83	74	58
	P value	0.25	0.55	0.47	0.39
DOC (ppm)	r	-0.06	-0.03	0.10	<b>0.39</b>
	N	89	83	81	<b>62</b>
	P value	0.56	0.76	0.37	<b>0.002<sup>**</sup></b>
HPC (log CFU/mL)	r	0.03	-0.12	<b>0.19</b>	0.11
	N	82	82	<b>71</b>	56
	P value	0.82	0.27	<b>0.11<sup>#</sup></b>	0.42

a: 以 Spearman correlation test 進行雨刷水桶及出水口兩處樣本之水質數據與退伍軍人菌濃度之相關性檢定，水質與退伍軍人菌濃度均有檢出者始納入分析。退伍軍人菌種類包括總與活性 *Legionella* spp. (Leg\_T、Leg\_V) 以及 *L. pneumophila* (Lp\_T、Lp\_V)。

b: r 為相關係數 (Spearman r)

c: 水質與退伍軍人菌濃度均有檢出之樣本數

d: \*\*代表  $P < 0.05$ ；\*代表  $0.05 \leq P < 0.1$ ；#代表  $0.1 \leq p < 0.2$

#### 5.4.2.2 雨刷水操作維護與 *Legionella* 濃度

針對有檢出者進一步分析影響 *Legionella* 濃度之顯著影響因子，共分析「是否更換/清洗雨刷水桶」、「是否添加雨刷清潔劑」、「添加雨刷清潔劑的種類」、「距離上次更換/清洗雨刷水桶的時間」、「距離上次添加雨刷水的時間」、「添加雨刷清潔劑清潔劑的頻率」、「添加雨刷清潔劑的稀釋比率」8 個因子，統計結果如 Table 27，其中只有「未添加與刷清潔劑者其添加自來水的頻率」與總及活性之 *Legionella* spp. 濃度達統計上顯著相關。

Table 27 Determination of the impact factors of wiper fluid maintenance with abundance of *Legionella*

Factor	Statistic method		Concentration of <i>Legionella</i>			
			Leg_T	Lp_T	Leg_V	Lp_V
是否有更換/清洗過雨刷水桶 Yes/No	Wilcoxon rank sum test	N	52	44	51	36
		P value	0.73	0.48	0.99	0.91
是否有添加過雨刷清潔劑 Yes/No	Wilcoxon rank sum test	N	52	44	51	36
		P value	0.63	0.58	1.00	0.90
添加雨刷清潔劑的種類 Commercial screen wash/ Household cleaner	Wilcoxon rank sum test	N	33	28	32	25
		P value	0.45	0.59	0.47	0.93
添加雨刷清潔劑的稀釋比率 No/1:1/1:10/1:50/ follow instructions of product	Kruskal-Wallis test	N	30	25	29	21
		P value	0.73	0.80	0.80	0.44
添加雨刷清潔劑的頻率 Never/ Over 1 year/6 months~1 year/2-6 months/ Every month/ Every week	Kruskal-Wallis test	N	34	28	33	23
		P value	0.28	0.67	0.40	0.29

Table 27 Determination of the impact factors of wiper fluid maintenance with abundance of *Legionella* (continue)

Factor	Statistic method		Concentration of <i>Legionella</i>								
			Leg_T	Lp_T	Leg_V	Lp_V					
距離上次更換/清洗雨刷水桶的時間 (day)	Spearman r correlation	N	10	6	10	6					
		r	-0.5	-0.5	-0.5	-0.5					
		P value	0.39	0.67	0.39	0.67					
距離上次添加雨刷水的時間 (day)	Spearman r correlation	N	18	16	18	12					
							r	-0.09	0.12	0.00	0.14
							P value	0.81	0.78	1.00	0.79
1)未加雨刷清潔劑	Spearman r correlation	N	70	58	68	52					
							r	-0.06	-0.17	-0.03	0.03
							P value	0.72	0.39	0.85	0.88
2)有加雨刷清潔劑	Kruskal-Wallis test	N	10	9	10	7					
							P value	<b>0.17<sup>#a</sup></b>	0.60	<b>0.18<sup>#</sup></b>	0.41
未添加雨刷清潔劑者其添加自來水的頻率											
Never/ Over 1 year/6 months~1 year/2-6 months/ Every											
month/ Every week											

a: #代表  $0.1 \leq p < 0.2$



### (1) 清洗/更換兩刷水桶

Figure 12 (附錄 Table C-1)為比較有無清洗或更換兩刷水桶，對兩刷水中 *Legionella* 濃度是否有影響。在總及活性 *Legionella* spp.部分，未更換/清洗兩刷水桶的濃度 ( $4.1 \times 10^6$ 、 $3.8 \times 10^6$  cells/mL)各高於有更換或清洗兩刷水桶的濃度 ( $3.91 \times 10^6$ 、 $1.3 \times 10^5$  cells/mL)，但未達顯著差異 (Wilcoxon rank sum test,  $p=0.73$  和  $0.48$ )；在 *L.pneumophila* 部分情況相同，亦未達統計上顯著差異 (Wilcoxon rank sum test,  $p=0.99$  和  $0.91$ )。

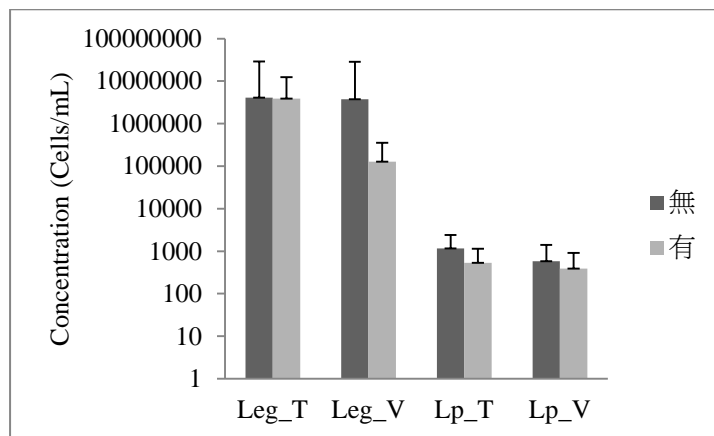


Figure 12 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples of washing tank or not

## (2) 有無添加雨刷清潔劑

Figure 13 (附錄 Table C-2) 為比較有無添加雨刷清潔劑的雨刷水樣本中 *Legionella* 的濃度是否有顯著差異，結果指出在總及活性 *Legionella* spp. 的部分，有添加雨刷清潔劑的平均濃度為  $5.0 \times 10^6$  及  $4.2 \times 10^6$  cells/mL，高於未添加雨刷清潔劑的雨刷水平均濃度  $3.5 \times 10^5$  及  $7.4 \times 10^4$  cells/mL，但在統計上並未達顯著差異 (Wilcoxon rank sum test,  $p=0.63$  和  $0.58$ )；在總 *L. pneumophila* 的部分，有無添加雨刷清潔劑的雨刷水濃度各為  $1.4 \times 10^3$  cells/mL 和  $1.1 \times 10^3$  cells/mL，活性 *L. pneumophila* 在有無添加雨刷清潔劑的雨刷水濃度也是差異不大 (皆為  $5.6 \times 10^2$  cells/mL)。

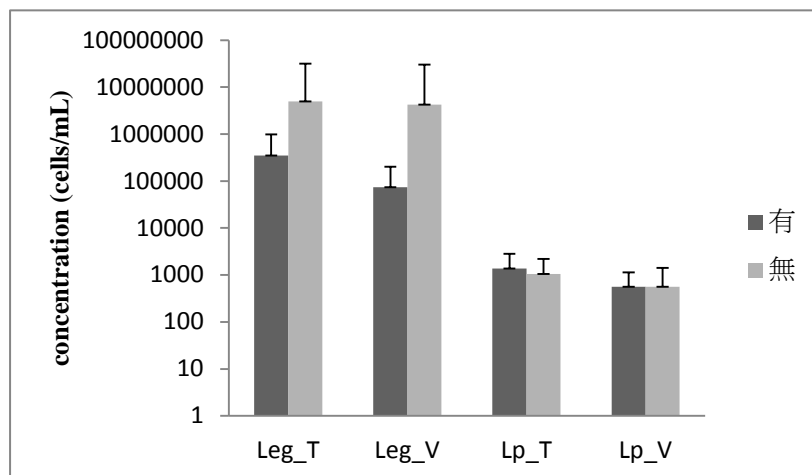


Figure 13 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples of adding detergent solution or not

### (3) 雨刷清潔劑種類

Figure 14 (附錄 Table C-3)為比較添加市售雨刷精或家用清潔劑對 *Legionella* 濃度是否有影響，在總 *Legionella* spp.的部分，添加市售雨刷精的平均濃度為  $1.1 \times 10^6$  cells/mL 高於添加家用清潔劑的平均濃度  $9.0 \times 10^5$  cells/mL，但在統計上未達顯著差異 (Wilcoxon rank sum test,  $p=0.45$ )；在活性 *L. pneumophila* 的部分，添加市售雨刷精的雨刷水濃度 ( $5.2 \times 10^2$  cells/mL)則略低於添加家用清潔劑者 ( $6.2 \times 10^2$  cells/mL)，但同樣未達顯著差異 (Wilcoxon rank sum test,  $p=0.93$ )。

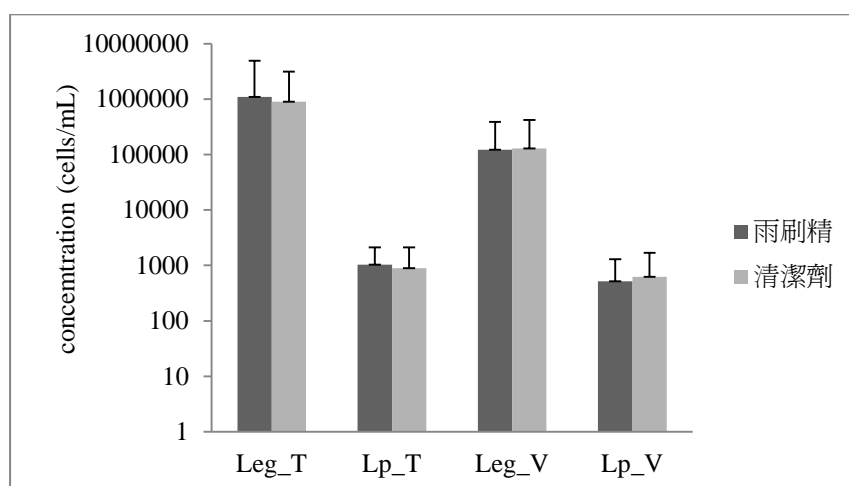


Figure 14 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples of adding commercial screen wash or household cleaner

#### (4) 雨刷清潔劑稀釋比率

Figure 15 (附錄 Table C-4)為添加不同稀釋比率的雨刷清潔劑於雨刷水中，其雨刷水中的 *Legionella* 檢出濃度。1:1、1:10 和 1:50 稀釋雨刷清潔劑的樣本，其總 *Legionella* spp.濃度 ( $6.4 \times 10^6$ 、 $5.1 \times 10^5$ 、 $7.4 \times 10^5$  cells/mL)及活性 *Legionella* spp.濃度 ( $1.3 \times 10^5$ 、 $3.4 \times 10^5$ 、 $1.8 \times 10^5$  cells/mL)，皆各別高於未稀釋的總及活性 *Legionella* spp.濃度 ( $1.3 \times 10^4$ 、 $7.2 \times 10^3$  cells/mL)；在總及活性 *L.pneumophila* 部分，未稀釋的樣本為陰性樣本，而稀釋樣本 (1:1、1:10 和 1:50)的總 *L.pneumophila* 介於  $9.1 \times 10^2$  -  $1.1 \times 10^3$  cells/mL，活性 *L.pneumophila* 則介於  $4.1 \times 10^2$  -  $8.6 \times 10^2$  cells/mL；比較任兩組稀釋比率下的 *Legionella* 濃度，皆無統計上顯著差異 (LSD,  $P > 0.05$ )。

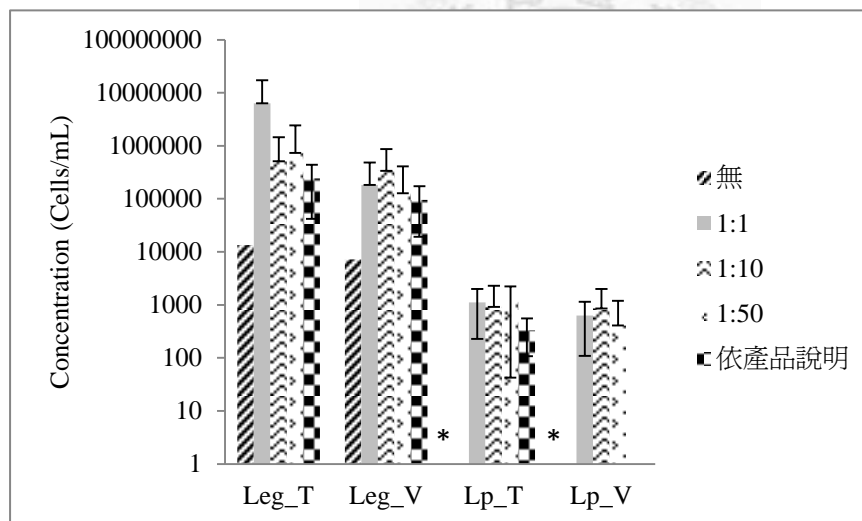


Figure 15 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples in different dilution of detergent solution (\*:Non-detected)

### (5) 兩刷清潔劑添加頻率

Figure 16 (附錄 Table C-5) 為不同的兩刷清潔劑添加頻率下，其兩刷水中的 *Legionella* 檢出濃度。結果顯示添加頻率為每周、每月和每 2-6 個月的樣本，其總 *Legionella* spp. 濃度 ( $1.8 \times 10^6$ 、 $4.9 \times 10^6$ 、 $2.7 \times 10^5$  cells/mL) 及活性 *Legionella* spp. 濃度 ( $6.4 \times 10^4$ 、 $1.5 \times 10^5$ 、 $6.8 \times 10^4$  cells/mL)，皆各別低於添加頻率為每 6 個月-1 年的總及活性 *Legionella* spp. 濃度 ( $1.5 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^7$  cells/mL)，且添加頻率為每 6 個月-1 年添加 1 次者的活性 *Legionella* spp. 濃度顯著高於每周添加 1 次者 (LSD,  $P < 0.05$ )。

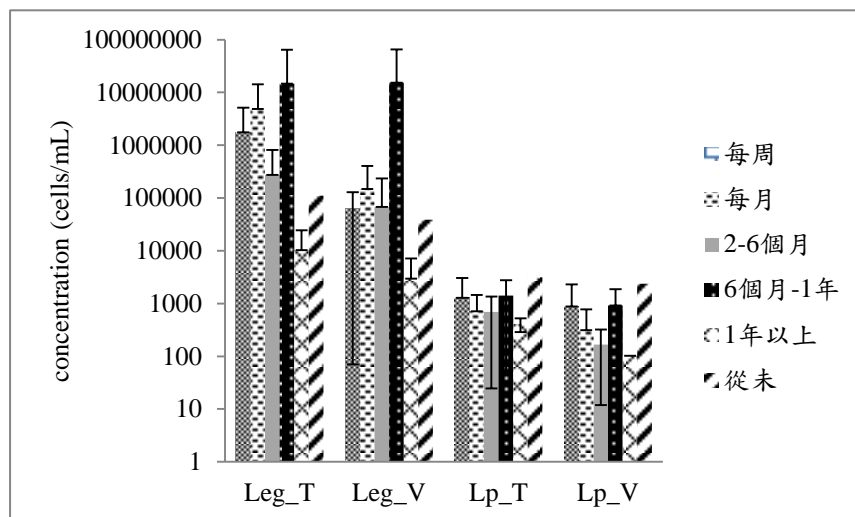


Figure 16 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples in different frequency of adding detergent solution

### (6) 自來水添加頻率

對於不添加雨刷清潔劑者，表示添加的為自來水。Figure 17(附錄 Table C-1) 為自來水添加頻率對 *Legionella* 的影響，發現在總和活性 *Legionella* spp.的檢出濃度上，不同的自來水添加頻率達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.17$  和  $0.18$ )。在總 *Legionella* spp.檢出濃度的部分，添加頻率為 2-6 個月 ( $4.0 \times 10^3$  cells/mL)、每周 ( $3.8 \times 10^4$  cells/mL)和每月 ( $6.5 \times 10^3$  cells/mL)的平均濃度皆略低於從添加頻率為從未 ( $1.3 \times 10^5$  cells/mL)、1 年以上 ( $9.2 \times 10^5$  cells/mL)和半年~1 年 ( $7.1 \times 10^5$  cells/mL)，但比較任兩組添加頻率下的 *Legionella* 濃度，皆無統計上顯著差異 (LSD,  $P>0.05$ )。

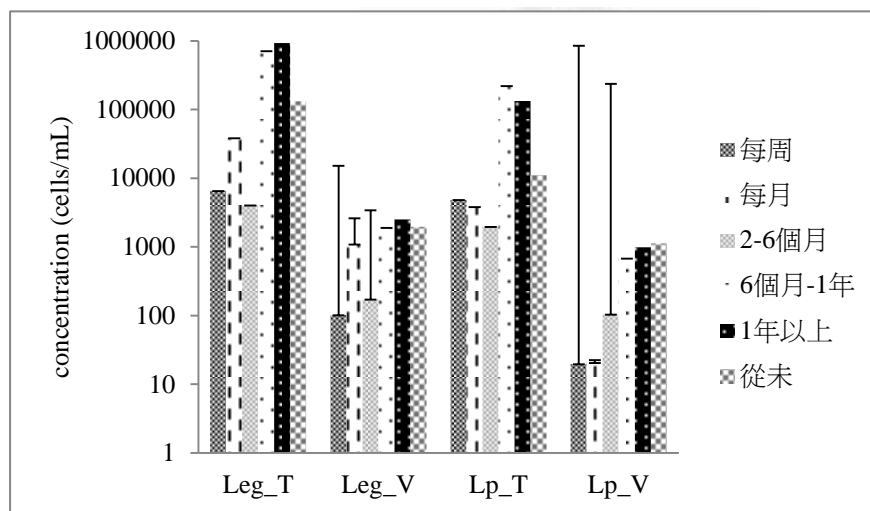


Figure 17 Total and viable *Legionella* spp. concentration in different frequency of adding tap water

### 5.4.2.3 車輛資訊及用車習慣與 *Legionella* 濃度

Table 28 為針對有檢出者進一步分析影響 *Legionella* 濃度之顯著影響因子，共分析「車齡」、「車行公里數」、「開車頻率」、「每天平均開車的時間」、「停車位置」5 個因子，統計結果如 Table 34，其中，「每天平均開車的時間」、「停車位置」與總及活性之 *Legionella* spp. 和 *L.pneumophila* 皆未達顯著相關。

Table 28 中指出，總及活性 *Legionella* spp.和車行公里數呈顯著正相關 ( $r=0.27$ ， $P=0.06$  與  $r=0.31$ ， $P=0.03$ )。



Table 28 Determination the impact factors of vehicle information with abundance of *Legionella*

Factor	Statistic method	Concentration of <i>Legionella</i>				
		Leg_T	Lp_T	Leg_V	Lp_V	
Average driving time per day	Kruskal-Wallis test	N	52	44	51	36
1)within 1hour 2)1-3hours 3)3-6 hours 4)above 6 hours		P value	0.81	0.50	0.51	0.71
Parking lot	Kruskal-Wallis test	N	52	44	51	36
1) basement 2)Round parking (indoor) 3) Round parking (Outdoor)4) Roadside		P value	0.97	0.78	0.99	0.41
Vehicle age (year)	Spearman r correlation	N	92	78	92	70
		r	0.08	0.05	0.31	0.23
		P value	0.59	0.77	0.84	0.19 <sup>#</sup>
Mileage (km)	Spearman r correlation	N	96	84	94	70
		r	0.27	-0.02	0.31	0.05
		P value	0.06 <sup>*a</sup>	0.99	0.03 <sup>**</sup>	0.76
Driving frequency	Kruskal-Wallis test	N	52	44	51	36
1)weekend 2)week day3)everyday		P value	0.18 <sup>#</sup>	0.96	0.54	0.71

a: \*\*代表  $P < 0.05$  ; \*代表  $0.05 \leq P < 0.1$  ; #代表  $0.1 \leq p < 0.5$ .



### (1) 開車頻率

Figure 18 為不同開車頻率下其雨刷水的 *Legionella* 檢出濃度，不同開車頻率中的陽性樣本，其總 *Legionella* spp. 未達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $P=0.18$ )，陽性樣本中，每天開車之雨刷水中總 *Legionella* spp. 的平均濃度 ( $5.3 \times 10^6$  cells/mL) 高於開車頻率為周末 ( $1.2 \times 10^5$  cells/mL) 和周間 ( $2.0 \times 10^4$  cells/mL)。

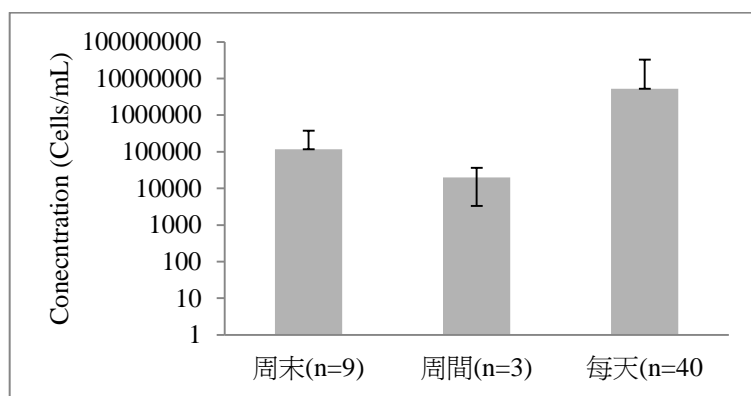
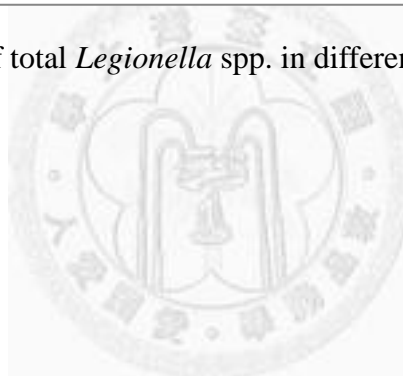


Figure 18 Concentration of total *Legionella* spp. in different driving frequency



## 5.5 兩刷水 *Legionella* 污染之多變項分析

### 5.5.1 有無檢出 *Legionella* 之多變項模式

#### 5.5.1.1 有無檢出模式之自變項因子 (附錄二)

在多變項的分析中，其放入的自變項為在單變項分析有顯著者。水質因子與有無檢出 *Legionella* 之多變項模式中的自變項因子，因子中的濁度以及 TDS 其變異數膨脹係數 (variance inflation factor, VIF) 分別為 16.1 和 13.5 均大於 10，代表兩因子在模式中具有共線性問題，再加上兩因子於單變項中未達顯著影響，因此不納入多變項分析，故不具有共線性問題且為單變項顯著的水質因子為硬度、DOC、pH 值和 HPC。

兩刷水操作維護與有無檢出 *Legionella* 之多變項模式中的自變項因子，依據單變項有達顯著的影響因子中，將其中類別變項分為兩組，在兩刷清潔劑稀釋比率的部分，分為稀釋比率為 1:50 和稀釋比率小於 1:50 兩類；在兩刷清潔劑添加頻率的部分，分為 <每 6 個月以下添加 1 次和  $\geq$  每 6 個月以上添加 1 次，故納入的自變項為有無清洗水桶、兩刷清潔劑稀釋比率、兩刷清潔劑添加頻率。

車輛資訊及用車習慣與有無檢出 *Legionella* 之多變項模式中的自變項因子，在每天平均的開車時間部分，分為 <3 小時和  $\geq$  3 小時兩類，故納入的自變項為車齡、每天平均的開車時間。

#### 5.5.1.2 水質與有無檢出 *Legionella* 之多變項模式

在有無檢出與水質因子的多變項統計模式中，均無因子達統計上顯著相關。

#### 5.5.1.3 兩刷水操作維護與有無檢出 *Legionella* 之多變項模式

Table 29 顯示在有無檢出與影響因子的統計分析中，對於活性 *L.pneumophila* 的有無檢出，兩刷清潔劑添加頻率為顯著影響因子 (Multiple logistic regression with stepwise procedure,  $p=0.01$ )，且添加頻率 <6 個月的檢出活性 *L.pneumophila* 的勝算比為添加頻率  $\geq$  6 個月的 0.45 倍 (OR=0.45, 95% CI=1.6-56.9)。

#### 5.5.1.4 車輛資訊及用車習慣與有無檢出 *Legionella* 之多變項模式

在有無檢出與車輛資訊及用車習慣的統計分析中，均無因子達統計上顯著相關。

Table 29 Risk factors of wiper fluid maintenance for *Legionellae* presence in wiper fluid samples (n=42)<sup>a</sup>

	Total cells <sup>a</sup>		Viable cells		Culturable cells	
	Predictor <sup>b</sup>	OR ,95% CI (p value)	Predictor	OR ,95% CI (p value)	Predictor	OR ,95% CI (p value)
<i>Legionella</i> spp.	x <sup>b</sup>	-	x <sup>b</sup>	-	Not found	-
<i>L.pneumophila</i>	Not found	-	<b>Frequency of adding detergent solution &lt;6 vs. ≥6 months</b>	<b>0.45 ,1.6-56.9 (P=0.01)</b>	Not found	-

a:以 Multiple logistic regression with stepwise procedure 進行統計分析，Y 變項為有無檢出之類別資料且 Tank 和 Outlet 有無檢出擇一，X 變項為有無清洗水桶、雨刷清潔劑稀釋比率、雨刷清潔劑添加頻率，並納入缺失值 (Missing data)

b:總及活性 *Legionella* spp.皆為陽性樣本，無法進行統計分析

## 5.5.2 *Legionella* 濃度與之多變項模式

### 5.5.2.1 檢出濃度模式之自變項因子 (附錄二)

在多變項的分析中，其放入的自變項為在單變項分析有顯著者。水質與檢出濃度 *Legionella* 之多變項模式中的自變項因子，因子中的濁度以及懸浮固體 (TDS) 其變異數膨脹係數 (variance inflation factor, VIF) 分別為 16.1 和 13.5 均大於 10，代表兩因子在模式中具有共線性問題，再加上兩因子於單變項中未達顯著影響，因此不納入多變項分析，故不具有共線性問題且為單變項顯著的水質因子為硬度、導電度、DOC、pH 值和 HPC。

兩刷水操作維護與檢出濃度 *Legionella* 之多變項模式中的自變項因子，由於濃度之單變項結果中，只有未添加兩刷清潔劑者其自來水的添加頻率為顯著因子，但多變項模式主要探討有添加兩刷清潔劑者其對兩刷水中 *Legionella* 污染的影響因子，故選擇有無檢出之單變項結果有顯著的因子，並將類別變項分為兩組，在兩刷清潔劑稀釋比率的部分，分為稀釋比率為 1:50 和稀釋比率小於 1:50 兩類；在兩刷清潔劑添加頻率的部分，分為 <每 6 個月以下添加 1 次和  $\geq$  每 6 個月以上添加 1 次，故納入的自變項為有無清洗水桶、兩刷清潔劑稀釋比率、兩刷清潔劑添加頻率。

車輛資訊及用車習慣與檢出濃度 *Legionella* 之多變項模式中的自變項因子，在每天平均開車時間的部分，分為 <3 小時和  $\geq$  3 小時兩類，故納入的自變項為車齡、車行公里數、每天平均開車時間。

### 5.5.2.2 水質與 *Legionella* 濃度之多變項模式

Table 30 為水質因子的多變項分析，以 Multiple linear regression with stepwise procedure 分析顯示總 *Legionella* spp. 顯著受硬度影響，硬度約低時其總 *Legionella* spp. 濃度越高 ( $\beta=-0.007$ ， $p=0.02$ )；活性 *Legionella* spp. 則顯著受到導電度影響，導電度越高活性 *Legionella* spp. 濃度越高 ( $\beta=0.0009$ ， $p=0.02$ )。在 *L.pneumophila* 的部分，總 *L.pneumophila* 亦受硬度顯著的負向影響 ( $\beta=-0.005$ ， $p=0.02$ )。

### 5.5.2.3 兩刷水操作維護與 *Legionella* 濃度之多變項模式

Table 31 為兩刷水操作維護的多變項分析，以 Multiple linear regression with stepwise procedure 分析顯示總和活性 *Legionella* spp. 皆未有顯著影響因子；而在活性 *L.pneumophila* 部分則受到兩刷清潔劑添加頻率的影響，兩刷清潔劑添加頻率 < 6 個月的活性 *L.pneumophila* 濃度高於兩刷清潔劑添加頻率  $\geq 6$  個月，但未達顯著差異 ( $\beta=-0.59$ ， $p=0.09$ )。

### 5.5.2.4 車輛資訊及用車習慣與 *Legionella* 濃度之多變項模式

Table 32 為車輛資訊及用車習慣的多變項分析，以 Multiple linear regression with stepwise procedure 分析顯示車行公里數為影響因子，與總 *Legionella* spp. 濃度呈顯著正向影響 ( $\beta < 0.0001$ ， $p=0.14$ )，且亦與活性 *Legionella* spp. 濃度為正向相關 ( $\beta < 0.0001$ ， $p=0.13$ )，但皆未達統計上顯著差異。

### 5.5.2.5 水質、兩刷水操作維護、車輛資訊及用車習慣與 *Legionella* 濃度之多變項模式

Table 33 為水質、兩刷水操作維護、車輛資訊及用車習慣與 *Legionella* 濃度的多變項分析，只納入在各別「水質」、「兩刷水操作維護」、「車輛資訊及用車習

慣」多變項模式中有顯著的因子，分別為車行公里數、兩刷清潔劑添加頻率、硬度、導電度，以 GEE (Generalized estimating equation) 分析其結果顯示總及活性 *Legionella* spp. 濃度皆受到硬度的負向影響( $\beta=-0.01, P<0.0001$ ;  $\beta=-0.011, P=0.001$ )。在 *L.pneumophila* 濃度的部分，總及活性 *L.pneumophila* 濃度皆受到硬度、導電度和兩刷清潔劑添加頻率的影響，硬度會負向影響總及活性 *L.pneumophila* 濃度( $\beta=-0.007, P<0.0001$ ;  $\beta=-0.007, P<0.0001$ )，而導電度則是正向影響總及活性 *L.pneumophila* 濃度( $\beta=0.0003, P<0.0001$ ;  $\beta=0.0005, P<0.0001$ )，另外，兩刷清潔劑添加頻率大於每 6 個月者的總 *L.pneumophila* 濃度顯著高於兩刷清潔劑添加頻率小於等於每 6 個月者( $\beta=-0.24, P=0.0013$ )，活性 *L.pneumophila* 濃度受影響的趨勢與總 *L.pneumophila* 濃度結果相同( $\beta=-0.58, P<0.0001$ )。



Table 30 Association between water quality and *Legionella* abundance in wiper fluid samples<sup>a</sup>

	Total cells			Viable cells		
	預測變項	n	β,SE (P 值)	預測變項	n	β,SE (P 值)
<i>Legionella</i> spp.	硬度	82	-0.007,0.003 (0.02)	導電度	80	0.0006,0.0004 (0.10)
<i>L.pneumophila</i>	硬度	72	-0.005,0.002 (0.02)	無	56	-

a: 以 Multiple linear regression with stepwise procedure 進行統計分析，其中總溶解固體 (TDS)和濁度的變異數影響因子 (VIF)值大於 10，在模式中有共線性問題，因此不納入分析；Y 變項為非 0 且轉 log 之連續資料，且 Tank 和 Outlet 濃度全部納入，X 變項為 Tank 和 Outlet 的水質因子，包括硬度、導電度、DOC、pH 值和 HPC

Table 31 Association between wiper fluid maintenance and *Legionella* abundance in wiper fluid samples<sup>a</sup>

	Total cells			Viable cells		
	預測變項	n	β,SE (P 值)	預測變項	n	β,SE (P 值)
<i>Legionella</i> spp.	無	42	-	無	41	-
<i>L.pneumophila</i>	無	35	-	添加兩刷清潔劑的頻率<每 6個月與≥每6個月	29	<b>-0.59,0.33 (0.09)</b>

a: 以 Multiple linear regression with stepwise procedure 進行統計分析，Y 變項為非 0 且轉 log 之連續資料，且 Tank 和 Outlet 濃度取其平均值，X 變項為有無清洗水桶、兩刷清潔劑稀釋比率、兩刷清潔劑添加頻率，並納入缺失值 (Missing data)



Table 32 Association between driving habits and *Legionella* abundance in wiper fluid samples<sup>a</sup>

	Total cells			Viable cells		
	預測變項	n	β,SE (P 值)	預測變項	n	β,SE (P 值)
<i>Legionella</i> spp.	車行公里數	42	<0.0001, <0.0001 (0.05)	車行公里數	41	<0.0001, <0.0001 (0.13)
<i>L.pneumophila</i>	無	35	-	無	29	-

a: 以 Multiple linear regression with stepwise procedure 進行統計分析，Y 變項為非 0 且轉 log 之連續資料，且 Tank 和 Outlet 濃度取其平均值，X 變項為車齡、車行公里數、每周開車頻率，並納入缺失值 (Missing data)

Table 33 Association between risk factors and *Legionella* abundance in wiper fluid samples<sup>a</sup>

	Total cells			Viable cells		
	預測變項	n	β,SE (P 值)	預測變項	n	β,SE (P 值)
<i>Legionella</i> spp.	硬度	99	-0.01,0.001 (<0.0001)	硬度	96	-0.011,0.004(0.001)
<i>L.pneumophila</i>	硬度	83	-0.007,0.0007(<0.0001)	硬度	64	0.0007,0.0003(0.01)
	導電度		0.0003,<0.001(<0.0001)	導電度		0.0005,0.0001(0.0001)
	添加兩刷清潔劑的頻率 <每 6 個月與 ≥ 每 6 個月		-0.24,0.07(0.0013)	添加兩刷清潔劑的頻率 <每 6 個月與 ≥ 每 6 個月		-0.58,0.05(<0.0001)
	月					

a:以 Generalized estimating equation (GEE)進行統計分析，Y 變項為非 0 之連續資料，且 Tank 和 Outlet 濃度全部納入，X 變項為在各個多變項模型有顯著的因子，包括車行公里數、兩刷清潔劑添加頻率、硬度、導電度，並納入缺失值 (Missing data)

## 5.6 職業駕駛與非職業駕駛之車輛資訊、雨刷水操作維護與雨刷水中 *Legionella*

### 5.6.1 職業駕駛與非職業駕駛其雨刷水之退伍軍人菌污染

本研究中的研究對象包括 22 輛計程車及 37 輛民眾自用車，各代表職業駕駛及非職業駕駛，Figure 19 探討其 *Legionella* 的陽性檢出率是否有差異，在活性及可培養性 *Legionella* spp. 方面，民眾自用車的陽性檢出率皆略高於計程車，但未達顯著差異 (Fisher exact test,  $p=0.37$  和  $0.78$ )；但在 *L.pneumophila* 方面，則是計程車的陽性檢出率高於民眾自用車，且在總 *L.pneumophila* 中達顯著差異 (Fisher exact test,  $p=0.004$ )；Figure 20 為檢出濃度方面的比較，計程車輛的總及活性 *Legionella* spp. 平均濃度略高於民眾自用車，但皆未達顯著差異 (Wilcoxon sum rank,  $p=0.13$  和  $0.07$ )，在總及活性 *L.pneumophila* 的趨勢皆相同，皆未達顯著差異 (Wilcoxon sum rank,  $p=0.60$  和  $0.18$ )。

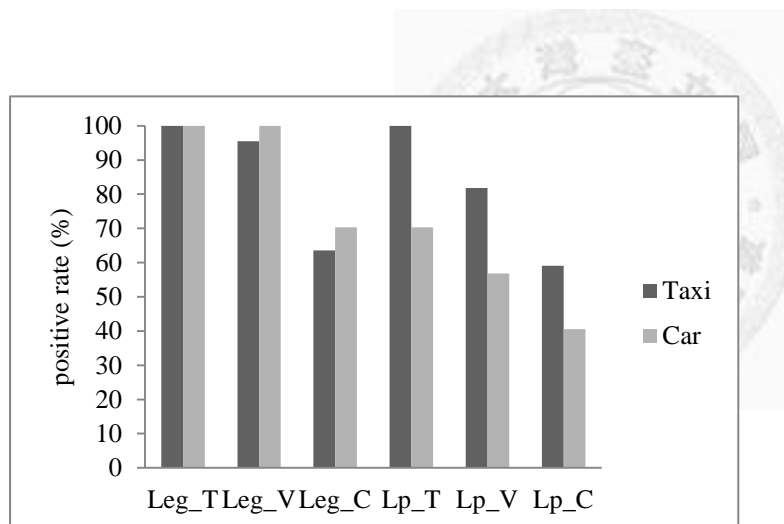


Figure 19 Prevalence of taxi and private car in wiper fluid samples

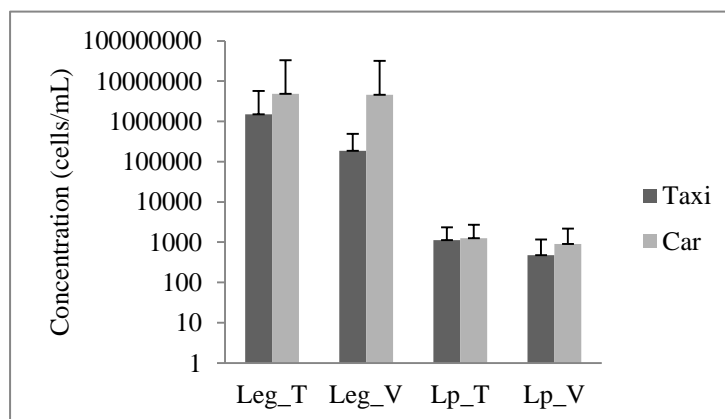


Figure 20 Abundance of taxi and private car in wiper fluid samples

### 5.6.2 職業駕駛與非職業駕駛之車輛資訊及雨刷水操作維護

Table 40 彙整了職業駕駛與非職業駕駛在車輛資訊及雨刷水操作維護上之 14 項特性。在這些特性中，職業駕駛與非職業駕駛達統計上顯著差異之因子共計有車齡 ( $P=0.0006$ )、開車頻率 ( $P<0.0001$ )、每天平均的開車時間 ( $P<0.0001$ )、添加雨刷清潔劑的種類 ( $P=0.004$ )、添加雨刷清潔劑添加的頻率 ( $P=0.001$ )。

其中，在車齡上，自用車輛的平均車齡 (9.6 年)遠大於計程車的平均車齡 (4.2 年)；在開車頻率上，100%的計程車為每天開車，但只有 60%民眾自用車為每天開車，剩下有 30%民眾自用車為周末開車；在每天平均的開車時間上，90.9%的計程車其每天平均的開車時間超過 6 小時，但只有 1%的民眾自用車每天平均開車時間為 6 小時以上，主要 60%的民眾自用車每天平均的開車時間為 1-3 小時，從上述結果顯示，計程車的開車頻率比民眾自用車頻繁且開車時間較長。

在添加雨刷清潔劑的種類上，有 46.7%的計程車添加家用清潔劑，另有 53.3%者添加市售雨刷精，而在民眾自用車的部分，只有 8%添加家用清潔劑，另主要 64%為添加市售雨刷精。在添加雨刷清潔劑的頻率上，有 33.3%的計程車為每月添加 1 次，其次有 25%為每周添加 1 次，另外有 45.5%的民眾自用車為 6 個月到 1 年添加 1 次，其次有 36.4%的民眾自用車為每 2-6 個月添加 1 次，由上述結果顯示，計程車添加雨刷清潔劑的頻率比民眾自用車頻繁。

Table 34 Wiper fluid maintenance characteristics for taxis and private cars

		All vehicles	Taxi	Private Car	P value <sup>a</sup>	Statistic method
車齡 (年)	Mean	7.2	4.2	9.6	<b>0.0006</b>	Wilcoxon sum rank
	SD	5.3	3.3	5.3		
	N	46	20	26		
車行公里數 (km)	Mean	155172.5	194218.5	124803.4	0.06	Wilcoxon sum rank
	SD	113568.9	135886.3	83200.7		
	N	48	21	27		
每周開車頻率	Weekend, N (%)	9 (17.6)	0 (0.0)	9 (30.0)	<b>&lt;0.0001</b>	Fisher exact test
	Week day, N (%)	3 (5.9)	0 (0.0)	3 (10.0)		
	Every day, N (%)	40 (78.4)	22 (100.0)	18 (60.0)		
每天平均開車時間	Within 1 hour, N (%)	5 (9.6)	0 (0.0)	5 (16.7)	<b>&lt;0.0001</b>	Fisher exact test
	1-3 hours, N (%)	19 (36.5)	1 (4.5)	18 (60.0)		
	3-6hours, N (%)	7 (13.5)	1 (4.5)	6 (20.0)		
	Above 6 hours, N (%)	21 (40.4)	20 (90.9)	1 (3.3)		
停車位置	Basement, N (%)	12 (23.1)	3 (13.6)	9 (30.0)	0.11	Fisher exact test
	Ground parking (Indoor), N (%)	9 (17.3)	2 (9.1)	7 (23.3)		
	Ground parking (Outdoor), N (%)	1 (1.9)	1 (4.5)	0 (0.0)		
	Rodeside, N (%)	30 (57.7)	16 (72.7)	14 (46.7)		

a: p 值為比較民眾自用車及計程車在各變項的差異

Table 46 Wiper fluid maintenance characteristics for taxis and private cars (continue)

		所有車輛	計程車	民眾自用車	P value	統計方法
是否更換/清洗過雨刷水桶, N(%)	是	5 (9.6)	1 (4.5)	4 (13.3)	0.29	Fisher exact test
	否	47 (90.4)	21 (95.5)	26 (86.7)		
距離上次更換/清洗雨刷水桶的 時間 (day)	Mean	771.2	20.0	959.0	0.29	Wilcoxon sum rank
	SD	815.9	-	807.7		
	N	5	1	4		
是否有添加過雨刷清潔劑, N(%)	是	42 (80.8)	16 (72.7)	26 (86.7)	0.19	Fisher exact test
	否	10 (19.2)	6 (27.3)	4 (13.3)		
添加雨刷清潔劑的種類, N(%)	市售雨刷精	24 (57.1)	8 (47.1)	16 (64.0)	<b>0.004</b>	Fisher exact test
	家用清潔劑	9 (21.4)	7 (41.2)	2 (8.0)		
	未知	9 (21.4)	2 (11.8)	7 (28.0)		
添加雨刷清潔劑清潔劑的頻率, N(%)	從未	1 (2.4)	0 (0.0)	1 (4)	<b>0.01</b>	Fisher exact test
	每 1 年以上	3 (7.1)	1 (5.9)	2 (8)		
	每 6 個月~1 年	12 (28.6)	2 (11.8)	10 (40)		
	每 2-6 個月	10 (23.8)	2 (11.8)	8 (32)		
	每月	4 (9.5)	4 (23.5)	0 (0)		
	每周	4 (9.5)	3 (17.6)	1 (4)		
未知	8 (19.1)	5 (29.4)	3 (12)			

Table 46 Wiper fluid maintenance characteristics for taxis and private cars (continue)

		All vehicles	Taxi	Private Car	P value	Statistic method
添加雨刷清潔劑的稀釋比率, N(%)	No	1 (2.4)	0 (0)	1 (4)	0.90	Fisher exact test
	1:1	3 (7.1)	1 (5.9)	2 (8)		
	1:10	7 (16.7)	3 (17.6)	4 (16)		
	1:50	16 (38.1)	9 (52.9)	7 (28)		
	依產品說明	3 (7.1)	1 (5.9)	2 (8)		
	未知	12 (28.6)	3 (17.6)	9 (36)		
未添加雨刷清潔劑者其添加自來水的頻率, N(%)	從未	1 (10.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	1.0	Fisher exact test
	每1年以上	2 (20.0)	1 (16.7)	1 (25.0)		
	每6個月~1年	2 (20.0)	1 (16.7)	1 (25.0)		
	每2-6個月	1 (10.0)	0 (0.0)	1 (25.0)		
	每月	3 (30.0)	2 (33.3)	1 (25.0)		
	每周	1 (10.0)	1 (16.7)	0 (0.0)		
	距離上次添加雨刷水的時間 (day)	Mean	85.5	59.2		
	SD	177.1	99.2	212.3		
	N	44	17	27		

## 5.7 自來水之 *Legionella* 與水質因子

### 5.7.1 自來水之 *Legionella*

雨刷水的基質為自來水，在此基質上，車主依其習慣選擇添加或不添加雨刷清潔劑。因此本研究於進行雨刷水採樣的 3 處汽車維修廠及 2 處計程車休息服務站，收集 5 個地點之自來水，以了解自來水中 *Legionella* 及其水質特性，並與雨刷水樣本結果加以比較。Table 35 顯示，自來水中總及活性 *Legionella* spp. 檢出率皆為 100%，且總 *L. pneumophila* 的檢出率亦為 100%，但活性 *L. pneumophila* 則只有 60%。可培養性部分，5 個自來水樣本皆未檢出任何 *Legionella* 的菌落，其檢出率皆為 0%。

Table 35 Positive rate of *Legionella* in tap water samples<sup>a</sup>

Positive rate, % (N) <sup>b</sup>					
<i>Legionella</i> spp.			<i>L. pneumophila</i>		
Total	Viable	Culturable	Total	Viable	Culturable
100	100	0	100	60	0
(5)	(5)	(0)	(5)	(3)	(0)

a: 採樣自 3 處汽車維修廠及 2 處計程車休息服務站

b: N 為陽性檢出之樣本數

進一步分析自來水陽性樣本的 *Legionella* 濃度，Table 36 顯示，總與活性 *Legionella* spp. 平均濃度分別為  $1.9 \times 10^2$  cells/mL 與  $2.0 \times 10^1$  cells/mL；而總與活性 *L. pneumophila* 平均濃度則為  $7.3 \times 10^1$  cells/mL 與  $1.6 \times 10^1$  cells/mL。



Table 36 Concentration of *Legionella* in tap water<sup>a</sup>

	<i>Legionella</i> spp.		<i>L. pneumophila</i>	
	總	活性	總	活性
Mean (cells/mL)	1.9 x 10 <sup>2</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup>	7.3 x 10 <sup>1</sup>	1.6 x 10 <sup>1</sup>
Range (cells/mL)	4.4 x 10 <sup>1</sup> - 5.9 x 10 <sup>2</sup>	1.3 x 10 <sup>0</sup> - 5.7 x 10 <sup>1</sup>	5.0 x 10 <sup>0</sup> - 2.3 x 10 <sup>2</sup>	3.6 x 10 <sup>0</sup> - 2.5 x 10 <sup>1</sup>
N	5	5	5	3

a:此表僅納入退伍軍人菌陽性樣本，其中有 2 件 Viable *L. pneumophila* 為陰性

### 5.7.2 自來水之水質因子

Table 37 顯示，自來水之自由餘氯平均值為 0.25mg/L，範圍在 0.07-0.52 mg/L；濁度平均值為 1.8 NTU，範圍介在 0.8-3.04 NTU；硬度平均值為 25.2 mg/L，範圍在 10.0-37.0 mg/L；pH 平均值為 7.5，範圍介於 7.4-7.6；導電度平均為 87.8  $\mu$ S/cm，範圍介於 80.7-96.6 $\mu$ S/cm；TDS 平均值則為 41.6 mg/L，範圍介於 38.1-45.8 mg/L；而 HPC 平均值為 4.37 x 10<sup>3</sup> CFU/mL，範圍在 1.0 x 10<sup>1</sup> -2.17 x 10<sup>4</sup> CFU/mL；另外 DOC 方面，5 個自來水樣本的 DOC 皆為陰性樣本且低於偵測下限 0.625 ppm。

Table 37 Water quality of tap water samples

	N <sup>a</sup>	Mean	Median	SD	CV	Range
餘氯 (mg/L)	5	0.25	0.15	0.20	76.8	0.07-0.52
濁度 (NTU)	5	1.8	2.0	0.9	50.6	0.8-3.04
硬度 (mg/L)	5	25.2	31.0	11.2	44.6	10.0-37.0
pH	5	7.5	7.5	0.1	0.8	7.4-7.6
導電度 ( $\mu$ S/cm)	5	87.8	86.6	5.8	6.6	80.7-96.6
總溶解固體 (mg/L)	5	41.6	41.0	2.8	6.8	38.1-45.8

溶解性有機碳 (ppm)	0	NA <sup>b</sup>	NA	NA	NA	NA
異營性細菌 (CFU/mL)	5	4.37 x 10 <sup>3</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup>	9.69 x 10 <sup>3</sup>	221.7	1.0 x 10 <sup>1</sup> -2.17 x 10 <sup>4</sup>

a: 此表僅納入陽性樣本

b: NA: not available, 係因所有自來水樣本之溶解性有機碳 (DOC)皆低於偵測下限 (0.625 ppm), 無法計算濃度

## 5.8 自來水與雨刷水之比較

### 5.8.1 比較自來水與雨刷水之 *Legionella*

#### 5.8.1.1 自來水與雨刷水 *Legionella* 陽性檢出率之比較

Figure 21 顯示, 自來水中總及活性的 *Legionella* spp. 檢出率 (100% 與 100%) 皆高於雨刷水桶 (90.4% 與 88.5%) 及出水口處 (98.2% 與 94.7%) 之結果; 在 *L.pneumophila* 部分, 自來水中總及活性的 *L.pneumophila* 之檢出率 (100% 與 60%) 皆高於雨刷水桶 (78.8% 與 59.6%) 及出水口處 (75.4% 與 57.9%) 之結果; 但雨刷水桶和雨刷水出水口中可培養性 *Legionella* spp. (44.2% 與 56.1%) 與 *L.pneumophila* 的陽性檢出率 (32.7% 與 28.1%) 則高於自來水 (0% 與 0%)。

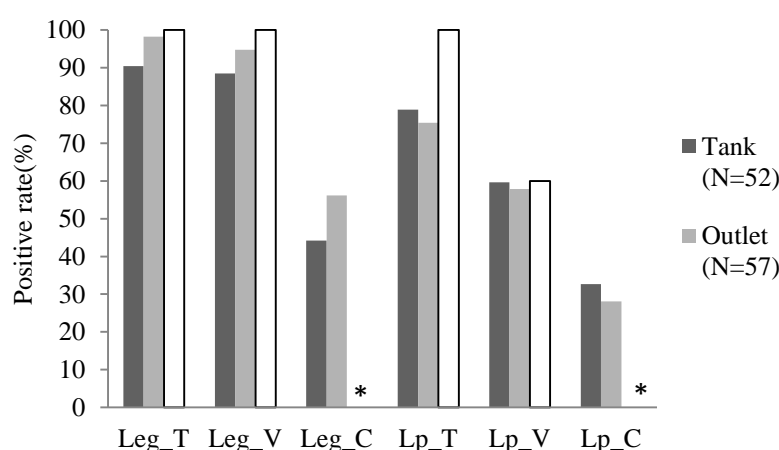


Figure 21 Comparison of positive rate of *Legionella* between wiper fluid and tap water samples (\*: Non-detected, detection limit for *Legionella* spp. and *L.pneumophila*: 4.60 cells/mL and 3.03 cells/mL)

### 5.8.1.2 比較自來水與雨刷水的 *Legionella* 檢出濃度

Figure 22 顯示(附錄 Table C-7), 雨刷水桶和雨刷水出水口總中 *Legionella* spp. 平均濃度各為  $4.4 \times 10^6$  和  $3.9 \times 10^6$  cells/mL, 而自來水之平均濃度則為  $1.9 \times 10^2$  cells/mL; 在總 *L.pneumophila* 的部分, 雨刷水桶和雨刷水出水口之平均濃度皆為  $1.3 \times 10^3$  cells/mL, 自來水平均濃度則只有  $7.3 \times 10^1$  cells/mL; 而活性 *Legionella* 部分, 雨刷水桶和雨刷水出水口中活性 *Legionella* spp. 平均濃度各為  $4.0 \times 10^6$  和  $3.0 \times 10^6$  cells/mL, 而自來水之平均濃度則為  $2.00 \times 10^1$  cells/mL; 在活性 *L.pneumophila* 的部分, 雨刷水桶和雨刷水出水口之平均濃度各為  $7.9 \times 10^2$  和  $5.3 \times 10^2$  cells/mL, 自來水平均濃度則只有  $1.6 \times 10^1$  cells/mL。

統計檢定結果則顯示, 總 *Legionella* spp. 與 *L.pneumophila* 濃度, 自來水、雨刷水桶以及雨刷水出水口三者樣本達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.0004$ 、 $0.0009$ ), 活性 *Legionella* spp. 與 *L.pneumophila* 濃度, 自來水、雨刷水桶以及雨刷水出水口三者樣本亦達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.0007$ 、 $0.03$ ), 且雨刷水桶和雨刷水出水口樣本中總與活性 *Legionella* spp. 和 *L.pneumophila* 之濃度皆高於自來水樣本 (Scheffe test,  $p<0.05$ )。

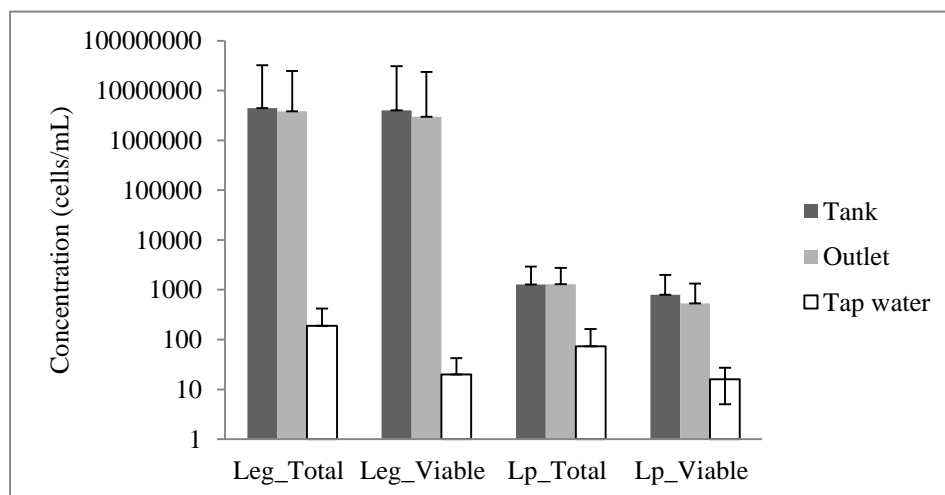


Figure 22 Comparison of concentration of *Legionella* between wiper fluid and tap water samples

### 5.8.1.3 比較自來水與雨刷水的 *Legionella* 活性率

Table 38 顯示，自來水中 *Legionella* spp.之活性率平均為 14.8%，低於雨刷水桶及雨刷水出水口的平均活性率 (37%與 37.3%)，但三者未達統計上顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.29$ )。在 *L.pneumophila* 方面，自來水的 *L.pneumophila* 活性率平均為 37.5%，同樣低於雨刷水桶及雨刷水出水口的平均活性率 (44.9%和 46.3%)，且亦未達統計顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.83$ )。

Table 38 Comparisons of viability of *Legionella* in wiper fluid and tap water

	Viability, % <sup>a</sup>					
	<i>Legionella</i> spp.			<i>L. pneumophila</i>		
	Tank	Outlet	Tap water	Tank	Outlet	Tap water
Mean ± SD	37.0 ± 30.4	37.3 ± 30.4	14.8 ± 13.9	44.9 ± 29.4	46.3 ± 26.2	37.5 ± 30.9
Range	0.2 - 95.2	0.01 - 99.2	10.8-71.3	4.7 - 106.9	2.1 - 86.9	2.4-31.8
N <sup>b</sup>	46	54	5	31	33	3

a: 活性率 (Viability) = (活性 *Legionella* 濃度 / 總 *Legionella* 濃度) \* 100%

b: 只計算總及活性均為陽性的樣本

### 5.8.1.4 比較各採樣地點之自來水與雨刷水中 *Legionella* 濃度

Figure 23 顯示 A、B、C 三處汽車維修廠以及 D、E 兩處計程車休息服務站收集之雨刷水桶、雨刷水出水口以及自來水樣本中的 *Legionella* 濃度。以地點別來看，總及活性 *Legionella* spp. 濃度並無明顯的地點別差異，同樣在總及活性 *L.pneumophila* 上亦無地點別之差異，顯示 *Legionella* 濃度不受地點別的影響。而各地點下所採集之雨刷水和自來水的 *Legionella* 濃度並未呈現一致性的趨勢，顯示自來水中的 *Legionella* 濃度與雨刷水濃度並無相關性。

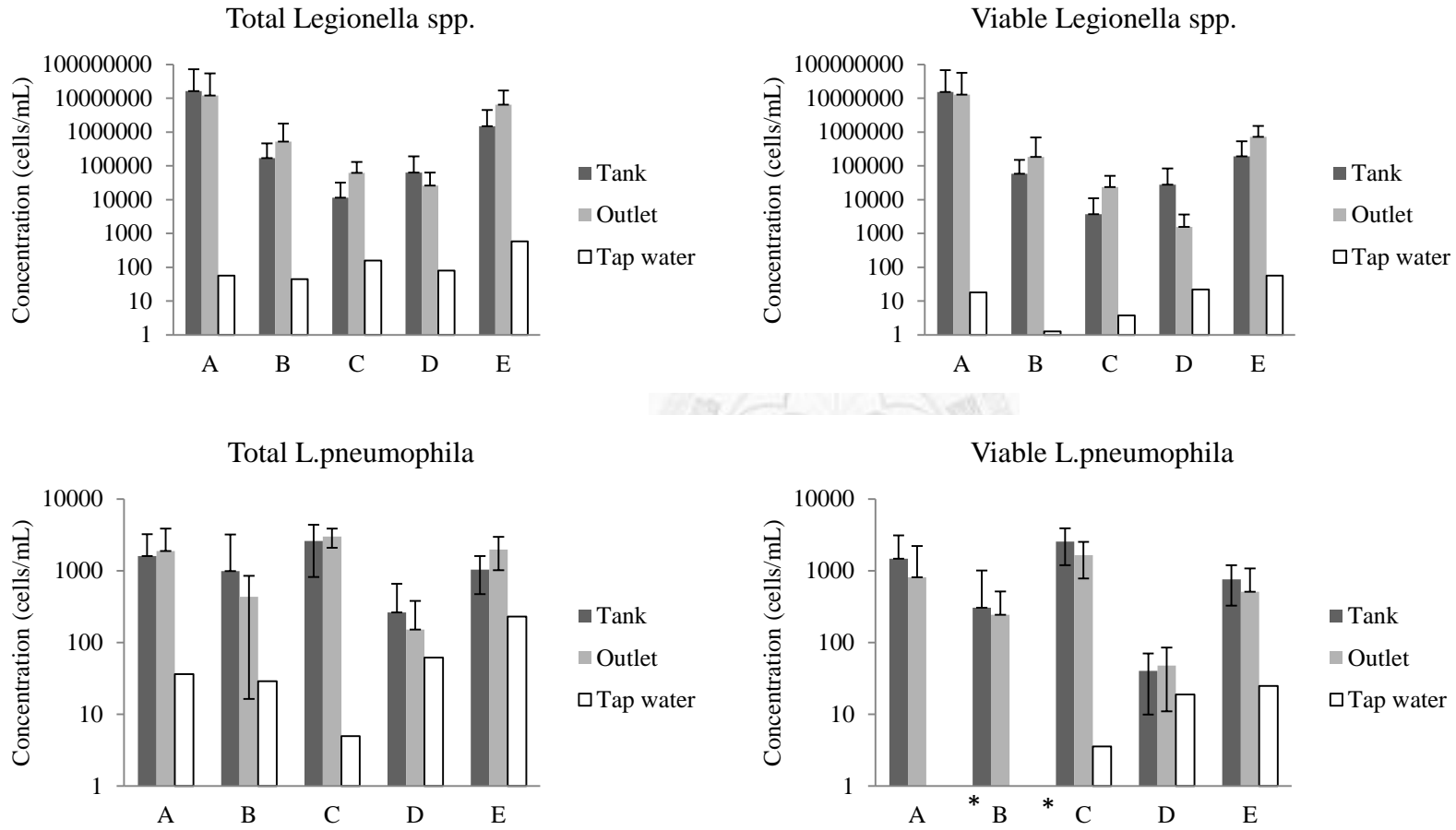


Figure 23 Comparison of *Legionella* concentration between wiper fluid and tap water samples collected from five different locations

(A-C: Automobile maintenance shops; D-E: Taxi rest stops ; \*: Non-detected)

## 5.8.2 比較自來水與雨刷水之水質

Figure 24 (附錄 Table C-8)為比較自來水及雨刷水的水質特性，結果顯示在自由餘氯的部分，在自來水平均餘氯為 0.3mg/L 略高於雨刷水桶和雨刷水出水口的餘氯值 (0.2mg/L 和 0.1mg/L)，但未達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.26$ )。硬度部分，自來水的平均為 25.2mg/L 略低於雨刷水桶和雨刷水出水口 (49.7 mg/L 和 56.5 mg/L)，亦未達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.2$ )。而 pH 值在自來水和雨刷水樣本中 (Tank and Outlet)皆是 7.0，且未達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.54$ )；整體來說，雨刷水和自來水的自由餘氯、硬度和 pH 值並無統計上顯著差異。

結果顯示濁度方面，自來水的平均值為 1.8 NTU，低於雨刷水桶和雨刷水出水口的值 (分別為 23.1 和 31.8 NTU)，三者達統計上顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.02$ )；導電度在自來水的平均值為 87.8 $\mu$ S/cm，低於雨刷水桶和雨刷水出水口的值 (分別為 383.8 和 380.5 $\mu$ S/cm)，三者的導電度達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.01$ )；在 TDS 的部分，自來水平均為 41.6 mg/L，低於雨刷水桶和雨刷水出水口的值 (分別為 204.4 和 203.7 mg/L)，三者間的 TDS 達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.01$ )。在 DOC 的部分，自來水皆為陰性樣本，低於偵測下限 0.625 ppm，而雨刷水桶和雨刷水出水口的 DOC 分別為 3007.7 和 3511.6 ppm，三者的 DOC 達顯著差異 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.01$ )。在 HPC 方面，自來水的平均濃度為  $4.4 \times 10^3$  cfu/mL，顯著低於雨刷水桶和雨刷水出水口的平均濃度 (Scheffe test,  $P < 0.05$ )，分別為  $1.1 \times 10^7$  和  $1.4 \times 10^6$  cfu/mL；整體來說，在濁度、導電度、TDS、DOC 和 HPC 方面，雨刷水的測值皆高於自來水，且統計上顯著差異。

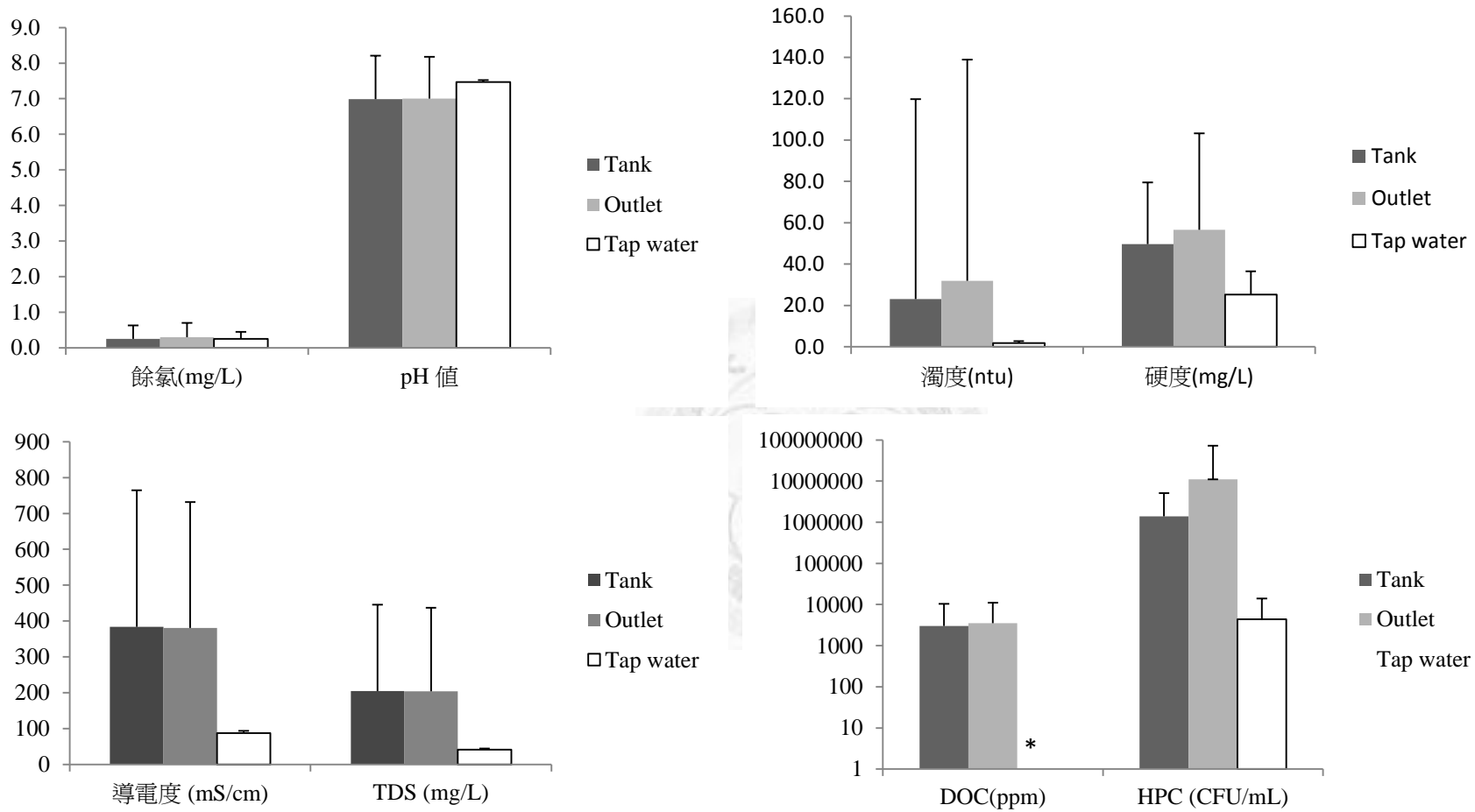


Figure 24 Comparison of the water quality between tap water and wiper fluid samples (\*:Non-detected)

Table 39 為納入雨刷水樣本 (Tank and outlet)和自來水樣本的水質條件與 *Legionella* 檢出與否的相關性分析，統計結果顯示，對可培養性 *Legionella* spp.，HPC 會正向影響可培養性 *Legionella* spp.的檢出 (OR=1.38,P=0.04)，此外，增加水中硬度不利於雨刷水中活性及可培養性 *Legionella* spp.的檢出 (OR=0.99,P=0.05)。

Table 39 Dermination of the relationship between water quality and detection of *Legionella* in wiper fluid and tap water samples

	n	Simple logistic regression <sup>a</sup>						
			Leg_T	Lp_T	Leg_V	Lp_V	Leg_C	Lp_C
餘氯 (mg/L)	66	OR	1.91	0.74	4.66	1.94	0.99	0.88
		P value	0.92	0.92	0.55	0.61	0.60	0.98
濁度 (NTU)	99	OR	1.02	1.00	1.00	1.00	0.99	0.99
		P value	0.61	0.68	0.41	0.39	0.34	0.43
硬度 (mg/L)	93	OR <sup>c</sup>	0.99	1.01	0.99	1.01	<b>0.99**<sup>c</sup></b>	0.99
		P value	0.70	0.27	0.06	0.09	<b>0.05</b>	0.70
pH	101	OR	0.58	1.03	0.68	0.93	0.88	1.16
		P value	0.14	0.88	0.21	0.70	0.47	0.42
導電度 (µS/cm)	97	OR	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00
		P value	0.98	0.54	0.80	0.23	0.74	0.77
總溶解固體 (mg/L)	97	OR	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	0.99
		P value	0.36	0.45	0.51	0.75	0.33	0.46
溶解性有機碳 (ppm)	100	OR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00
		P value	0.94	0.59	0.84	0.48	0.09	0.14
異營性細菌 (log CFU/mL)	93	OR	1.10	0.98	1.00	0.90	<b>1.38**</b>	1.21
		P value	0.69	0.90	1.00	0.46	<b>0.04</b>	0.26

a:以 Simple logistic regression 進行統計分析，水質與檢出結果均為陽性樣本者才納入相關性分析,且資料納入自來水和雨刷水樣本(Tank 與 Outlet)

c:\*\*代表 p<0.05

Table 40 為納入雨刷水樣本 (Tank and outlet)和自來水樣本的水質條件與 *Legionella* 檢出濃度的相關性分析，統計結果顯示，導電度與活性 *Legionella* spp.濃度呈顯著正相關 (r=0.28,P=0.01)；另外，在 *L.pneumophila* 的部分，濁度、TDS、DOC 和 HPC 濃度皆與總 *L.pneumophila* 濃度呈顯著正相關 (r=0.24,P=0.03、r=0.23,P=0.04、



r=0.25,P=0.02 和 r=0.32,P=0.005) , 且 DOC 與活性 *L.pneumophila* 濃度呈顯著正相關 (r=0.46,P=0.0001) 。

Table 40 Dermination of the relationship between water quality and concentration of *Legionella* in wiper fluid and tap water samples

		Spearman correlation test <sup>a</sup>			
		Leg_Total	Lp_Total	Leg_Viable	Lp_Viable
餘氯 (mg/L)	r	-0.03	0.06	0.03	0.20
	n <sup>b</sup>	62	61	51	41
	P value	0.82	0.35	0.66	0.97
濁度 (NTU)	r	0.18	<b>0.24</b>	0.16	0.25
	n	93	<b>82</b>	90	62
	P value	0.09	<b>0.03<sup>**c</sup></b>	0.12	0.49
硬度 (mg/L)	r	-0.17	0.04	-0.08	0.14
	n	89	78	86	59
	P value	0.12	0.72	0.46	0.29
pH	r	-0.11	-0.19	-0.04	-0.21
	n	95	83	92	63
	P value	0.3	0.09	0.69	0.09
導電度 (μS/cm)	r	0.12	0.20	<b>0.28</b>	0.16
	n	91	79	<b>88</b>	61
	P value	0.26	0.07	<b>0.01<sup>**</sup></b>	0.23
總溶解固體 (mg/L)	r	0.02	<b>0.23</b>	0.19	0.20
	n	91	<b>79</b>	88	61
	P value	0.82	<b>0.04<sup>**</sup></b>	0.08	0.12
溶解性有機碳 (ppm)	r	0.09	<b>0.25</b>	0.13	<b>0.46</b>
	n	94	<b>86</b>	88	<b>65</b>
	P value	0.37	<b>0.02<sup>**</sup></b>	0.24	<b>0.0001<sup>**</sup></b>
異營性細菌 (CFU/mL)	r	0.16	<b>0.32</b>	0.03	0.23
	n	87	<b>76</b>	87	59
	P value	0.15	<b>0.005<sup>**</sup></b>	0.77	0.08

a: 以 Spearman correlation test 進行統計分析，水質與濃度結果均為陽性樣本者才納入相關性分析，且 Y 變項資料納入自來水和雨刷水(Tank 與 Outlet)

c:<sup>\*\*</sup>代表 p<0.05；\*代表 p<0.1；#代表 p<0.2

## 第六章 討論

過去研究指出以培養法在初步的環境調查中，16 輛有添加雨刷精的雨刷水中無任何樣本(0%)檢測出 *Legionella*，而 5 輛未添加雨刷精的雨刷水中有 1 輛(20%)為陽性樣本(Wallesten et al.,2010)；另外一篇初探性研究也在環境採樣中發現，以培養法分析 24 輛有添加雨刷精者皆未檢出 *Legionella* (0%)，而 6 輛未添加雨刷精則有 1 輛(16.7%)雨刷水樣本為 *Legionella* 陽性(Palmer et al.,2012)。上述兩篇環境調查結果的樣本數不多，且以培養法進行分析 *Legionella* 是否檢出，且研究設計上只有簡單區分有無添加雨刷精兩種，單純探討雨刷精對雨刷水中 *Legionella* 的檢出是否影響，但其實雨刷水中的 *Legionella* 受到的影響因素應該是眾多且複雜的。

為了更進一步探討雨刷水的污染情況及所受影響因子之相關性，本研究針對以即時定量聚合酶反應搭配核酸染劑定量雨刷水中的總及活性 *Legionella*，是目前的第一篇以此方法進行雨刷水分析的研究，且樣本數也較過去兩篇多，增加樣本數外，針對影響因子部分，除了過去兩篇針對有無添加雨刷精的因子外，本研究亦搭配問卷評估車主的車體資訊和雨刷水操作維護，也是第一篇進行雨刷水影響相關因子探討的研究。

本篇研究結果與過去兩篇環境調查結果顯著不同，在本研究中，10 輛未添加雨刷清潔劑者的雨刷水樣本，分別有 7 輛(70%)及 6 輛(60%)的雨刷水檢出可培養性 *Legionella spp.*及 *L.pneumophila*，至於 42 輛有添加雨刷清潔劑者中，則分別有 27 輛(64.3%)及 19 輛(45.2%)的雨刷水檢出可培養性 *Legionella spp.*及 *L.pneumophila*。未添加雨刷清潔劑之雨刷水，在本研究中其可培養 *Legionella spp.*及 *L.pneumophila* 之陽性檢出率(70%,60%)皆高於過去兩篇研究結果(20%,Wallesten et al.,2010 與 16.7%, Palmer et al.,2012)。而在未添加雨刷清潔劑之

雨刷水在不同菌種的陽性檢出率皆高於有添加雨刷清潔劑的雨刷水，總 *L.pneumophila* 分別為 90% 和 83.3%，活性 *Legionella* spp. 分別為 100% 大於 97.6%，且在可培養性也有相同的趨勢，顯示雨刷清潔劑的添加會稍微降低雨刷水中 *Legionella* 的檢出，但過去研究則是發現有添加雨刷精即未檢出，其研究結果與過去文獻甚不相同。

本研究結果顯示添加雨刷清潔劑並未顯著影響於雨刷水中 *Legionella*，從多變項模式的分析結果發現，而在有添加雨刷清潔劑的雨刷水 *Legionella* 檢出濃度受到雨刷清潔劑添加頻率影響，且對雨刷水中活性 *L.pneumophila* 有無檢出有顯著影響 (Simple logistic regression,  $p=0.03$ )，在有無檢出部分，顯示添加頻率高於 6 個月者，活性 *L.pneumophila* 檢出為陰性的機率較大。另外在單變項分析也指出雨刷清潔劑的稀釋比率對雨刷水中總、活性 *L.pneumophila* 有無檢出有顯著影響 (Simple logistic regression,  $p=0.09$  和  $0.005$ )，有 1 個雨刷精未稀釋的樣本，其總、活性 *L.pneumophila* 皆為陰性，而且在陽性樣本中，稀釋比率為 1:50 者占 50%，1:10 和 1:1 者則各占了 20% 及 12%，顯示雨刷清潔劑稀釋比率越高，其檢出為 *L.pneumophila* 陽性的機率越高，且未稀釋時，就可能會產生陰性的結果。

總 *Legionella* spp. 和 *L.pneumophila* 濃度多寡反應亞熱帶的暴露風險，而活性 *Legionella* spp. 和 *L.pneumophila* 則是反應是退伍軍人病的暴露風險；本研究所測得添加雨刷清潔劑之雨刷水中的總 *Legionella* spp. 平均濃度約在  $5.0 \times 10^3$  cells/L，於管線末端供水處所採集的自來水樣本，測得平均濃度為  $1.9 \times 10^1$  cells/L，其有添加雨刷清潔劑之雨刷水濃度比自來水高出許多倍，而總 *Legionella* spp. 在冷卻水塔及熱水系統的水體濃度可飆高至  $2.7 \times 10^6$  和  $3.3 \times 10^5$  cells/L (Chang et al., 2010)，另外，本研究中未添加雨刷清潔劑的雨刷水樣本，其測得總 *Legionella* spp. 平均為  $1.1 \times 10^0$  cells/L；低於本研究之自來水濃度與熱水系統

(Change et al. 2010)的總 *L.pneumophila* 各為  $7.3 \times 10^1$  和  $3.9 \times 10^1$  cells/L，其未添加雨刷清潔劑之雨刷水中的活性 *Legionella* spp. ( $4.2 \times 10^3$  cells/L)亦低於冷卻水塔和熱水系統的水體( $1.8 \times 10^6$  和  $1.7 \times 10^5$  cells/L) (Change et al.,2010)；整體來說，有無添加雨刷清潔劑之雨刷水中 *Legionella* 檢出濃度雖然顯著高於自來水，但與曝氣池或冷卻水塔等高污染水源相比，其雨刷水濃度又顯著較低很多。

過去文獻指出職業駕駛的得病風險較高，於流行病學的研究調查中發現職業駕駛的退伍軍人病得病風險為非職業駕駛的 3 倍(Boer et al.,2006)，但在本研究的結果顯示職業駕駛者其車輛雨刷水中總及活性 *Legionella* spp.濃度( $1.5 \times 10^6$  和  $1.9 \times 10^5$  cells/mL)普遍低於非職業駕駛( $4.9 \times 10^6$  和  $4.6 \times 10^6$  cells/mL,  $p=0.13$  和  $0.07$ )，顯示在職業駕駛者其車輛雨刷水中總及活性 *Legionella* spp.濃度普遍低於非職業駕駛。本研究發現，職業駕駛者之車齡平均為 4.2 年，顯著低於非職業駕駛之車齡(9.6 年, $P=0.006$ )；而在用車習慣上，職業駕駛開車頻率高且開車時數長( $P<0.0001$ )，且職業駕駛添加雨刷清潔劑的頻率較高( $P=0.01$ )，上述現象似乎顯示在用車頻繁的情況下，雨刷水使用量大加上職業駕駛補充雨刷清潔劑較為頻繁，可能使雨刷水系統中的雨刷水停滯時間較非職業駕駛短，成為能夠降低雨刷水中 *Legionella* 污染情況之原因之一。雖然本研究無法證實職業駕駛在車內所接觸到退伍軍人菌的實際暴露量，但是職業駕駛待在車內的時間甚長，職業駕駛開車頻率高且開車時數長，在本研究中的計程車司機每日至少平均開 6 小時以上，雖然車輛中雨刷水的污染濃度較低，但若由於長時間駕車，使用雨刷水機會相對較高，故職業駕駛的退伍軍人菌暴露風險仍是值得注意的。

對於未添加雨刷清潔劑的雨刷水，其自來水的添加頻率則會影響其雨刷水中的 *Legionella* 濃度(Simple logitic regression， $P=0.18$ )，結果指出添加頻率為每 6

個月-1年添加1次者的活性 *Legionella* spp.濃度顯著高於每周添加1次者 (LSD,  $P<0.05$ )，顯示添加頻率越低時，其雨刷水中的活性 *Legionella* spp.濃度會越高，因此對於未添加雨刷清潔劑的雨刷水，若未適當的添加或更換雨刷水，則可能導致水桶內的雨刷水長期停滯，因而累積大量有機營養物質導致退伍軍人菌污染。

研究結果指出雨刷水出水口之總及活性 *Legionella* spp.濃度平均為雨刷水桶的 4.6 和 8 倍，其雨刷水出水口的污染情況可能較雨刷水桶嚴重，而導致於雨刷水出水口污染濃度較高的原因可能是雨刷水管受到 *Legionella* 污染所致。一般雨刷水若不經常噴刷使用，則可能會在雨刷水系統中成為停滯的水體，過去研究指出退伍軍人菌除了喜好停滯的水體外，富含生物膜及沈澱物更亦使退伍軍人菌增生 (Ciesielsky et al., 1984)，而用來傳送雨刷水到出水口的噴水軟管，若無破損則通常不會進行更換，因此其長期下來可能有生物膜累積的情形。而雨刷水系統中的噴水軟管材質是 PVC，過去研究指出 *L.pneumophila* 會生長於不同材質的自來水管線且伴隨著生物膜的存在 (Rogers et al., 1985; Rogers et al., 1994)，另有研究測試銅和塑膠材質 (polybutylene 和 PVC) 管線與水溫對於 *L.pneumophila* 孳生的影響，發現塑膠材質在任何溫度下的 *L.pneumophila* 滋生情況較銅管嚴重，顯示塑膠材質的管線易導致生物膜滋生而使 *L.pneumophila* 增生 (Kooij\_2005)，由於管線不常更換加上水體停滯時間長，其雨刷水軟管的材質又容易使生物膜累積，進而使得雨刷水出水口的 *Legionella* 濃度較雨刷水桶高。

在研究設計部分，本研究於 2-5 月間採樣，其採樣季節的不同可能會影響採樣結果，採樣季節的不同影響了樣本採集時的水溫溫度，因此在未來研究設計上，應審慎納入季節因子以評估不同季節對採樣結果的影響性。而溫度在過去文獻指出是影響雨刷水中 *Legionella* 檢出和孳生的重要因子，且退伍軍人菌喜好增生的環境條件為溫度 25-45°C 的溫暖的水體 (Wadowsky et al., 1986)，而在本研究中也

未納入其研究設計中，溫度方面分長期影響跟短期影響兩部分，長期影響是引擎區域的溫度變化會影響雨刷水桶內的雨刷水溫度，因此可能會隨著用車的情況而有所改變，而短期影響擇時採樣當天的雨刷水溫度，其受到當日的大氣溫度影響，以及距離車輛熄火後的測量時間，通常雨刷水會隨著引擎關閉而逐漸降至室溫，因此，溫度在未來研究上是很值得關注的方向。另外，研究已立意採樣方式進行樣本收集，其母群體受限於特定的時間和地點，並非隨機採樣，因此無法完全代表大台北地區車輛雨刷水的汙染情況。

本研究中的自來水水樣來自各採樣點的水源，僅能夠代表可能的雨刷水水源，無法完全代表各採樣對象車輛中的雨刷水基質，其自來水的代表性在未來研究上，可考量依照各採樣車主平時添加的水源處進行採樣分析，另外本研究只收集了5個地點的自來水樣本，相較於59輛車的雨刷水樣本略嫌不足，在比較差異度時可能也有些偏頗。在自來水的培養法分析中，只有進行為濃縮且未酸處理的分析，由於自來水中的可培養性 *Legionella* 濃度本來就低，未將濃縮之菌液進行培養容易有偽陰性的結果產生，因此在未來的分析方法上，應同步進行有濃縮且酸處理的培養法，以了解自來水和雨刷水中可培養性 *Legionella* 的濃度。

在雨刷水採樣部分，採集雨刷水出水口的樣本時，會因無法將無菌離心管直接於噴嘴下取樣而有採樣上的困難，使得無法評估該車輛的雨刷水出水口樣本，在未來欲採集雨刷水出水口樣本時，需先有規畫適當的採樣方式，且需避免汙染並兼具採樣方便性，另外，本研究推測雨刷水管可能有生物膜累積，而使雨刷水出水口汙染情況較為嚴重，在未來亦可進行雨刷水管的採集，分析其軟管上的生物膜進行探討及驗證。在分析方法部分，本研究未規劃測量其雨刷水中可培養性 *Legionella* 的濃度，其可培養性 *Legionella* 為暴露風險更直接的證據，除了應有更好的培養方法避免偽陰性結果外，另外也可以評估可培養性 *Legionella* 占活性

的比率為如何，以探討雨刷水中其 VBNC (viable but non culturable)的 *Legionella* 多寡。



## 第七章 結論

1. 雨刷水中之總 *Legionella* spp.陽性檢出率介於 90.4%-98.3%，總 *L. pneumophila* 陽性檢出率為 75.4%-78.9%；活性方面，活性 *Legionella* spp.陽性檢出率介於 88.5%-94.7%，而活性 *L. pneumophila* 陽性檢出率為 59.6%-57.9%；在可培養性部分，*Legionella* spp.陽性檢出率為 42.3%-56.1%，而 *L. pneumophila* 只有 28.1%-32.7%。
2. 雨刷水中陽性樣本之總 *Legionella* spp.濃度介於  $3.8 \times 10^1 - 1.9 \times 10^8$  cells/mL，而活性 *Legionella* spp.濃度介於  $4.9 \times 10^0 - 1.8 \times 10^8$ ；在 *L. pneumophila* 方面，陽性樣本之總及活性 *L. pneumophila* 檢出濃度分別介於  $5.7 \times 10^0 - 7.6 \times 10^3$  和  $1.1 \times 10^1 - 4.0 \times 10^3$  cells/mL。
3. 雨刷水桶與雨刷出水口在 *Legionella* 陽性檢出率（總 *Legionella* spp.各為 90.4%和 98.3%）、*Legionella* 檢出濃度（總 *Legionella* spp.各為  $4.4 \times 10^6$  和  $3.9 \times 10^6$  cells/mL）及水質條件上，皆無統計上顯著差異 ( $P>0.05$ )，然雨刷水出水口/雨刷水桶 (O/T)比值顯示，雨刷出水口的 *Legionella* 平均濃度較雨刷水桶內高，顯示雨刷水管線很可能有 *Legionella* 污染現象。
4. 以 Simple logistic regression 統計分析結果顯示對於雨刷清潔劑的添加頻率會顯著影響其活性 *L. pneumophila* 的檢出濃度 (OR=0.39,P=0.03)，且添加越頻繁其雨刷水中活性 *L. pneumophila* 濃度越低。
5. 以 Spearman r correlation 統計分析結果顯示，DOC 會正向影響活性 *L. pneumophila* 檢出濃度 ( $r=0.39,P=0.002$ )而硬度則是負向影響總 *Legionella* spp. ( $r=-0.26,P=0.02$ )。
6. 以 Spearman r correlation 統計分析結果顯示，車行公里數越多時，雨刷水中活性 *Legionella* spp.濃度亦越高 ( $r=0.31, P=0.03$ )。
7. 以 Multiple logistic regression with stepwise procedure 分別分析水質因子、雨刷水操作維護與車輛資訊及用車習慣與雨刷水 *Legionella* 檢出之相關，統計結



果顯示無任何水質因子及車輛資訊及用車習慣因子顯著影響 *Legionella* 之檢出，但在雨刷水操作維護與 *Legionella* 的之相關中，添加雨刷清潔劑的頻率與活性 *L. pneumophila* 的檢出有顯著相關 (OR=0.54 ,P=0.01)。

8. 以 Multiple linear regression with stepwise procedure 分別分析水質因子、雨刷水操作維護和車輛資訊及用車習慣與雨刷水 *Legionella* 濃度之相關，統計結果顯示導電度正向顯著影響活性 *Legionella* spp.濃度 ( $\beta=0.0006, P=0.10$ )，而硬度則負向顯著影響總 *Legionella* spp.與 *L. pneumophila* 之檢出濃度 ( $\beta=-0.007$  及  $\beta=-0.005, P=0.02$  與  $0.02$ )，在雨刷水操作維護中，雨刷清潔劑添加頻率小於每 6 個月 1 次者的雨刷水中活性 *L. pneumophila* 濃度較添加頻率大於每 6 個月 1 次者高 ( $\beta=-0.59, P=0.09$ )，而在車輛資訊及用車習慣中，車行公里數正向影響總和活性 *Legionella* spp.檢出濃度 ( $\beta=0.0001, P=0.05$  和  $0.13$ )。
9. 在 Generalized estimating equation (GEE)分析雨刷水 *Legionella* 污染和影響因子的相關性中，總及活性之 *Legionella* spp.的檢出濃度顯著受到硬度負向影響 ( $\beta=-0.011, P<0.0001$  和  $\beta=-0.01, P=0.001$ )；在 *L. pneumophila* 方面，硬度亦負向顯著影響總及活性之 *L. pneumophila* 濃度( $\beta=-0.007, P<0.0001$  和  $\beta=-0.007, P=0.01$ )，另外在導電度越高時，其總及活性 *L. pneumophila* 之濃度也會增高 ( $\beta=0.0003, P<0.0001$  和  $\beta=0.0005, P=0.0001$ )，在模式中亦可發現雨刷清潔劑添加頻率大於每 6 個月添加 1 次者其車中雨刷水中總及活性 *L. pneumophila* 的濃度顯著高於添加頻率小於每 6 個月添加 1 次者 ( $\beta=-0.24, P=0.0013$  和  $\beta=-0.58, P<0.001$ )。
10. 職業駕駛者其車輛平均車齡較非職業駕駛車輛低，而在用車習慣上，職業駕駛開車頻率高且開車時數長，加上職業駕駛添加雨刷清潔劑及雨刷水的頻率較高，因而發現在職業駕駛者其車輛雨刷水中總及活性 *Legionella* spp.濃度 ( $1.5 \times 10^6$  和  $1.9 \times 10^5$  cells/mL)普遍低於非職業駕駛 ( $4.9 \times 10^6$  和  $4.6 \times 10^6$  cells/mL,  $p=0.13$  和  $0.07$ )，似乎顯示在即使用車頻繁的情況下，若有適當的雨刷水操作

及維護，可降低雨刷水中的 *Legionella* 污染情況。

11. 自來水與雨刷水之比較發現自來水之濁度 (1.8NTU)、導電度 (87.8 $\mu$ S/cm)、TDS (41.6 mg/L)、DOC (ND)與 HPC ( $4.4 \times 10^3$  CFU/mL)亦顯著低於雨刷水 (27.5NTU、382.2 $\mu$ S/cm、204.1mg/L、3259.7ppm 和  $6.2 \times 10^6$  CFU/mL,  $P=0.02$ 、0.01、0.01、0.01 和 0.003)，且自來水中總 *Legionella* spp. ( $1.9 \times 10^2$  cells/mL) 及其活性 *Legionella* spp. ( $2.0 \times 10^1$  cells/mL)均顯著低於雨刷水 ( $4.2 \times 10^6$  及  $3.5 \times 10^6$  cells/mL)，為其 21842 和 175000 倍，顯示雨刷水的水質使其利於 *Legionella* 孳生與存活，因而導致其污染狀況較自來水嚴重。



## 第八章 文献引用

Ahmet Pinar, MD; Julio A. Ramirez, MD; Laura L. Schindler, MT(ASCP); Richard. (2002). The Use of Heteroduplex Analysis of Polymerase Chain Reaction Products to Support the Possible Transmission of *Legionella pneumophila* From a Malfunctioning Automobile Air Conditioner. *INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY*, 23(3).

Asmi, E., Antola, M., Yli-Tuomi, T., Jantunen, M., Aarnio, P., Makela, T., . . .

Hameri, K. (2009). Driver and passenger exposure to aerosol particles in buses and trams in Helsinki, Finland. *Sci Total Environ*, 407(8), 2860-2867. doi:

10.1016/j.scitotenv.2009.01.004

Bargellini, Annalisa, Marchesi, Isabella, Righi, Elena, Ferrari, Angela, Cencetti, Stefano, Borella, Paola, & Rovesti, Sergio. (2011). Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: Association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Research*, 45(6), 2315-2321. doi:

10.1016/j.watres.2011.01.009

Blatny JM, Reif BA, Skogan G, Andreassen O, Høiby EA, Ask E, Waagen V, Aanonsen D, Aaberge IS, Caugant DA. (2008). Tracking airborne *Legionella* and *Legionella pneumophila* at a biological treatment plant. *Environ Sci Technol*. .

Bonetta, S., Bonetta, S., Ferretti, E., Balocco, F., & Carraro, E. (2010). Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. *J Appl Microbiol*, 108(5), 1576-1583. doi:

10.1111/j.1365-2672.2009.04553.x

Borella, P., Montagna, M. T., Stampi, S., Stancanelli, G., Romano-Spica, V., Triassi, M., . . . Boccia, S. (2005). *Legionella* Contamination in Hot Water of Italian Hotels.

*Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5805-5813. doi:

10.1128/aem.71.10.5805-5813.2005

Brown, A., Vickers, R. M., Elder, E. M., Lema, M., & Garrity, G. M. (1982). Plasmid and surface antigen markers of endemic and epidemic *Legionella pneumophila* strains. *J Clin Microbiol*, *16*(2), 230-235.

Carratala, J., Gudiol, F., Pallares, R., Dorca, J., Verdaguier, R., Ariza, J., & Manresa, F. (1994). Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, *149*(3 Pt 1), 625-629.

Che, D., Campese, C., Santa-Olalla, P., Jacquier, G., Bitar, D., Bernillon, P., & Desenclos, J. C. (2008). Sporadic community-acquired Legionnaires' disease in France: a 2-year national matched case-control study. *Epidemiol Infect*, *136*(12), 1684-1690. doi: 10.1017/S0950268807000283

Chen, N. T., & Chang, C. W. (2010). Rapid quantification of viable *Legionellae* in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *J Appl Microbiol*, *109*(2), 623-634. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04678.x

D Che, B Decludt, C Campese, and J Desenclos. (2003). Sporadic cases of community acquired legionnaires' disease: an ecological study to identify new sources of contamination. *J Epidemiol Community Health*, *57*(6), 466-469.

Deloge-Abarkan M, Ha TL, Robine E, Zmirou-Navier D, Mathieu L. (2007). Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization. *J Environ Monit.*, *9*(1).

Den Boer, J. W., Nijhof, J., & Friesema, I. (2006). Risk factors for sporadic community-acquired Legionnaires' disease. A 3-year national case-control study. *Public Health*, *120*(6), 566-571. doi: 10.1016/j.puhe.2006.03.009

Diederer, B. M. (2008). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect*, *56*(1), 1-12. doi: 10.1016/j.jinf.2007.09.010

Dutil, S., Veillette, M., Meriaux, A., Lazure, L., Barbeau, J., & Duchaine, C. (2007).

Aerosolization of mycobacteria and *Legionellae* during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ Microbiol*, 9(11), 2836-2843. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01395.x

Edagawa, A., Kimura, A., Doi, H., Tanaka, H., Tomioka, K., Sakabe, K., . . . Suzuki, Y. (2008). Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J Appl Microbiol*, 105(6), 2104-2114. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03932.x

Fields, B. S. (1996). The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends Microbiol*, 4(7), 286-290.

Fujimura, S., Oka, T., Tooi, O., Meguro, M., Chiba, M., Kawamura, M., . . .

Watanabe, A. (2006). Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 7 strain from bathwater samples in a Japanese hospital. *J Infect Chemother*, 12(2), 105-108. doi: 10.1007/s10156-005-0428-5

Gilmour, M. W., Bernard, K., Tracz, D. M., Olson, A. B., Corbett, C. R., Burdz, T., . . . Berry, J. D. (2007). Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. *J Med Microbiol*, 56(Pt 3), 336-341. doi: 10.1099/jmm.0.46738-0

Guillemet, T. A., Lévesque, B., Gauvin, D., Brousseau, N., Giroux, J. P., & Cantin, P. (2010). Assessment of real-time PCR for quantification of *Legionella* spp. in spa water. *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), 639-644. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02947.x

Janet E. Stout, Ph.D., and Victor L. Yu, M.D. (1997). Legionellosis. *N Engl J Med*, 682-687.

Kusnetsov., Jaana m., Martikainen., Pertti j., & JouSimies-somer., Hannele r. (1993).

PHYSICAL, CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL WATER CHARACTERISTICS ASSOCIATED WITH THE OCCURRENCE OF *LEGIONELLA* IN COOLING TOWER SYSTEMS. *War. Res.*, 27(1).

Kusnetsov, Jaana m., Martikainen., Pertti j., & JouSimies-somer., Hannele r. (2003). Colonization of hospitalwater systems by *Legionellae*, mycobacteria and other heterotrophic bacteria potentially hazardous to risk group patients. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 111.

Lasheras, A., Boulestreau, H., Rogues, A. M., Ohayon-Courtes, C., Labadie, J. C., & Gachie, J. P. (2006). Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control*, 34(8), 520-525. doi: 10.1016/j.ajic.2006.03.007

Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P. P., Sacchetti, R., Stampi, S., & Zanetti, F. (2005). *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J Appl Microbiol*, 98(2), 373-379. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02458.x

Lin, Y. S., Stout, J. E., Yu, V. L., & Vidic, R. D. (1998). Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Semin Respir Infect*, 13(2), 147-159.

M Bauer, L Mathieu, M Deloge-Abarkan. (2008). *Legionella* bacteria in shower aerosols increase the risk of Pontiac fever among older people in retirement homes.

Marston, B. J., Lipman, H. B., & Breiman, R. F. (1994). Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med*, 154(21), 2417-2422.

Muder, R. R., Yu, V. L., & Woo, A. H. (1986). Mode of transmission of *Legionella pneumophila*. A critical review. *Arch Intern Med*, 146(8), 1607-1612.

Nguyen, T. M., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., . . . Desenclos, J. C. (2006). A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis*, 193(1), 102-111. doi: 10.1086/498575

- Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. (2003). Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol*.
- Patterson, W. J., Hay, J., Seal, D. V., & McLuckie, J. C. (1997). Colonization of transplant unit water supplies with *Legionella* and protozoa: precautions required to reduce the risk of legionellosis. *J Hosp Infect*, 37(1), 7-17.
- Polat Y, Ergin C, Kaleli I, Pinar A. (2007). Investigation of *Legionella pneumophila* seropositivity in the professional long distance drivers as a risky occupation. *Mikrobiyoloji Bulteni* 41(2), 211-217.
- Pryor, M., Springthorpe, S., Riffard, S., Brooks, T., Huo, Y., Davis, G., & Sattar, S. A. (2004). Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci Technol*, 50(1), 83-90.
- Roig, J., & Rello, J. (2003). Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *J Antimicrob Chemother*, 51(5), 1119-1129. doi: 10.1093/jac/dkg191
- Rose, Laura J., Simmons, Robert B., Crow, S. A., & Ahearn, Donald G. (2000). Volatile Organic Compounds Associated with Microbial Growth in Automobile Air Conditioning Systems. *Current Microbiology*, 41(3), 206-209. doi: 10.1007/s002840010120
- Sabria, M., & Yu, V. L. (2002). Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis*, 2(6), 368-373.
- Sakamoto, R., Ohno, A. (2009). *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerg Infect Dis*, 15(8), 1295-1297. doi: 10.3201/eid1508.090317
- Simmons, R. B., Noble, J. A., Rose, L., Price, D. L., Crow, S. A., & Ahearn, D. G. (1997). Fungal colonization of automobile air conditioning systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19(2), 150-153. doi: DOI 10.1038/sj.jim.2900451

Simmons, R. B., Rose, L. J., Crow, S. A., & Ahearn, D. G. (1999). The occurrence and persistence of mixed biofilms in automobile air conditioning systems. *Curr Microbiol*, 39(3), 141-145.

Sopena, N., Sabria, M., Pedro-Botet, M. L., Manterola, J. M., Matas, L., Dominguez, J., . . . Foz, M. (1999). Prospective study of community-acquired pneumonia of bacterial etiology in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18(12), 852-858.

Stout, J. E., Yu, V. L., & Muraca, P. (1985). Isolation of *Legionella pneumophila* from the cold water of hospital ice machines: implications for origin and transmission of the organism. *Infect Control*, 6(4), 141-146.

Valster, R. M., Wullings, B. A., van den Berg, R., & van der Kooij, D. (2011). Relationships between free-living protozoa, cultivable *Legionella* spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean. *Appl Environ Microbiol*, 77(20), 7321-7328. doi: 10.1128/AEM.05575-11

Vonberg, R. P., Gastmeier, P., Kenneweg, B., Holdack-Janssen, H., Sohr, D., & Chaberny, I. F. (2010). The microbiological quality of air improves when using air conditioning systems in cars. *BMC Infect Dis*, 10, 146. doi: 10.1186/1471-2334-10-146

Wallensten, A., Oliver, I., Ricketts, K., Kafatos, G., Stuart, J. M., & Joseph, C. (2010). Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk factor for Legionnaires' disease. *Eur J Epidemiol*, 25(9), 661-665. doi: 10.1007/s10654-010-9471-3

Zanetti F, Stampi S, De Luca G, Fateh-Moghadam P, Antonietta M, Sabattini B, Checchi L. (2000). Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units. *Eur J Oral Sci.*, 108.



## 附錄

### 附錄一 問卷調查表

您好：

我是台灣大學公衛學院環境衛生研究所學生許雅婷，目前正進行一個車體內  
部之微生物相關研究，這是一份針對雨刷水研究的問卷，想了解您對於雨刷水的  
使用習慣，希望您能夠為我們填寫這份問卷。問卷內容將作為學術論文之用，資  
料將以彙整方式呈現，敬請安心作答，也謝謝您的合作與幫忙！

#### A 車體資訊

A1. 請問您的車輛製造年份為西元\_\_\_\_\_年

A2. 請問您的車輛目前行經里程數\_\_\_\_\_公哩

#### B 用車習慣

B1. 請問您開車代步的頻率？

1)週末 2)週間(周一至周五) 3)每天

B2. 請問您平均每天開車的時間？

1)1小時內 2)1-3小時 3)3-6小時 4)6小時以上

B3. 請問您通常停車的位置 (是否日曬雨淋)?

1)地下室 2)地上室內 3)有遮蔽的室外 4)無遮蔽的室外 (路邊)

#### C 雨刷水使用及維護

C1. 請問您是否有更換/清洗過雨刷水桶？

0)從未更換或清洗 1)是

C1-1. 上次更換/清洗為\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日,距離今天\_\_\_\_\_天

C2. 請問您是否有添加過雨刷清潔劑 (有無泡沫產生)?

1) 有添加過雨刷清潔劑

0) 從未添加雨刷清潔劑且為添加自來水 (跳答至 C4)

C3. 請問您添加哪種雨刷清潔劑 (雨刷清潔劑選單)?

- 1) 市售雨刷精 2) 家用清潔劑 3) 保養廠添加, 品牌未知 4) 其他\_\_\_\_\_

C3-A 廠牌 (名稱)\_\_\_\_\_

C3-1. 請問您添加的雨刷清潔劑是否有進行稀釋, 稀釋比率為?

- 1) 無 2) 1:1 3) 1:10 4) 1:50 5) 保養廠添加, 比率未知 6) 依產品說明

C3-2. 請問您多久添加一次雨刷清潔劑 (進保養廠維護的頻率)?

- 1) 從未補充過, 已經使用\_\_\_\_年 2) 1年以上 3) 6個月-1年 4) 2-6個月  
5) 每月 6) 每周

C3-3 請問您每次加入約多少體積的雨刷清潔劑?

添加雨刷清潔劑體積約為\_\_\_\_\_mL  保養廠添加, 體積未知, 請問您通常是到\_\_\_\_\_保養廠進行維護保養

C3-4. 請問您上次添加雨刷水為何時?

上次添加日期 \_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日, 距離今天\_\_\_\_\_天

C4. 請問您多久添加一次自來水?

- 1) 從未補充過, 已經使用\_\_\_\_年 2) 1年以上 3) 6個月-1年 4) 2-6個月  
5) 每月 6) 每周

C4-1. 請問您每次添加多少體積的自來水?

添加自來水體積為\_\_\_\_\_mL

C4-2. 請問您上次添加雨刷水為何時?

上次添加日期 \_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日, 距離今天\_\_\_\_\_天

#### D 其他紀錄

1. 請問您的雨刷水系統是否曾經故障而更換零件過?

否  是, 已更換\_\_\_\_\_

2. 為了後續可能需要補齊的資訊, 希望能夠留下您的聯絡方式, 以利研究順進行, 個人資料除了不外洩之外, 非必要也不會冒昧打擾您! 請您放心~

車主姓名\_\_\_\_\_ ; 車主連絡電話\_\_\_\_\_

附錄二 多變項分析中之自變項及應變項

Table B-1 Independent variable of water quality in multiple analysis for detection *Legionella*

X 值		Y 值							樣本數	統計方法
自變項因子	單變項分析	連續/ 非連續	分類 說明	變異數影響 因子 (VIF)	納入與 否	應變項因子	Tank 和 Outlet 檢 出	皆為陽 性無法 分析		
硬度	顯著	連續	-	-	納入	有無檢出	全部納入	無	n=82	Multiple logistic regression with stepwise procedure
溶解性有機碳	顯著	連續	-	-	納入	<i>Legionella</i>				
pH 值	顯著	連續	-	-	納入					
異營性細菌	顯著	連續	-	-	納入					
導電度	不顯著	連續	-	-	不納入					
總溶解固體	不顯著	連續	-	大於 10	不納入					
濁度	不顯著	連續	-	大於 10	不納入					
餘氯	不顯著	連續	-	-	不納入					

Table B-2 Independent variable of wiper fluid maintenance in multiple analysis for detection *Legionella*

X 值		Y 值							
自變項因子	單變項分析	連續/非連續	分類說明	納入與否	應變項因子	Tank 和 Outlet 檢出	無法分析	樣本數	統計方法
有無清洗水桶	顯著	非連續 (含缺失值)	分為有和無兩組	納入	有無檢出	兩者皆為陰性	總及活性	n=42	Multiple logistic regression with stepwise procedure
兩刷清潔劑稀釋比率	顯著	非連續 (含缺失值)	將 4 組分成 2 組 (未稀釋、稀釋比率 1:1 和 1:10 三者合併為 1 組, 1:50 為 1 組)	納入	<i>Legionella</i>	則為陰性, 其一為陽性	<i>Legionella</i> spp. 皆為陽性		
兩刷清潔劑添加頻率	顯著	非連續 (含缺失值)	將其 4 組分成 2 組 (從未、1 年以上和 6 個月-1 年為 1 組, 2-6 個月、每月和每周為 1 組)	納入		則為陽性	性無法分析		
兩刷清潔劑添加種類	不顯著	非連續	-	不納入					
自來水添加頻率	不顯著	非連續	-	不納入					
有無添加兩刷清潔劑	不顯著	非連續	-	不納入					
距離上次清洗/更換兩刷水桶的時間	不顯著	連續	-	不納入					
距離上次添加兩刷水的時間	不顯著	連續	-	不納入					

Table B-3 Independent variable of driving habit and car informantion in multiple analyses for detection *Legionella*

X 值						Y 值			樣本數	統計方法
自變項因子	單變項分析	連續/非連續	分類說明	變異數影響因子 (VIF)	納入與否	應變項因子	Tank 和 Outlet 檢出	皆為陽性無法分析		
車齡	顯著	連續 (含缺失值)	-	-	納入	有無檢出 <i>Legionella</i>	兩者皆為陰性	總及活性 <i>Legionella</i> spp.	n=42	Multiple logistic regression with stepwise procedure
每天平均開車時間	顯著	非連續 (含缺失值)	將其 4 組分成 2 組，1 小時內和 1-3 小時為 1 組，3-6 小時和 6 小時以上為 1 組	-	納入		則為陰性,其一為陽性	則為陽性		
車行公里數	不顯著	連續 (含缺失值)	-	-	不納入					
每周開車頻率	不顯著	非連續 (含缺失值)	-	-	不納入					
停車位置	不顯著	非連續	-	-	不納入					

Table B-4 Independent variable of water quality in multiple analysis for abundance of *Legionella*

X 值		Y 值					樣本數	統計方法		
自變項因子	單變項分析	連續/非連續	分類說明	變異數影響因子 (VIF)	納入與否	應變項因子	Tank 和 Outlet 濃度	資料處理		
硬度	顯著	連續	-	-	納入	<i>Legionella</i>	全部納入	剔除濃度為 0	82 (Leg_T)	Multiple linear regression with stepwise procedure
導電度	顯著	連續	-	-	納入	檢出濃度	者且將	72 (Lp_T)		
溶解性有機碳	顯著	連續	-	-	納入		數值轉	80 (Leg_V)		
pH 值	顯著	連續	-	-	納入		log	56 (Lp_V)		
異營性細菌	顯著	連續	-	-	納入					
總溶解固體	不顯著	連續	-	大於 10	不納入					
濁度	不顯著	連續	-	大於 10	不納入					
餘氯	不顯著	連續	-	-	不納入					

Table B-5 Independent variable of maintenance in multiple analysis for abundance of *Legionella*

X 值				Y 值					
自變項因子	單變項分析	連續/非連續	分類說明	納入與否	應變項因子	Tank 和 Outlet 濃度	資料處理	樣本數	統計方法
有無清洗水桶	顯著 (檢出)	非連續 (含缺失值)	分為有和無 2 組	納入	<i>Legione lla</i> 檢出	兩者濃度的平均值	剔除濃度為 0 者且將數值轉	42 (Leg_T) 35 (Lp_T)	Multi ple
雨刷清潔劑稀釋比率	顯著 (檢出)	非連續 (含缺失值)	將 4 組分成 2 組 (未稀釋、稀釋比率 1:1 和 1:10 為 1 組, 1:50 為 1 組)	納入	濃度			41 (Leg_V) 29 (Lp_V)	linear regres sion
雨刷清潔劑添加頻率	顯著 (檢出)	非連續 (含缺失值)	將其 4 組分成 2 組 (從未、1 年以上和 6 個月-1 年為 1 組, 2-6 個月、每月和每周 為 1 組)	納入			log		with stepwi se proce dure
自來水添加頻率	顯著	非連續		不納入					
雨刷清潔劑添加種類	不顯著	非連續		不納入					
有無添加雨刷清潔劑	不顯著	非連續		不納入					
距離上次清洗/更換雨刷水桶的時間	不顯著	連續		不納入					
距離上次添加雨刷水的時間	不顯著	連續		不納入					

Table B-6 Independent variable of driving habit in multiple analysis for abundance of *Legionella*

X 值			Y 值					樣本數	統計方法	
自變項因子	單變項分析	連續/非連續	分類說明	變異數影響因子 (VIF)	納入與否	應變項因子	Tank 和 Outlet 濃度	資料處理		
車齡	顯著	連續 (含缺失值)	-	-	納入	<i>Legionella</i> 兩者濃度的平均值	剔除濃度為0者且將數值轉 log	42 (Leg_T) 35 (Lp_T) 41 (Leg_V) 29 (Lp_V)	Multiple linear regression with stepwise procedure	
車行公里數	顯著	連續 (含缺失值)	-	-	納入					
每周開車頻率	顯著	非連續 (含缺失值)	將3組分為2組，每天開車的為1組，另外周末和周間開車的合併為1組	-	納入					
每天平均開車時間	不顯著	非連續	將其4組分成2組，1小時內和1-3小時為1組，3-6小時和6小時以上為1組	-	不納入					
停車位置	不顯著	非連續	-	-	不納入					



附件三 重複之圖表結果

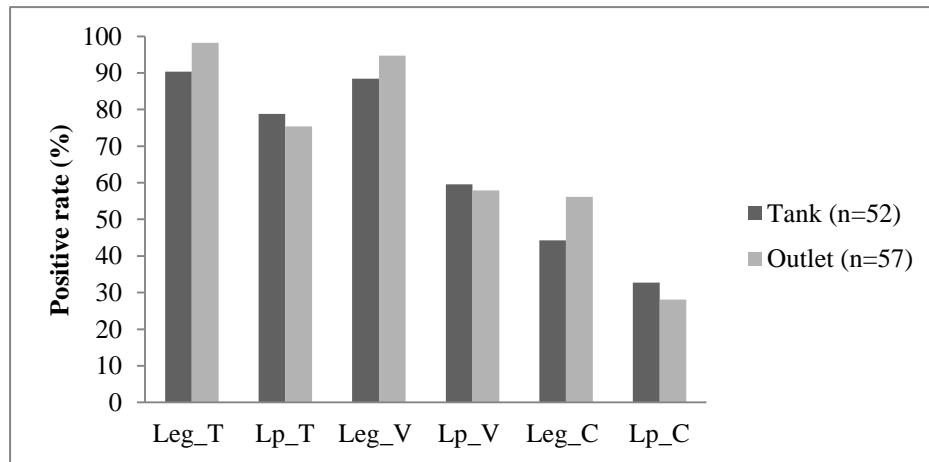


Figure C-1 Positive rate of *Legionella* in wiper fluid samples of vehicle tank and outlet

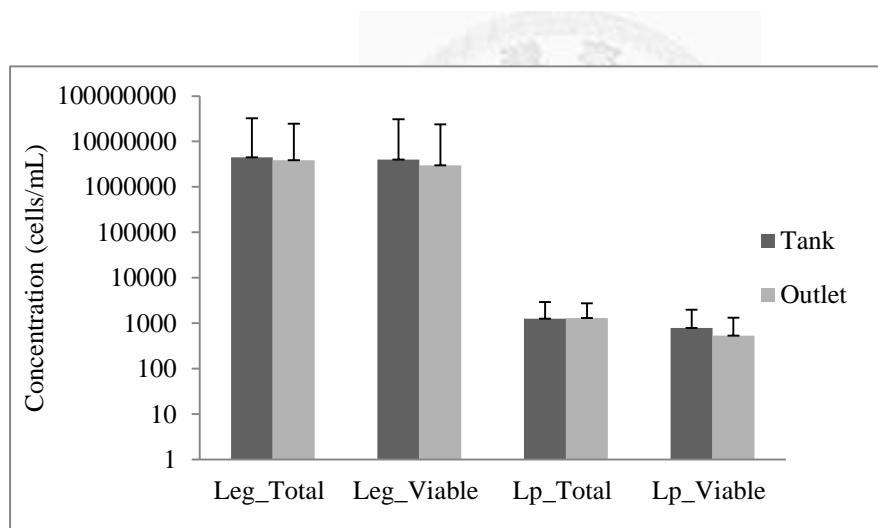


Figure C-2 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples (Tank and Outlet)

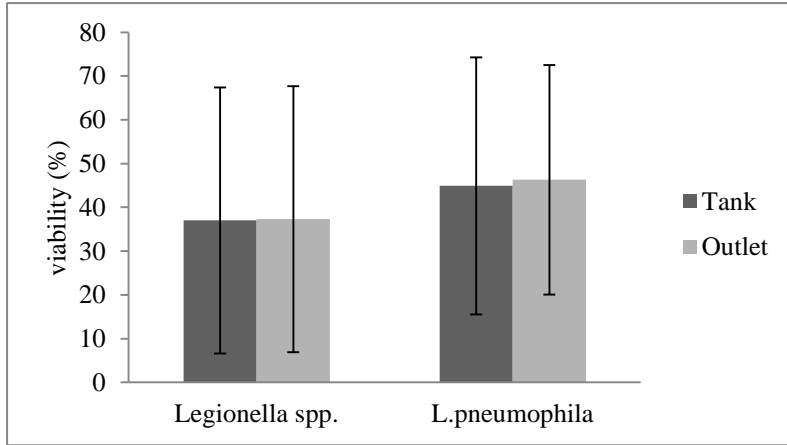


Figure C-3 Viability of *Legionella* in wiper fluid samples of tank and outlet

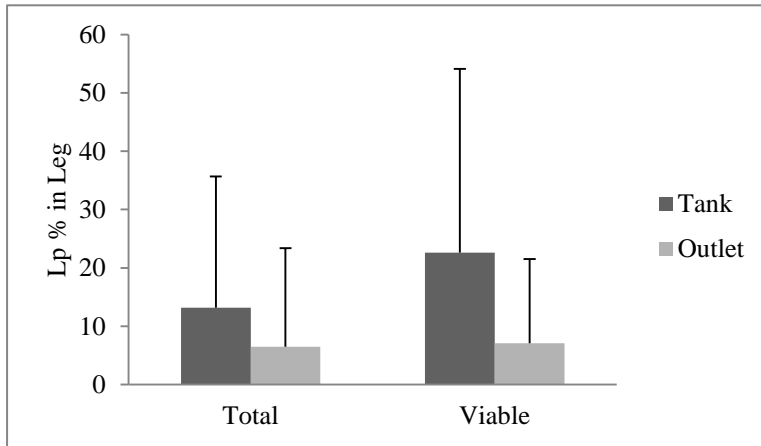


Figure C-4 Concentration of *L. pneumophila* relative to that of *Legionella* spp. (Lp/Leg, %) in wiper fluid samples collected from vehicle tank and outlet<sup>a</sup>

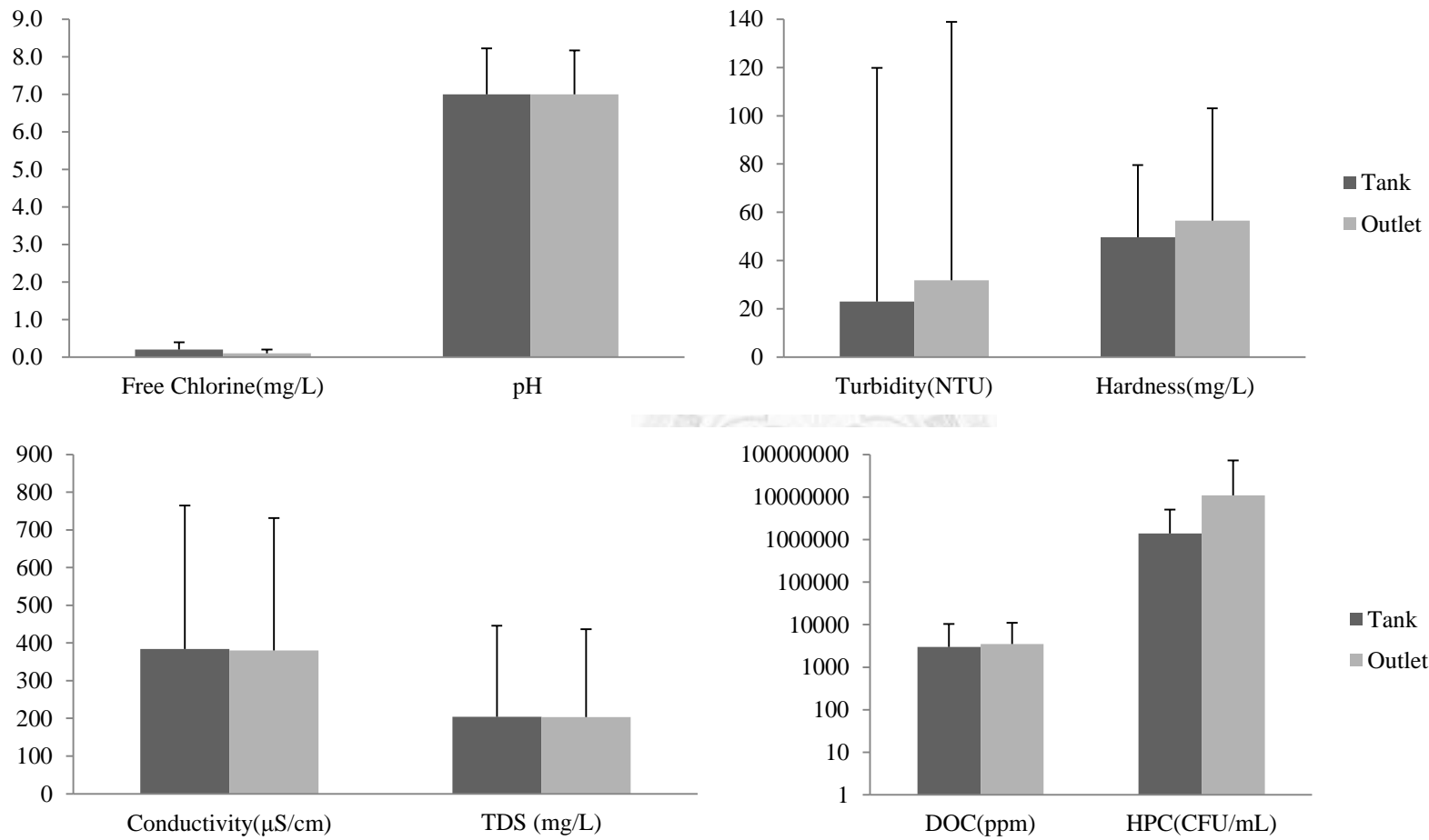


Figure C-5 Comparison of levels of water quality indicators in wiper fluid of vehicle between tank and outlet

Table C-1 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples with or without washing wiper fluid tank

	<i>Legionella</i> concentration, cells/mL						
	Washing or replacing wiper fluid tank			Without washing or replacing wiper fluid tank			P value <sup>a</sup>
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	
Total <i>Legionella</i> spp.	48	4.1 x 10 <sup>6</sup>	2.5 x 10 <sup>7</sup>	5	3.9 x 10 <sup>6</sup>	8.4 x 10 <sup>6</sup>	0.73
Viable <i>Legionella</i> spp.	47	3.8 x 10 <sup>6</sup>	2.5x 10 <sup>7</sup>	5	1.3 x 10 <sup>5</sup>	2.3 x 10 <sup>5</sup>	0.48
Total <i>L. pneumophila</i>	42	1.2 x 10 <sup>3</sup>	1.2 x 10 <sup>3</sup>	3	5.3 x 10 <sup>2</sup>	6.2 x 10 <sup>2</sup>	0.99
Viable <i>L. pneumophila</i>	34	5.8 x 10 <sup>2</sup>	8.2 x 10 <sup>2</sup>	3	3.9 x 10 <sup>2</sup>	5.3 x 10 <sup>2</sup>	0.91

a:以 Wilcoxon rank sum test 進行有無清洗或更換雨刷水桶對退伍軍人菌濃度之影響

Table C-2 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples of adding detergent solution or not,cells/mL

	<i>Legionella</i> concentration, cells/mL						
	Adding detergent solution			Without detergent solution			P value <sup>a</sup>
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	
Total <i>Legionella</i> spp.	42	3.5 x 10 <sup>5</sup>	6.3 x 10 <sup>5</sup>	11	5.0 x 10 <sup>6</sup>	2.7 x 10 <sup>7</sup>	0.63
Viable <i>Legionella</i> spp.	41	7.4 x 10 <sup>4</sup>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	11	4.2 x 10 <sup>6</sup>	2.6 x 10 <sup>7</sup>	0.58
Total <i>L. pneumophila</i>	35	1.4 x 10 <sup>3</sup>	1.4 x 10 <sup>3</sup>	10	1.1 x 10 <sup>3</sup>	1.2 x 10 <sup>3</sup>	1.00
Viable <i>L. pneumophila</i>	29	5.6 x 10 <sup>2</sup>	5.7 x 10 <sup>2</sup>	8	5.6 x 10 <sup>2</sup>	8.5 x 10 <sup>2</sup>	0.90

a:以 Wilcoxon rank sum test 進行有添加雨刷清潔劑的平均濃度與未添加雨刷清潔劑的平均濃度有無差異

Table C-3 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples of adding commercial screen wash or household cleaner, cells/mL

	<i>Legionella</i> concentration, cells/mL						P value <sup>a</sup>
	Commercial screen wash			Household cleaner			
	N	mean	SD	N	mean	SD	
Total <i>Legionella</i> spp.	24	1.1 x 10 <sup>6</sup>	3.9 x 10 <sup>6</sup>	9	9.0 x 10 <sup>5</sup>	2.3 x 10 <sup>6</sup>	0.45
Viable <i>Legionella</i> spp.	24	1.2 x 10 <sup>5</sup>	2.7 x 10 <sup>5</sup>	8	1.3 x 10 <sup>5</sup>	2.9 x 10 <sup>5</sup>	0.59
Total <i>L. pneumophila</i>	20	1.0 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>3</sup>	8	8.9 x 10 <sup>2</sup>	1.2 x 10 <sup>3</sup>	0.47
Viable <i>L. pneumophila</i>	18	5.2 x 10 <sup>2</sup>	7.7 x 10 <sup>2</sup>	7	6.2 x 10 <sup>2</sup>	1.1 x 10 <sup>3</sup>	0.93

a: 以 Wilcoxon rank sum test 進行添加市售雨刷精的雨刷水平均濃度與添加家用清潔劑的平均濃度有無差異



Table C-4 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples in different detergent solution dilution, cells/mL

		<i>Legionella</i> concentration, cells/mL			
		<i>Legionella</i> spp.		<i>L. pneumophila</i>	
		Total	Viable	Total	Viable
No dilution	Mean	1.3 x 10 <sup>4</sup>	7.2 x 10 <sup>3</sup>	-	-
	SD	- <sup>a</sup>	-	-	-
	N	1	1	0	0
Dilution of 1:1	Mean	6.4 x 10 <sup>6</sup>		1.1 x 10 <sup>3</sup>	6.3 x 10 <sup>2</sup>
	SD	1.1 x 10 <sup>7</sup>	3.0 x 10 <sup>5</sup>	8.9 x 10 <sup>2</sup>	5.2 x 10 <sup>2</sup>
	N	3	3	3	3
Dilution of 1:10	Mean	5.1 x 10 <sup>5</sup>	3.4 x 10 <sup>5</sup>	9.1 x 10 <sup>2</sup>	8.6 x 10 <sup>2</sup>
	SD	9.3 x 10 <sup>5</sup>	5.2 x 10 <sup>5</sup>	1.4 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>3</sup>
	N	7	6	5	4
Dilution of 1:50	Mean	7.3 x 10 <sup>5</sup>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>3</sup>	4.1 x 10 <sup>2</sup>
	SD	1.7 x 10 <sup>6</sup>	2.8 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>3</sup>	7.8 x 10 <sup>2</sup>
	N	16	16	15	14
Follow instructions of product	Mean	2.4 x 10 <sup>5</sup>	9.6 x 10 <sup>4</sup>	3.3 x 10 <sup>2</sup>	-
	SD	2.0 x 10 <sup>5</sup>	7.6 x 10 <sup>4</sup>	2.3 x 10 <sup>2</sup>	-
	N	3	3	2	0

a: 只有 1 個陽性樣本，無法計算其 SD 值

Table C-5 Concentration of *Legionella* in wiper fluid samples in different adding detergent solution frequency

		<i>Legionella</i> concentration, cells/mL			
		<i>Legionella</i> spp.		<i>L. pneumophila</i>	
		Total	Viable	Total	Viable
Every week	Mean	$1.8 \times 10^6$	$6.4 \times 10^4$	$1.3 \times 10^3$	$8.8 \times 10^2$
	SD	$3.4 \times 10^6$	$6.4 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$
	N	4	4	4	4
Every month	Mean	$4.9 \times 10^6$	$1.5 \times 10^5$	$7.2 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$
	SD	$9.4 \times 10^6$	$2.6 \times 10^5$	$7.3 \times 10^2$	$4.6 \times 10^2$
	N	4	4	4	4
2-6 months	Mean	$2.7 \times 10^5$	$6.8 \times 10^4$	$6.9 \times 10^2$	$1.7 \times 10^2$
	SD	$5.4 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$6.7 \times 10^2$	$1.5 \times 10^2$
	N	10	10	9	8
6 months -1 year	Mean	$1.5 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$	$1.4 \times 10^3$	$9.2 \times 10^2$
	SD	$5.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$1.4 \times 10^3$	$9.6 \times 10^2$
	N	12	11	8	5
Over 1year	Mean	$1.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3$	$4.1 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$
	SD	$1.4 \times 10^4$	$4.2 \times 10^3$	$1.2 \times 10^2$	-
	N	3	3	2	1
Never	Mean	$1.1 \times 10^5$	$3.9 \times 10^4$	$3.1 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$
	SD	- <sup>a</sup>	-	-	-
	N	1	1	1	1

a: 只有 1 個陽性樣本，無法計算其 SD 值

Table C-6 Concentration of *Legionella* in different frequency of adding tap water

		<i>Legionella</i> concentration, cells/mL					
		Frequency of adding tap water					
		Never	One year	6month-one year	2-6 months	Every month	Every week
Total <i>Legionella</i> spp.	Mean	1.3 x 10 <sup>5</sup>	9.2 x 10 <sup>5</sup>	7.1 x 10 <sup>5</sup>	4.0 x 10 <sup>3</sup>	3.8 x 10 <sup>4</sup>	6.5 x 10 <sup>2</sup>
	SD	- <sup>a</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	8.5 x 10 <sup>5</sup>	-	1.5 x 10 <sup>4</sup>	-
	N	1	2	2	1	3	1
Viable <i>Legionella</i> spp.	Mean	2.0 x 10 <sup>3</sup>	2.5 x 10 <sup>3</sup>	1.9 x 10 <sup>3</sup>	1.7 x 10 <sup>2</sup>	1.1 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>
	SD	-	2.3 x 10 <sup>3</sup>	-	-	1.5 x 10 <sup>2</sup>	-
	N	1	2	1	1	3	1
Total <i>L.pneumophila</i>	Mean	1.1 x 10 <sup>4</sup>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	2.2 x 10 <sup>5</sup>	2.0 x 10 <sup>3</sup>	3.8 x 10 <sup>2</sup>	4.8 x 10 <sup>2</sup>
	SD	-	1.3 x 10 <sup>5</sup>	2.4 x 10 <sup>5</sup>	-	3.3 x 10 <sup>2</sup>	-
	N	1	2	2	1	3	1
Viable <i>L.pneumophila</i>	Mean	1.1 x 10 <sup>3</sup>	9.8 x 10 <sup>2</sup>	6.8 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>	2.2 x 10 <sup>1</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup>
	SD	-	7.2 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-
	N	1	2	1	1	1	1

a: 只有 1 個陽性樣本，無法計算其 SD



Table C-7 Concentration of *Legionella* in wiper fluid and tap water, and the detection limit of *Legionella* spp. and *L. pneumophila* by qPCR is 4.60 cells/mL and 3.03 cells/mL<sup>a</sup>

			Total cells (cells/mL)		Viable cells (cells/mL)	
			<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i> <sup>a</sup>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>
Wiper fluid	Tank	Mean	4.4 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>	4.0 x 10 <sup>6</sup>	7.9 x 10 <sup>2</sup>
		SD	2.8 x 10 <sup>7</sup>	1.7 x 10 <sup>3</sup>	2.7x 10 <sup>7</sup>	1.2 x 10 <sup>3</sup>
		Range	3.8 x 10 <sup>1</sup> - 1.9 x 10 <sup>8</sup>	2.6 x 10 <sup>1</sup> - 7.6 x 10 <sup>3</sup>	4.9 x 10 <sup>0</sup> - 1.8 x 10 <sup>8</sup>	1.1 x 10 <sup>1</sup> - 4.0 x 10 <sup>3</sup>
		N	47	41	46	31
	Outlet	Mean	3.9 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>	3.0 x 10 <sup>6</sup>	5.3 x 10 <sup>2</sup>
		SD	2.1 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>3</sup>	2.1 x 10 <sup>7</sup>	8.0 x 10 <sup>2</sup>
		Range	3.2 x 10 <sup>2</sup> - 1.5 x 10 <sup>8</sup>	5.7 x 10 <sup>0</sup> - 5.1 x 10 <sup>3</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup> - 1.5 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>1</sup> - 2.9 x 10 <sup>3</sup>
		N	56	43	54	33
Tap water	Mean	1.9 x 10 <sup>2</sup>	7.3 x 10 <sup>1</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup>	1.6 x 10 <sup>1</sup>	
	SD	2.3x10 <sup>2</sup>	9.1 x 10 <sup>1</sup>	2.2 x 10 <sup>1</sup>	1.1 x 10 <sup>1</sup>	
	Range	4.4 x 10 <sup>1</sup> - 5.9 x 10 <sup>2</sup>	5.0 x 10 <sup>0</sup> - 2.3 x 10 <sup>2</sup>	1.3 x 10 <sup>0</sup> - 5.7 x 10 <sup>1</sup>	3.6 x 10 <sup>0</sup> - 2.5 x 10 <sup>1</sup>	
	N	5	5	5	3	

a: 此表僅取陽性樣本

Table C-8 Comparison of the water quality between tap water and wiper fluid samples<sup>a</sup>

	Tank				Outlet				Tap water				P value <sup>b</sup>
	N	Mean	SD	Range	N	Mean	SD	Range	N	Mean	SD	Range	
Free chlorine (mg/L)	36	0.2	0.2	0.04-1.0	31	0.1	0.1	0.05-0.7	5	0.3	0.2	0.07-0.52	0.26
Turbidity (NTU)	48	23.1	96.7	0.6-671	46	31.8	107.1	0.6-711	5	1.8	0.9	0.8-3.04	<b>0.02</b> <sup>**c</sup>
Hardness (mg/L)	44	49.7	29.9	15-135	44	56.5	46.6	3-250	5	25.2	11.2	10.0-37.0	0.20
pH	48	7	1.2	3.7-10.2	48	7	1.2	3.6-10	5	7.5	0.1	7.4-7.6	0.54
Conductivity (µS/cm)	46	383.8	381	2.4-1880	46	380.5	351.2	2.6-1882	5	87.8	5.8	80.7-96.6	<b>0.01</b> <sup>**</sup>
TDS (mg/L)	46	204.4	241.4	0.4-1216	46	203.7	232.9	0.4-1244	5	41.6	2.8	38.1-45.8	<b>0.01</b> <sup>**</sup>
DOC (ppm) <sup>e</sup>	48	3007.7	7348.9	0.7-43307	47	3511.6	7575.9	88.1-42886	0	ND	ND	ND	<b>0.01</b> <sup>**</sup>
HPC (CFU/mL)	44	1.1x10 <sup>7</sup>	6.2x10 <sup>7</sup>	50-4.1x10 <sup>8</sup>	47	1.4x10 <sup>6</sup>	3.7x10 <sup>6</sup>	50-2.5x10 <sup>7</sup>	5	4.4x10 <sup>3</sup>	9.7x10 <sup>3</sup>	10-2.2 x 10 <sup>4</sup>	<b>0.003</b> <sup>**</sup>

a:此表僅顯示陽性樣本,自由餘氯,濁度,硬度,DOC, HPC 的偵測下限各為 0.015mg/L, 0.01 NTU, 0.01 mg/L, 0.625 ppm, 50 cfu/mL

b:以 Kruskal-Wallis test 檢定 Tank、Outlet 和 Tap water 三組的水質因子是否有差異

c:\*\*代表 P<0.05

e: 5 件自來水中的 DOC 皆為陰性樣本 (偵測下限為 0.625 ppm)

## 附錄四 分析方法之 QAQC

### 1. 物化因子分析之 QAQC

使用直讀式儀器測量餘氯、濁度、硬度、pH、導電度、溫度和 TDS，量測前依據儀器說明書進行儀器校正及 QAQC，以建立直讀式儀器的可信度。

#### 1.1 直讀式儀器檢測水溫之可信度測試

於五種不同水溫的水樣，利用水銀式溫度計和直讀式儀器測得水溫之相對誤差為 1.1-6.4%，其相對誤差皆小於 15%，以此直讀式儀器量測環境水樣之水溫。

Table A Reliability test of direct-reading instruments for temperature

	水樣 (n=3)				
	A	B	C	D	E
水銀式溫度計 (°C)	46.4 ± 0.1	36.4 ± 0.1	29.3 ± 0.1	25.3 ± 0.1	15.1 ± 0.1
直讀式儀器 (°C) <sup>a</sup>	44.9 ± 0.1	36.0 ± 0.1	28.5 ± 0.1	24.5 ± 0.1	14.1 ± 0.1
相對誤差 (%)	3.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.2	6.4 ± 0.6

a: 直讀式儀器為可攜式多參數計 Sension 156 portable multiparameter meter (Hach Company, Loveland, Co., USA)

#### 1.2 直讀式儀器檢測硬度之可信度測試

取 50mL 的碳酸鈣溶液置於三角燒瓶內，加入 1 至 2 mL 緩衝溶液，使溶液之 pH 為 10.0 ± 0.1，並於 5 分鐘內依下述步驟完成滴定，加入 2 滴 Eriochrome Black T 指示劑溶液，慢慢加入 EDTA 滴定溶液，並同時攪拌之，直至淡紅色消失，正常的情況下，滴定終點時溶液呈藍色，計算碳酸鈣溶液的總硬度濃度。計算公式如下：

$$\text{總硬度 (mg/L)} = \frac{\text{EDTA 滴定體積} \times \text{每 mL EDTA 所對應之碳酸鈣重} \times 1000}{\text{水樣體積}}$$

以硬度的標準方法及硬度計量測 100 ppm 及 50 ppm 的碳酸鈣標準溶液的相對誤差分別為 6.66% 和 6.37%，相對誤差均小於 15%，故此硬度計之量測值可信，以此直讀式儀器量測環境水樣之硬度。

Table B Reliability test of direct-reading instruments for hardness

	碳酸鈣 100 ppm (n=3)	碳酸鈣 50 ppm (n=3)
標準方法 (mg/L) <sup>a</sup>	97.22 ± 2.01	45.78 ± 1.75
硬度計 (mg/L) <sup>b</sup>	103.67 ± 0.94	48.67 ± 1.25
相對誤差 (%)	6.66 ± 1.26	6.37 ± 1.51

a:標準方法為 NIEA W208.51A

b:硬度計為 Hardness meter (Hanna instrument, Inc., Woonsocket, RI, USA)

### 1.3 直讀式儀器檢測自由餘氯之可信度測試

配置取 10.0 mL 高錳酸鉀儲備溶液 (891 mg/L)，以蒸餾水進行稀釋，並配製五種濃度的高錳酸鉀檢量線溶液 (1.78 mg/L、0.89 mg/L、0.45 mg/L、0.22 mg/L、0.11 mg/L)，於 250 mL 三角燒瓶中，依次加入 5 mL 磷酸鹽緩衝溶液、5 mL DPD 呈色劑及不同濃度的高錳酸鉀溶液 100 mL 使均勻混合並呈色，立即以 FAS 溶液滴定至紅色消失，計算相當於氯之濃度 (mg/L)，接著將不同濃度的高錳酸鉀溶液依照直讀式測量方式進行量測。計算公式如下：

$$\text{氯之濃度} = \frac{\text{FAS 濃度 (M)} \times \text{FAS 體積 (mL)}}{100 \text{ (mL)}} \times \frac{158}{5} \times \frac{1}{0.891} \times 1000$$

以餘氯計及餘氯的標準方法檢測不同自由餘氯濃度之樣本 (0.11-1.78 mg/L)，而 5 種樣本所呈現的相對誤差範圍在 2.8-11.9%，所有數值均小於 15%，故此餘氯計之測值可信，並以此餘氯計分析環境水樣中的自由餘氯濃度。

Table C Reliability test of direct-reading instruments for free chlorine

	高錳酸鉀標準品 (n=3)				
	1.78 (mg/L)	0.89 (mg/L)	0.45 (mg/L)	0.22 (mg/L)	0.11 (mg/L)
標準方法 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.08	0.7 ± 0.16	0.3 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.14 ± 0.02
餘氯計 <sup>b</sup>	1.75 ± 0.02	0.66 ± 0.06	0.33 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.15 ± 0.02
相對誤差 (%)	4.25 ± 3.26	11.35 ± 6.45	11.44 ± 4.80	8.89 ± 7.37	3.29 ± 4.36

a:標準方法為 NIEA W408.51A

b:餘氯計為 Pocket colorimeter (Hach Company , Loveland , Co ., USA)

Table D QAQC for direct-reading meter

項目	分析儀器	QA/QC
餘氯	直讀式儀器/Pocket colorimeter , Hach Company	配置 5 種餘氯濃度 (0.09-2 mg/L)之標準品，比較標準方法 (環檢所，水中餘氯檢測方法-分光光度計法,NIEA W408.51A)與餘氯計之量測值，若相對誤差於 15%以內，則可接受此直讀式儀器的量測值
濁度	直讀式儀器/2100 P , Hach company	每次使用前以 formazin primary standard 利用 <0.1、20、100、800 NTU 標準品進行校正
硬度	直讀式儀器/ HI 93735 , Hanna company	以碳酸鈣與硫酸鎂配置標準品，比較標準方法 (環檢所，水中總硬度檢測方法-EDTA 滴定法, NIEA W208.51A)與硬度計之量測值，若相對誤差於 15%以內，則可接受此直讀式儀器的量測值
pH	直讀式儀器/ SENSION 156 ,	每次使用前利用 pH4、pH7、pH10 的標準液

	Hach company	進行校正
導電度、	直讀式儀器/ Sension 156，	每次使用前利用 1000 $\mu$ s/cm 之氯化鉀校正液
總溶解固體、	Hach company	進行校正
溫度	直讀式儀器/ Sension 156，	以溫度計及直讀式儀器量測 5 種不同溫度水
	Hach company	樣之水溫，比較兩種方法所測得水溫，若所得相對誤差介於 15%，則此直讀式儀器可用於水溫現場量測
溶解性有機碳	濕式氧化法 TOC 分析儀 /Aurora Model 1030， O.I. Analytical company	每次分析伴隨空白樣本、過濾空白樣本與檢量線 (1-10ppm)

## 2. 可培養性退伍軍人菌之培養法前處理測試

樣本於採樣後一天之內，進行培養法分析，且於採樣前將 BCYE 和 DGVP 各兩盤放置於排氣櫃內作為實驗室空白樣本，並與樣本置於相同的培養條件下進行培養，而空白樣本的分析結果皆無 *Legionella spp* 及 *L.pneumophila* 檢出。

### 2.1 培養法前處理細菌檢出率評估

為評估 8 種不同培養法前處理對於雜菌污染率的影響，於環境中隨機選取一輛車，採集其雨刷水樣 40mL，以 8200g 離心 10 分鐘後，去除上清液使其菌液濃縮回溶於 16 mL，震盪均勻 30 秒後分成 9 組每組各 2 mL，其中 8 組各進行 8 種不同的酸處理，第 9 組不進行酸處理作為對照組，而每組樣本於 BCYE 及 DGVP 兩種培養基各推 4 盤，各取 0.1 mL 進行培養法分析，將培養皿培養於 37 $^{\circ}$ C 下含有 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 7 天，7 天後計數其各盤的細菌菌落數以評估細菌檢出率，其菌落型態為非退伍軍人菌的菌落才會被納入計數，而退伍軍人菌菌落型態呈現微突的圓形，顏色為偏乳白色且中心有非常淡的藍色，將其菌落數的多寡

以”+”符號來區別，”+++”表示菌落 $\geq 200$  CFU，”++”菌落 30~199 CFU，”+”雜菌 1~29 CFU。

Table E different pretreatment in culture assay

編號	加入酸液	中和處理
1	1mL	不進行中和處理
2	1mL	加入 KOH 1.5mL
3	1mL	以無菌水進行多次離 (8200gx10min)，直到上清液 pH 值為 6-7
4	1mL	以 BYE buffer 進行多次離 (8200gx10min)，直到上清液 pH 值為 6-7
5	2mL	不進行中和處理
6	2mL	加入 KOH 2mL
7	2mL	以無菌水進行多次離 (8200gx10min)，直到上清液 pH 值為 6-7
8	2mL	以 BYE buffer 進行多次離 (8200gx10min)，直到上清液 pH 值為 6-7

## 2.2 培養法前處理退伍軍人菌回收率評估

環境樣本經由不同的培養法前處理後，其可培養性退伍軍人菌的回收率亦有所差異，為選擇最佳的前處理方式，於實驗室模擬配置高濃度 *L. pneumophila* 菌液，取 5mL 無菌水加入 *Legionella* 菌落 (ATCC33152)，利用分光光度計使其 OD 值在 0.2，菌液濃度約為  $1.91 \times 10^8$  cells/mL，並以無菌水進行 20 倍稀釋，震盪均勻後，分裝成 9 管而每管含有 2mL 的菌液，其中 8 管進行 8 種不同的前處理方式，另一管為不進行任何培養前處理作為對照組，經由不同前處理方式後，每組樣本各取 0.1 mL 於 BCYE 培養基各推 2 盤，將培養皿培養於 37°C 下含有 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 4 天，4 天後計數其各盤的菌落數並回推其濃度，回收

率則是以每組前處理得到的濃度除以控制組的濃度再乘上百分率；實驗共進行兩批次，並將兩次的回收率進行平均回收率的計算。

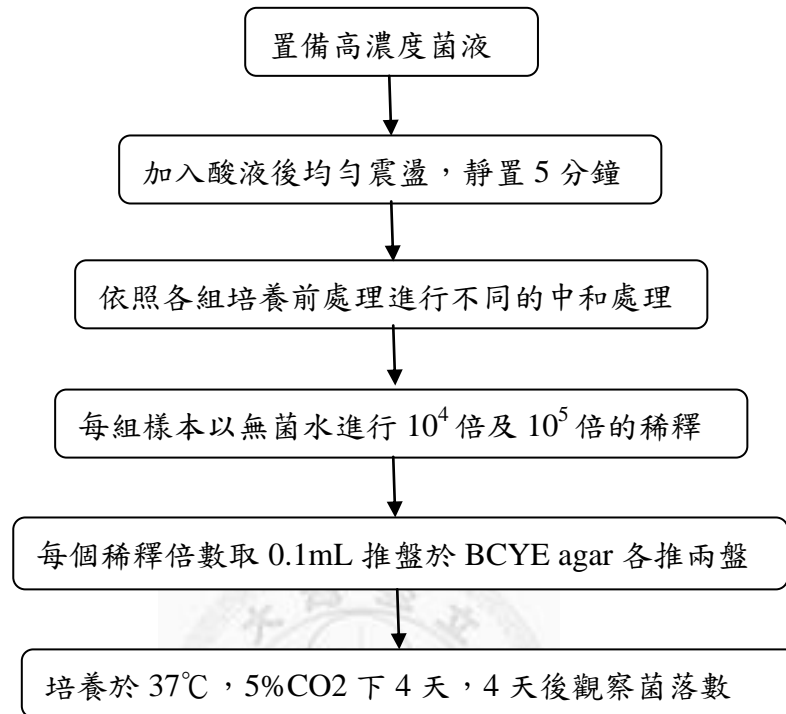


Figure I The experimental design for the *Legionella* recovery rate

為了解 8 種不同前處理方式對雜菌的抑制效果，從維修車廠中隨機選取一輛車輛，採集其兩刷水作來測試不同前處理的雜菌污染率，培養 7 天後進行菌落數的計數，將其菌落數的多寡以“+”符號來區別，“+++”表示菌落 $\geq 200$  CFU，“++”菌落 30~199 CFU 表示，“+”雜菌 1~29 CFU，並以雜菌污染盤數來計算污染率。在結果中發現 BCYE 的雜菌污染率介於 25% 到 100%，DGVP 的雜菌污染率則是介於 0% 到 100%，且各組 DGVP 雜菌污染率分別低於 BCYE 的雜菌污染率，由於 DGVP agar 中有添加抗生素成分，因此對於雜菌的抑制效果也較佳；另外在加入 1mL 酸液體積的組別中，其平均雜菌污染率分別高於加入 2mL 酸液體積的組別，組別 1 (50%) 大於組別 5 (38%)，組別 2 (63%) 大於組別 6 (13%)，組別 3 (50%) 大於組別 7 (38%)，顯示加酸液越多其污染率率約低；在這 8 種不同前處理方式



中，平均雜菌污染率最高的是組別 8 (75%)，最低則是組別 6 (13%)。

另外同時評估 8 種不同前處理的 *Legionella* 回收率，共進行兩次實驗，並將兩次實驗所得之回收率計算其平均回收率，其中有部分培養出的菌落因擴散以致無法計數，另外組別 7 的樣本在經過  $10^5$  倍稀釋後，菌落數少於 1 cfu，顯示其組別 7 的回收率最差，而以無菌水搭配多次離心，需要的離心次數較多才能使其 pH 回至中性，可能因此造成退伍軍人菌的回收率偏低。在加入酸液後不進行任何中和處理的組別 1 和 4，其 *Legionella* 回收率分別為 28.51% 和 27.43%，而組別 4 的回收率最高 (77.92%)，其次為編號 6 的前處理方式 (63.57%)，由於組別 4 是以退伍軍人菌的培養液 BYE broth 進行多次離心，因此對於退伍軍人菌的可培養性較佳，

綜合雜菌污染率及退伍軍人菌回收率的結果來看，雖然組別 4 的退伍軍人菌回收率最高 (77.92%)，且其平均雜菌污染率為 25%，但其樣本耗時較大，每分析 6 個樣本需要耗時 40 分鐘，使其在處理大量樣本需耗多時，因此最後選擇有次佳回收率 (63.57%) 且最低平均雜菌污染率 (13%) 的編號 6 前處理方式，加入 2 mL 的酸液 (HCl-KCl buffer) 後，震盪均勻靜置 5 分鐘，加入 2 mL KOH 進行中和反應，將其菌液推於 BCYE agar 和 DGVP agar 各兩盤，其前處理所需的時間也在合理範圍內，且可進行大量樣本的分析。

不進行濃縮及酸處理且推於 DGVP agar 的樣本分析，其偵測下限為 10 cfu/mL，而進行濃縮及酸處理且推於 BCYE 或是 DGVP agar 的樣本分析，其偵測下限則為 1.9 cfu/mL。

Table F Contamination rate of non-*Legionella* in different pretreatments (n=1)

組別 <sup>a</sup>	酸液 體積	中和處理	BCYE agar				雜菌汙	DGVP agar				雜菌汙	平均雜
			Plate 1 <sup>b</sup>	Plate 2	Plate 3	Plate 4	染率 (%) <sup>c</sup>	Plate 1	Plate 2	Plate 3	Plate 4	染率 (%)	菌汙染 率 (%)
1	1mL	不進行中和處理	++	++	++	+	100	-	-	-	-	0	50
2	1mL	加入 KOH 0.5mL	++	++	++	-	75	+	+	-	-	50	63
3	1mL	以無菌水搭配 8200gx10min 離心	++	++	++	++	100	-	-	-	-	0	50
4	1mL	以 BYE 搭配 8200gx10min 離心	++	++	-	-	50	-	-	-	-	0	25
5	2mL	不進行中和處理	+++	++	++	-	75	-	-	-	-	0	38
6	2mL	加入 KOH 0.5mL	+	-	-	-	25	-	-	-	-	0	13
7	2mL	以無菌水搭配 8200gx10min 離心	++	++	+	-	75	-	-	-	-	0	38
8	2mL	以 BYE 搭配 8200gx10min 離心	+++	+	+	+	100	+	+	-	-	50	75

a:於環境中隨機選取一兩刷水樣，將其均勻後分為 8 組進行雜菌檢出率測試

b:“+++”表示菌落 $\geq 200$  CFU，“++”菌落 30~199 CFU，“+”雜菌 1~29 CFU

c:雜菌汙染率=(雜菌菌落盤數/4)\*100

Table G Recovery rate of *Legionella* on BCYE agar in different pretreatments (n=2)

組別	酸液體積	中和處理	分析時間 <sup>a</sup>	實驗批次 <sup>b</sup>	稀釋倍率	plate1	plate 2	平均菌落數 (cfu)	濃度 (cfu/mL)	回收率 (%) <sup>d</sup>	平均回收率 (%)	SD	CV
1	1mL	不進行中和處理	6 分鐘	1	1x10 <sup>4</sup>	156	NA <sup>d</sup>	156	1.56x10 <sup>6</sup>	28.94	28.51	0.6	2.1
				2	1x10 <sup>5</sup>	62	61	61.5	6.15x10 <sup>6</sup>	28.08			
2	1mL	加入 KOH 0.5mL	7 分鐘	1	1x10 <sup>4</sup>	39	NA	39	3.90x10 <sup>5</sup>	7.24	15.15	11.2	73.9
				2	1x10 <sup>5</sup>	63	38	50.5	5.05x10 <sup>6</sup>	23.06			
3	1mL	以無菌水搭配 8200gx10min 離心	60 分鐘	1	1x10 <sup>5</sup>	44	55	52.5	5.25x10 <sup>6</sup>	23.97	23.97	-	-
				2	1x10 <sup>5</sup>	ND <sup>c</sup>	ND	- <sup>e</sup>	-	-			
4	1mL	以 BYE 搭配 8200gx10min 離心	40 分鐘	1	1x10 <sup>5</sup>	53	51	52	5.20x10 <sup>6</sup>	96.47	77.92	26.2	33.7
				2	1x10 <sup>5</sup>	133	127	130	1.30x10 <sup>7</sup>	59.36			
5	2mL	不進行中和處理	6 分鐘	1	1x10 <sup>4</sup>	177	156	166.5	1.67x10 <sup>6</sup>	30.89	27.43	4.9	17.8
				2	1x10 <sup>5</sup>	59	46	52.5	5.25x10 <sup>6</sup>	23.97			
6	2mL	加入 KOH 1mL	7 分鐘	1	1x10 <sup>5</sup>	31	NA	31	3.10x10 <sup>6</sup>	57.51	63.57	8.6	13.5
				2	1x10 <sup>5</sup>	159	146	152.5	1.53x10 <sup>7</sup>	69.63			
7	2mL	以無菌水搭配 8200gx10min 離心	60 分鐘	1	1x10 <sup>5</sup>	ND	ND	-	-	-	-	-	-
				2	1x10 <sup>5</sup>	ND	ND	-	-	-			
8	2mL	以 BYE 搭配 8200gx10min 離心	40 分鐘	1	1x10 <sup>5</sup>	48	35	41.5	4.15x10 <sup>6</sup>	76.99	60.19	23.8	39.5
				2	1x10 <sup>5</sup>	93	97	95	9.50x10 <sup>6</sup>	43.38			

a:每 6 個樣本所需的分析時間

b:第一次未處理樣本濃度為  $5.39 \times 10^6$  cfu/mL，第二次未處理樣本濃度  $2.19 \times 10^7$  cfu/mL

c:”NA”代表由於菌落擴散以致無法計數

d:”ND”代表未長出任何菌落

e:”-“代表無法進行公式計



### 3. qPCR performance 及 QA/QC

所有環境樣本於採樣當日運回實驗室後，於當日進行樣本後續處理步驟，隔日進行 DNA 萃取，並於 3 天內上機分析。

#### 3.1 qPCR 檢量線及放大曲線

*Legionella.spp* 利用 DNA 萃取技術將生長於 BCYE $\alpha$  agar 上之 *L.pneumophila* SG1 (ATCC33152) 萃取後，以吸光值 A260nm 定量，所測得之吸光值乘上 50 則為 DNA 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )，研究中配置標準品檢量線濃度範圍為 2.33 到  $2.33 \times 10^5$  cells/ $\mu\text{l}$  間。每批次樣本分析時皆同步進行檢量線偵測，且檢量線量測濃度範圍皆涵蓋當次環境樣本分析結果。本研究共進行 6 次 *Legionella.spp* 檢量線偵測，其 Amplification efficiency 範圍為 1.808-2.3， $R^2$  值皆為 0.98 以上，將 6 次檢量線結果進行合併後，重新利用公式  $\text{efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})}$  (Rasmussen et al. 2001) 推算公式計算其放大效率為 2.53， $R^2$  為 0.9985。每批次實驗中空白樣本 (NTC) 皆無檢出，顯示試劑未受污染。其偵測下限為 0.3 cells/mL。

使用 Mission Biotech 公司合成之 *L.pneumophila* 標準菌株，以偵測基因表現量 (copies/ng)  $3.1 \times 10^8$  copies/ng 為標準品，並進行標準品稀釋後，配置 *L.pneumophila* 標準檢量線濃度範圍為 3.1 到  $3.1 \times 10^6$  cells / $\mu\text{l}$  之間。每批次樣本分析時，將同步進行檢量線偵測且測量濃度範圍皆含蓋當次環境樣本分析濃度，並以當次檢量線結果為基準進行樣本濃度推算。本研究中 *L.pneumophila* 檢量線共進行 6 次測試，其放大效率 (Amplification efficiency) 範圍為 1.942~2.004，將 6 次檢量線所得結果進行合併後，利用公式推算為 1.994， $R^2$  為 0.999。研究中每批次 qPCR 分析時，皆備製一試劑空白樣本 (NTC)，確認分析中所使用試劑皆無污染，本研究結果所有空白樣本皆無檢出任何污染。其偵測下限為 1.75 cells/mL。

Table H Standard curve of *Legionella* spp. by real-time PCR

Standard DNA <sup>a</sup>	DNA conc (copies/ $\mu$ l)	Log cell copies <sup>b</sup> (log cells/ $\mu$ l)	n	Mean Ct	SD	CV (%)
1 ng/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>5</sup>	5.4	6	24.21	0.7	2.8
100 pg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>4</sup>	4.4	6	27.48	0.8	2.9
10 pg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>3</sup>	3.4	6	30.06	0.5	1.7
1 pg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>2</sup>	2.4	6	32.05	0.4	1.3
100 fg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>1</sup>	1.4	6	34.51	0.9	2.6
10 fg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>0</sup>	0.4	6	37.43	1.1	2.9
<b>Calibration Curve<sup>c</sup></b>		$y = -2.548x + 38.347$				
<b>R<sup>2</sup></b>		0.9955				
<b>Amplification efficiency<sup>d</sup></b>		2.47				

a: 10<sup>6</sup>ng/ $\mu$ l = 10<sup>3</sup>pg/ $\mu$ l = 1 fg/ $\mu$ l = 3.1  $\times$  10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ l

b: 1 copy = 1 cell

c: 以 Log cell copies (x 變項)和 Mean Ct (y 變項)計算其檢量線

d: Efficiency=10<sup>^</sup>(-1/slope)

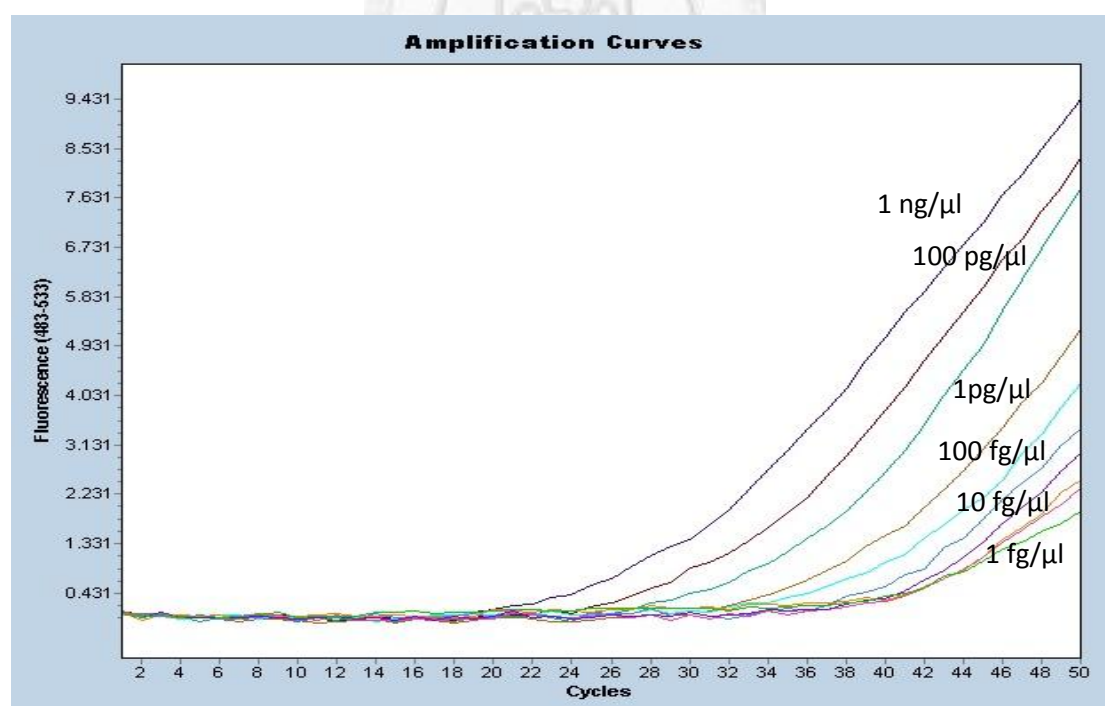


Figure II Amplification curve of *Legionella* spp. by real-time PCR

Table I Standard curve of *L.pneumophila* by real-time PCR

Standard DNA <sup>a</sup>	DNA conc (copies/ $\mu$ l)	Log cell copies <sup>b</sup> (log cells/ $\mu$ l)	n	Mean Ct	SD	CV (%)
10 pg/ $\mu$ l	3.10 x 10 <sup>6</sup>	6.49	6	16.26	0.33	2.04
1 pg/ $\mu$ l	3.10 x 10 <sup>5</sup>	5.49	6	19.43	0.36	1.85
100 fg/ $\mu$ l	3.10 x 10 <sup>4</sup>	4.49	6	22.81	0.60	2.65
10 fg/ $\mu$ l	3.10 x 10 <sup>3</sup>	3.49	6	26.22	0.44	1.67
1 fg/ $\mu$ l	3.10 x 10 <sup>2</sup>	2.49	6	29.47	0.52	1.75
0.1fg/ $\mu$ l	3.10 x 10 <sup>1</sup>	1.49	6	32.92	0.77	2.34
0.01fg/ $\mu$ l	3.10 x 10 <sup>0</sup>	0.49	6	35.93	0.77	2.15
<b>Calibration Curve<sup>c</sup></b>		$y = -3.3092x + 37.701$				
<b>R<sup>2</sup></b>		0.9998				
<b>Amplification efficiency<sup>d</sup></b>		2.005				

a: 1 fg/ $\mu$ l =  $3.1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ l

b: 1 copy = 1 cell

c: 以 Log cell copies (x 變項)和 Mean Ct (y 變項)計算其檢量線

d: Efficiency= $10^{(-1/\text{slope})}$

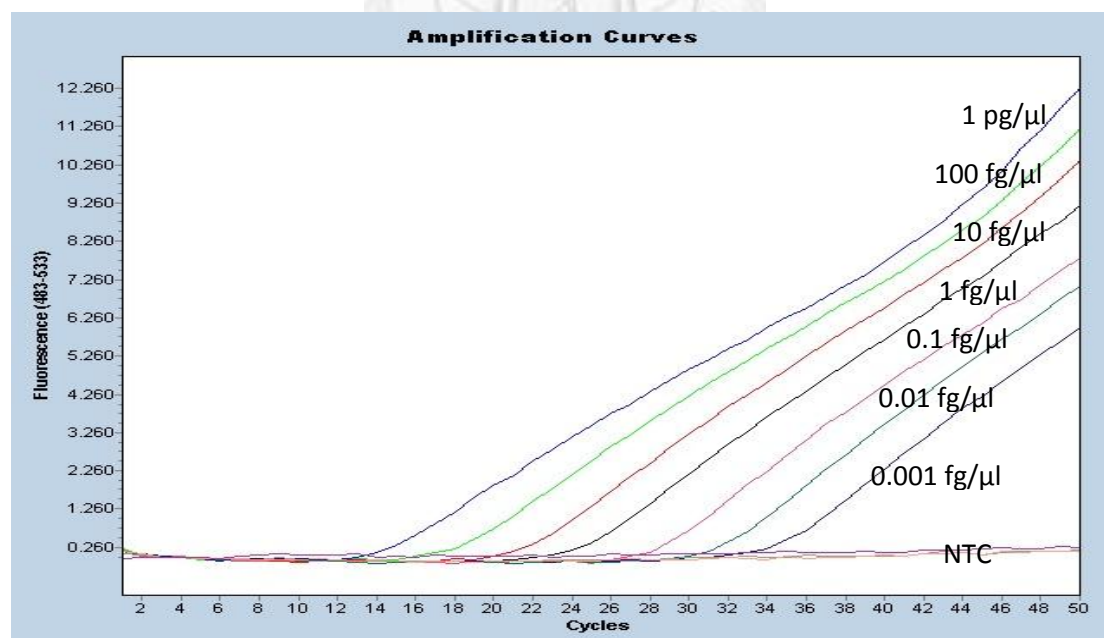


Figure III Amplification curve of *L.pneumophila* real-time by PCR

Table J Standard curve of Internal inhibitor control (IIC) by real-time PCR

Standard DNA <sup>a</sup>	DNA conc. (cell/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	n	Mean Ct	SD	CV (%)
1 ng/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>5</sup>	8	25.71	0.9	3.6
100 pg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>4</sup>	8	27.06	0.7	2.4
10pg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>3</sup>	8	28.36	0.6	2.0
1 pg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>2</sup>	8	29.06	0.5	1.6
100 fg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>1</sup>	8	29.64	0.3	1.1
10 fg/ $\mu$ l	2.33 x 10 <sup>0</sup>	8	29.98	0.4	1.3
<b>Mean</b>			28.30		
<b>SD</b>			1.64		
<b>Mean+SD<sup>c</sup></b>			29.94		

a: 10<sup>6</sup>ng/ $\mu$ l = 10<sup>3</sup>pg/ $\mu$ l = 1 fg/ $\mu$ l = 3.1 × 10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ l

b: 1 copy = 1 cell

c: 以 Mean+SD 為判定是否通過 IIC 測試的標準

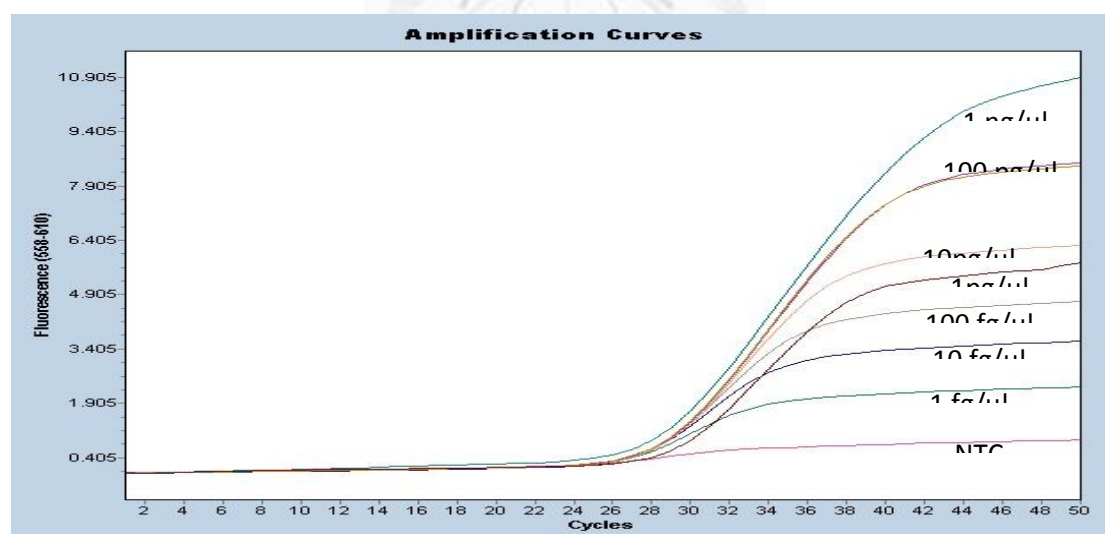


Figure IV Amplification curve of IIC by real-time PCR

本研究共進行 6 次 IIC 的檢量線偵測，CV% 範圍為 1.1~3.6%，平均 Mean+SD 為 29.94，若環境樣本的 IIC Ct 值小於 29.94 則通過 IIC 測試，未通過的樣本，則會進行下一倍稀釋倍數，直到通過 IIC 測試。



### 3.2 *L. pneumophila* real-time PCR 偵測下限改善測試

由於環境中的 *L. pneumophila* 濃度可能極低，造成在 real-time PCR 分析時會低於儀器分析的偵測下限，因此提高 PCR mixreagent 中的 DNA 含量，以減低樣本偽陰性的情形。在 PCR 試劑配置中，將 Mix 1 的試劑組合中 Target DNA 由 5  $\mu$ L 提高至 Mix 2 的 10  $\mu$ L，為使 Leg forward primer、Leg reverse primer 以及 Leg probe 在 PCR 反應試劑中的濃度不變，故須改變各試劑於 PCR mixreagent 中的體積，使其濃度皆維持在 0.3  $\mu$ M。在 *L. pneumophila* 檢量線濃度條件和升溫條件皆不改變下，評估其試劑組合的不同是否能夠改善期偵測下限；並將兩組試劑組合應用於環境樣本中，分析其環境樣本得到 Ct 值是否也跟著改善，以此測試來決定於 PCR mixreagent 中的 DNA 含量。

自環境中隨機選取 3 輛車輛採集 40mL 的雨刷水，3 份來自 3 輛車體的雨刷水將會依照雨刷水分析步驟進行前處理及 DNA 萃取；將 1 ng/ $\mu$ l 的標準品進行序列稀釋 (100 pg/ $\mu$ L~0.01 fg/ $\mu$ L)，依下列試劑與濃度比例配製兩組 PCR 混合物 (Mix1 和 Mix2)，分兩批次進行 *L. pneumophila* qPCR 的分析，於暗室中取 15  $\mu$ l 的 PCR mixreagent 於 96 孔盤中，再加入 10 $\mu$ l 或 5 $\mu$ l DNA 樣本或標準品，用光學薄膜封好後，再以 1,500 g 離心 2 分鐘，上機進行分析。

Table K The q-PCR mixreagent in detection limit test

試劑	Mix 1		Mix 2	
	體積 ( $\mu$ l)	濃度	體積 ( $\mu$ l)	濃度
<b>2<math>\times</math> probe master mix (Roche)</b>	10	x1	12.5	x1
<b>Leg_forward primer (10<math>\mu</math>M)</b>	0.6	0.3 nM	0.75	0.3 nM
<b>Leg_reverse primer (10<math>\mu</math>M)</b>	0.6	0.3 nM	0.75	0.3 nM
<b>Leg probe (10<math>\mu</math>M)</b>	0.6	0.3 nM	0.75	0.3 nM
<b>Target DNA</b>	5	-	10	-
<b>Sterile water</b>	3.2	-	0.25	-
<b>Total volume</b>	20		25	

在 PCR mix reagent 中，mix1 中的 Target DNA 體積為 5ul，而 mix2 中的 Target DNA 體積則是提高至 10ul，而 primer 和 probe 在兩種試劑中的濃度相同，以兩種試劑組合 (mix1 和 mix2) 進行檢量線分析，從結果可以發現 Target DNA 為 5ul 的 mix 1，其 0.01 fg/ul 濃度的 Ct 值大於 40，但在 Target DNA 為 10ul 的 mix 2，Ct 值為 38.07，且放大效率 (2.076) 和 R square 值 (0.9965) 皆在可接受範圍內。

Table L Two different reagent mixes for standard cure by real-time PCR

Standard DNA <sup>a</sup>	DNA conc (copies/μl) <sup>b</sup>	Log cell copies (log cells/μl)	Max 1 's Ct <sup>c</sup>	Max 2 's Ct <sup>c</sup>
10pg/ul	3.10 x 10 <sup>4</sup>	4.5	19.01	18.8
1 pg/ul	3.10 x 10 <sup>3</sup>	3.5	22.32	22.51
100 fg/ul	3.10 x 10 <sup>2</sup>	2.5	24.44	25.8
10 fg/ul	3.10 x 10 <sup>1</sup>	1.5	29.17	28.83
1 fg/ul	3.10 x 10 <sup>0</sup>	0.5	31.73	31.25
0.1 fg/ul	3.10 x 10 <sup>0</sup>	-0.5	35.55	35.06
0.01 fg/ul	3.10E-01	-1.5	ND	38.07
			Max 1	Max 2
	NTC		ND	ND
	Efficency		1.997	2.076
	Calibration Curve <sup>d</sup>		y = -3.3046x + 33.646	y = -3.1586x + 33.359
	R square		0.9929	0.9965

a: 10<sup>6</sup>ng/μl = 10<sup>3</sup>pg/μl = 1 fg/μl = 3.1 × 10<sup>2</sup> copies/μl

b: 1 copy = 1 cell

c: Max 1 的 Target DNA 為 5ul，Max 2 的 Target DNA 為 10ul

d: 以 Log cell copies (x 變項) 和 Mean Ct (y 變項) 計算其檢量線

自環境中隨機選取的三個雨刷水樣本，測式兩種不同 PCR mix reagent 配置的分析，在 Target DNA 為 5ul 的 mix 1 中，樣本 1 和樣本 2 的 Ct value 為大於 40，其環境濃度低於 PCR 分析的偵測下限，但在 Target DNA 體積為 10ul 的 mix2 中，則樣本 1 和樣本 2 則可測得其 Ct value 並回算其濃度，而樣本 3 在 mix1 和

mix2 所得到的濃度分別為  $1 \times 10^5$  和  $2.98 \times 10^5$  cells/mL，顯示改變 Target DNA 的體積確實能夠有效提升方法的偵測下限，並改善原本低於偵測下限的樣本能夠測得其 Ct value。

Table M Two different reagent mixes for environmental samples

Wind wiper fluid samples	Max 1 's		Max 2 's	
	Ct	Concentration (cells/L)	Ct	Concentration (cells/L)
1	ND	ND	39.57	$1.08 \times 10^3$
2	ND	ND	37.2	$6.08 \times 10^3$
3	33.64	$1 \times 10^5$	31.86	$2.98 \times 10^5$

a: ND 為 not detect，Ct 值大於 40

## 口試委員問題回覆

### 1. 林嘉明老師

提問內容	回覆
你認為這個研究最困難的部分在哪裡？	本研究為找出影響污染的顯著因子，嘗試過許多統計方法，加上資料收集未齊全且並非常態，因此對於統計方法的選用有很多限制。
如果要進一步再做相關的研究，會建議些什麼？	需要更完整的研究母群體，更多樣化的採樣對象及更嚴謹的研究架構，此部分於 discussion 中補充討論。(修正於討論)
本篇結果與他人文獻的重大差異為何？在存活率部分是否比其他研究高很多？	本研究的檢出率與其他研究相比高出許多，不論是有無添加兩刷精皆有較高的檢出率和檢出濃度，而存活率的部分無法比較。(修正於討論)
Outlet 比 tank 污染嚴重，你的推論是管路污染，而管路是適合退伍軍人菌增長的地方嗎？如何取 outlet 水樣呢？有無取樣時污染的可能性？可否解釋取樣過程，較能說服他人接受你的推論。	謝謝口委的建議，管路的材質及不常更換易使生物膜累積，而有污染的情況，直接用無菌離心管接取兩刷水出水口，曾進行空白樣本，其空白樣本為陰性結果。(修正於 4.1.3)
水質指標中，餘氯的角色是什麼？由本研究結果看來並無顯著影響，另外，在兩刷水和自來水中檢出的餘氯量為多少？目前台灣的自來水水質餘氯標準是多少？你的自來水數據是否相對偏	兩刷水的平均餘氯為 0.1-0.2 ppm，而自來水則測得 0.3，目前現行各廠出水餘氯控制在 0.5ppm 左右，本研究測得自來水之餘氯數值稍低，可能是樣本數較少所致，而雖然未發

<p>低？餘氯是否真的對退伍軍人菌沒有影響呢？</p>	<p>現在統計上達顯著相關，但並無法完全說明餘氯和退伍軍人菌的污染無關。</p>
<p>水質指標有附偵測下限，請確認結果中的檢測範圍是否有低於偵測下限的現象。此外，假如偵測數值小於偵測極限，統計時會如何處理？有幾個可替代的辦法，可選擇開根號或以 1/2 的方式代入數值。</p>	<p>謝謝口委的建議，已修正偵測下限的數值，檢視後發現無環測結果低於偵測下限的數據，在統計分析部分則以 1/2 偵測下限值代入進行統計分析。(修正於 table 21)</p>
<p>Discussion 與 Result 間的內文重覆敘述，Discussion 應加強比較自己與他人的結果差異、研究限制以及研究困難。</p>	<p>謝謝口委的建議，已修正 discussion 內容。(修正於討論)</p>
<p>結論也重複敘述 Result 的數據，通常會使用更肯定的語氣，有信心地講述發現和成就。</p>	<p>謝謝口委的建議，謝謝口委的建議，已針對結論內容進行修訂。(修訂於結論)</p>
<p>雙面頁印製的話，橫式的表頭排版要一致，注意需符合一般論文排版標準。</p>	<p>謝謝口委的建議，已統一修訂。</p>
<p>Table 內單位需再檢查，例如檢出率就不需單位。</p>	<p>謝謝口委的建議，已統一修訂。(修訂於 table 20)</p>
<p>圖文表並茂時，勿為了節省排版而將圖表壓在同一頁，不同內容或章節間的空間也應該有空間隔開，字體的一致性也要再檢查。</p>	<p>謝謝口委的建議，已統一修訂。</p>
<p>表格的中英文要有一致性，有些英文的表註明變成中文了，可考慮做修改。</p>	<p>謝謝口委的建議，已統一修訂。</p>

<p>統計分析中使用了三種不同的 <math>\alpha</math> 值但並未說明原因，請說明選擇理由。</p>	<p>謝謝口委的建議，當探討其兩者相關性時 <math>\alpha</math> value 設為 0.05，而當作為篩選變項進入多變項分析時 <math>\alpha</math> value 提高至 0.02，已於材料方法中補充說明。(修正於 4.7.2)</p>
--	---

### 1. 趙馨老師

<p>問卷調查中，未調查車主"使用雨刷水的頻率"的考量原因是什麼？而使用水刷水的頻率是否會影響到更新雨刷水的速率？</p>	<p>使用雨刷頻率會影響添加雨刷水的頻率，因此本研究未調查雨刷水的使用頻率。</p>
<p>表格和圖可擇一放入，不需重複，否則讀者會讀的較辛苦。</p>	<p>謝謝口委的建議，已將重覆圖表放入附錄。(修正於附錄)</p>
<p>中英文摘要內容需一致。</p>	<p>謝謝口委的建議，已修訂中英文摘要內容。(修正於摘要)</p>
<p>P34 在各採樣點收集水龍頭水樣做為 tap water 樣本的代表性如何？車主都會使用該採樣點的水進行雨刷水的添加嗎？</p>	<p>其自來水採樣點無法完全代表該車主雨刷水的添加來源，只能以少數樣本做為代表性的比較，已於討論中補充說明。(修正於討論)</p>
<p>採樣季節是否一致？溫度有無可能扮演影響的角色？是否車體溫度的不同是不受影響的？也許可試試看將採樣當日大氣溫度作為指標來進行探討。</p>	<p>謝謝口委的建議，本研究於 2-5 月間進行樣本收集，溫度可能會影響檢出結果，未來研究可將討論大氣溫度是否影響雨刷水中的檢測結果。</p>
<p>無母數分析時，有些分析適合將 tank 和</p>	<p>謝謝口委的建議，已修正統計方</p>

<p>outlet 進行 paired 再做統計(例如改用 wilcoxon-sign rank test 和 fisherman test)。</p>	<p>法。(修正於 5.2)</p>
<p>統計方法描述內文的第一第二段有些完全重複。</p>	<p>謝謝口委的建議，已刪除重複的文字部分。(修正於 4.7.2)</p>
<p>p.105 和 p.110 解釋了分析的 x 和 y 變項，但這些應在材料方法中敘述就好了，故 table 35~37 其實不需要放。</p>	<p>謝謝口委的建議，已將 table 35~37 及 table 39~41 移至附錄，並於材料方法中補充說明。(修正於 4.7.2)</p>
<p>p.50 問卷內容建議放於附錄，勿置於正文。</p>	<p>謝謝口委的建議，已將問卷移至附錄。(修正於附錄)</p>
<p>請問您為何選擇使用 GEE？將 tank 和 outlet 資料合併的意思是？且 GEE 在文中的敘述要對此部分多些補充說明。</p>	<p>謝謝口委的建議，由於全部納入 tank 和 outlet 的資料，作為重覆樣本，因而使用 GEE，以於材料方法補充說明。(修正於 4.7.2)</p>
<p>p.56 表格中的 sample size 變化，有 missing 部分須解釋為何沒有 data？</p>	<p>已將 missing 部分補入表中說明。(修正於 table 7)</p>
<p>Table 24 都是檢定與有無檢出的相關性，但為何有些使用 Simple Logistic Regression，而有些使用 Fisher Exact Test？考慮同一表格內一致性，應使用相同檢定方式。</p>	<p>謝謝口委的建議，統計方法已統一修正為 Simple Logistic Regression。(修正於 table 24 和 table 25)</p>
<p>p.89 和 p.109 添加的頻率究竟是添加越頻繁越好還是較差？</p>	<p>圖表及內容已修正，添加頻率越高其越不易檢出及檢出濃度越低。(修正於 figure 14 和 table 38)</p>

Table 26 中其導電度的 sample size 為何大於 59，因為有 tank 有些是 outlet 嗎？ sample size 為何前後不一致，請補充說明。	表中的統計分析納入全部 tank 和 outlet 的資料，樣本數部分將於材料方法補充說明。
p.105 中有兩個因子因為 VIF 大有共線性問題而未放入 model，但為何不放入一個？	此兩個因子在單變項分析皆未顯著，故不放入多變項分析，已於材料方法中補充說明。
p.115 為什麼 GEE 分析和其他多及單變項分析的 $\beta$ 值差異很大？連續變項應前後均以常態分布為假設，應皆修正為常態分布。	謝謝口委的建議，已修正此部分的數據。(修正於 Table 45)
何謂”補 missing data” 是使用平均嗎？ 如果是以”.”設定，是為大家有共識的統計手法，不需特別告知如何補缺失值。	謝謝口委的建議，已刪除此部分的內容。(修正於 4.7.1)
在 O/T 比值部分，為什麼去除極端值後再算平均值？	已補上未去除極端值之數據。(修正於 5.2.3.1)

### 3.張靜文老師

在數據的處理上還需要多花些時間，將今日無法解釋或者口委老師們提到的部分，尤其 OR 值部分處理完成。	謝謝口委的建議。
樣本數的部分讓讀者覺得蠻困難的，也是要修改的部分。	謝謝口委的建議，已補充說明樣本數的部分。
結論和討論部分放了太多結果須再做調整。	謝謝口委的建議，已將重覆圖表放入附錄。(修正於附錄)