

國立臺灣大學公共衛生學院
職業醫學與工業衛生研究所
碩士論文



Graduate Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene
College of Public Health
National Taiwan University
Master Thesis

金黃色葡萄球菌空氣採樣方法效能評估-暴露艙研究

A Chamber Study on Assessment of Sampling
Techniques for Airborne *Staphylococcus aureus*

王儷瑾

Wang, Li-Jin

指導教授：張靜文、黃耀輝 博士

Advisor: Chang, Ching-Wen, Ph.D.、Hwang, Yaw-Huei, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

金黃色葡萄球菌空氣採樣方法效能評估-暴露艙研究

A Chamber Study on Assessment of Sampling Techniques for
Airborne Staphylococcus aureus

本論文係王儷瑾君 (R00841018) 在國立臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所完成之碩士學位論文，於民國 102 年 7 月 31 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張靜文

(簽名)

(指導教授)

吳佩芝

晉耀輝

余國賓

National Taiwan University
Thesis Verification Form

We hereby recommend that thesis submitted by Li-Jin Wang entitled
A Chamber Study on Assessment of Sampling Techniques for
Airborne *Staphylococcus aureus* be accepted as fulfilling the thesis
requirement for the degree of Master of Science in the Institute of
Occupational Medicine and Industrial Hygiene.

Thesis committee:

Ching-Wen Chang

吳佩芝 Pei-chih Wu

Yan-Hui Huang

Kuo-Pei Yu

Date 7/3/2013(mm/dd/yyyy)



致謝

兩年前，當我選擇從醫技跨領域至公衛領域學習的那一刻，這一條瞭解自我與提升自信的路便已展開，而研究生涯中體識最深的，是時間管理與如何運用邏輯思考與有限資源解決問題。這本論文即是在面臨大大小小的荊棘中仰賴許多老師、學長姐與同學們的支持與幫助才得以完成的，它是甜美的、並且對我而言深具意義的成果。

首先，感謝我的指導老師張靜文老師，我一直對您在我進入碩班時說過的一句話印象深刻，您說，只要你想解決問題，你會找到一個方法，而一旦你想逃避問題，你會找到一個藉口。兩年來，在幾次面臨研究瓶頸而感到沮喪時，我就會用這句話來提醒我自己，最讓我感動的是，老師一直都很用心看待我所面臨的困難，教我如何透過有邏輯的思考分析問題，並設計實驗找到可能的解答。在老師身上始終如一的認真與嚴謹，是我在往後的日子裡，期許自己能夠學習並堅持的。

感謝口試委員黃耀輝老師、余國賓老師與吳佩芝老師，謝謝你們給予本研究許多精闢的建議，使我的論文可以更完整的呈現，也謝謝你們對於研究的鼓勵與肯定。此外，當我面臨氣膠系統與採樣實驗等問題時，感謝黃盛修老師的建議與幫忙，並協助我完成實驗。也謝謝曾俊傑老師與趙馨老師提供生物氣膠採樣器讓我進行採樣，因此能順利完成研究。

感謝氣膠實驗室的學長與同學們，在系統出現問題時，即時提供幫助與寶貴建議。感謝芳禎學姐不厭其煩的教我如何進行採樣效能評估實驗，也謝謝星儀學姊告訴我關於金黃色葡萄球菌之培養方法。感謝念慈學姊、忠龍學長與雅婷學姊在我最徬徨的碩一時，給與我很多的鼓勵與建議。感謝實驗室好夥伴佳蓉與楚雲，總是能互相加油打氣，實驗室所幸有妳們兩位的把關，使我在做實驗時無後顧之憂。感謝學弟妹們與同屆的好朋友們，讓我的碩士生活增添許多美好的回憶。

最後，感謝我的家人，因為你們一直以來的鼓勵與包容，才有如今的我，無論面對多少挫折，你們都是我最大的後盾，希望我的努力能讓你們感到欣慰與驕傲！

王儷瑾 謹致於

國立台灣大學職業醫學與工業衛生研究所

中華民國 102 年 7 月



中文摘要

研究指出金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 可透過直接接觸或空氣傳播造成人員感染，為醫院院內感染常見之病原菌；此外，在畜養家禽場所、紡織、麵粉與食品相關工作環境中亦發現 *Staphylococcus* spp. 為空氣中主要菌種之一。抗藥性金黃色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) 之出現，亦導致在治療此細菌感染時變得更為棘手。

有效監測此致病菌在職業場所空氣中是否存在及其濃度值，將有助於釐清勞工暴露風險；然何種採樣策略最能有效捕集空氣中的 *S. aureus*，目前仍不清楚。有鑑於此，本研究透過建置生物氣膠產生系統，評估不同採樣介質與生物氣膠採樣器針對 *S. aureus* 之採樣效能。在評估 *S. aureus* 培養基部分，係以 Andersen 1-STG 搭配 TSA、MSA、BPA、CSA 與 CSM 進行 6 分鐘之空氣採樣，而後以培養法分析並計算不同培養基之效能指標 (R)。結果顯示，非選擇性培養基 TSA 之 R 值顯著高於四類選擇性培養基之 R 值 (Kruskal Wallis test, $p = 0.0092$, Scheffé test, $p < 0.05$)；而選擇性培養基中，以 MSA 採樣效能最高，然與其他三種選擇性培養基並未達統計上顯著差異。而後以 Andersen 1-STG 搭配具較佳空氣採樣效能之 TSA 與 MSA 評估時間因子對採樣效能之影響，結果顯示兩種培養基均於採樣 3 分鐘時具有最佳之採樣效能 (Kruskal Wallis test, TSA: $p = 0.008$, MSA: $p = 0.0447$, Scheffé test, $p < 0.05$)，而 6 至 60 分鐘採樣所得之 R 值彼此間則未達統計顯著差異。

評估 *S. aureus* 收集液部分，係以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture、PBS 與 DW 進行 3 分鐘之採樣。結果顯示，Tween 80 mixture 之 R 值皆顯著高於其他兩種收集液之 R 值，而 PBS 之 R 值顯著高於 DW 之 R 值 (Kruskal Wallis test, $p = 0.0002$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)；接著以 AGI-30 與 BioSampler 搭配三種收集液進行 3、6 與 15 分鐘空氣採樣以評估流失率。結果顯示，採樣時間自 3 分鐘延長至 15 分鐘時，流失率顯著上升 (Kruskal Wallis test, $p < 0.0001$, Scheffé test, $p < 0.05$)。而後評估 AGI-30 與 BioSampler 搭配具較佳空氣採樣效能之 Tween 80 mixture 與 PBS，於不同採樣時間下之採樣效能，結果顯示採樣器搭配 Tween 80 mixture 採樣 6 分鐘時之採樣效能顯著高於 3 分鐘之 R 值 (Kruskal Wallis test, AGI-30: $p = 0.0013$, BioSampler: $p = 0.0018$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)，大於 15 分鐘之 R 值即隨採樣時間延長而下降；採樣器搭配 PBS 採樣時，其採樣效能於不同採樣時間下彼

此間皆具顯著差異 (Kruskal Wallis test, AGI-30 : $p = 0.0014$, BioSampler : $p = 0.0011$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$), 且隨採樣時間增加而下降。

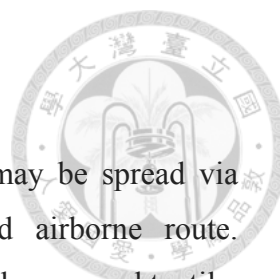
將所有採樣方法之 R 值進行統計檢定, 結果顯示, BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能最佳, 顯著高於其他五種採樣方法; BioSampler 搭配 PBS 以及 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 次之, 而 AGI-30 搭配 PBS 之採樣效能最差 (Kruskal Wallis test, $p < 0.0001$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)。

本研究進一步根據文獻與本實驗結果, 對 *S. aureus* 實場空氣採樣策略之建議, 依採樣目的分為兩項:

1. 若欲進行環境空氣中 *S. aureus* 濃度監測, 本研究建議使用 BioSampler 搭配 PBS 進行前測。於經消毒控制之環境, 建議前測時間為 30 與 60 分鐘, 後續將收集液濃縮至 0.2mL 進行培養法分析。於無特定 *S. aureus* 污染源或未經消毒控制之環境, 建議前測時間為 6-60 分鐘, 其中採樣時間為 6-15 分鐘時, 可將收集液濃縮至 0.2 mL; 若採樣時間延長為 30-60 分鐘時, 可將收集液濃縮至 0.2 mL、0.5mL 或 1mL 後再進行培養法分析。此外, 於空氣中 *S. aureus* 濃度較高之環境採樣時, 則建議前測時間為 3-60 分鐘, 收集液可濃縮至 1mL 或直接經適當稀釋以培養法分析。
2. 若欲進行空氣中可培養性 *S. aureus* 之定性分析, 此時建議可以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 進行 30-60 分鐘之空氣採樣, 採樣中並定時補充收集液。

本研究成果預期未來可應用於實際職場環境中, 用以有效監測空氣中致病菌, 協助決策者採取適當的控制策略, 減少院內感染並保護勞工健康。

關鍵字: 生物氣膠、金黃色葡萄球菌、採樣效能、生物氣膠採樣器

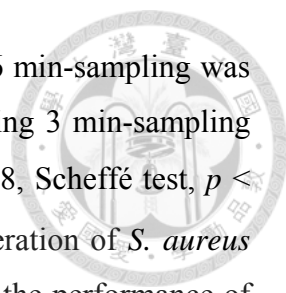


Abstract

Previous studies have indicated that *Staphylococcus aureus* may be spread via respirable-sized aerosols and transmitted by direct contact and airborne route. *Staphylococcus* spp. are revealed as the dominant bacteria in poultry houses and textile, flourmill and food-related factories. In particular, the emergence of methicillin-resistant *S. aureus* results in difficult-to-treat infections. However, limited research has been conducted to investigate the sampling methods for airborne *S. aureus*. To deal with this issue, a bioaerosol generation system was developed to evaluate the performance of various sampling methods for collecting airborne *S. aureus*.

Sampling performance (R) of five agar plates for recovering airborne *S. aureus* was determined by 6-min sampling using Andersen 1-STG followed by the culture assay. Results showed that the non-selective agar TSA performed significantly better than the other four selective agar types (Kruskal Wallis test, $p = 0.0092$, Scheffé test, $p < 0.05$). For the four selective agar media, the MSA performed best but at no statistical significance compared with the other three. The effects of sampling time on the performance of Andersen 1-STG for collecting airborne *S. aureus* onto TSA and MSA showed that the R with 3 min-sampling was significantly greater than those of the other sampling times regardless of agar type (Kruskal Wallis test, TSA : $p = 0.008$, MSA : $p = 0.0447$, Scheffé test, $p < 0.05$), while there was no statistical difference in sampling performance among the sampling times between 6 and 60 min.

In addition, the sampling performance of three collection liquid types for recovering airborne *S. aureus* was determined by 3-min sampling using AGI-30 followed by the same assay. It shows that no matter what kind of agar arranged, Tween 80 mixture performed significantly better than the other two liquid types (Kruskal Wallis test, $p = 0.0002$, Scheffé test, $p < 0.05$), PBS the second. As for the loss rate of three collection liquid types for sampling airborne *S. aureus* was determined by 3, 6 and 15-min sampling using AGI-30 and BioSampler. Results indicated that there was no statistical difference in loss rate among the three liquid types. Also, liquid-based samplers showed no statistical significance compared with each other. When sampling time was extended from 3min to 15 min, however, there was a statistical increasing in loss rate (Kruskal Wallis test, $p < 0.0001$, Scheffé test, $p < 0.05$). Moreover, the effects of sampling time on the performance of AGI-30 and BioSampler for recovering



airborne *S. aureus* with Tween 80 mixture showed that the R with 6 min-sampling was significantly greater than those of the other sampling times, including 3 min-sampling (Kruskal Wallis test, AGI-30 : $p = 0.0013$, BioSampler : $p = 0.0018$, Scheffé test, $p < 0.05$). The aforementioned results may be attributable to the proliferation of *S. aureus* collected in Tween 80 mixture. For the effects of sampling time on the performance of AGI-30 and BioSampler arranged with PBS, results showed that the performance of them decreased significantly with prolonged sampling time (Kruskal Wallis test, AGI-30 : $p = 0.0014$, BioSampler : $p = 0.0011$, Scheffé test, $p < 0.05$).

In summary, the performance of BioSampler arranged with Tween 80 mixture was the best. BioSampler and AGI-30 arranged with PBS and Tween 80 mixture, respectively, the second. Further, AGI-30 arranged with PBS gave the worst performance (Kruskal Wallis test, $p < 0.0001$, Scheffé test, $p < 0.05$).

The advisable sampling strategy depends on the purpose of sampling. To monitor the concentration of airborne *S. aureus* in environment, the sampling carried out for 15 min with BioSampler equipped with PBS is recommended. Furthermore, to perform the qualitative analysis of airborne *S. aureus*, the sampling conducted for 30-60 min with BioSampler equipped with Tween 80 mixture is applicable. It is expected that this study will be able to be applied in occupational and residential environment to effectively identify and monitor concentration of airborne *S. aureus*.

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

目錄

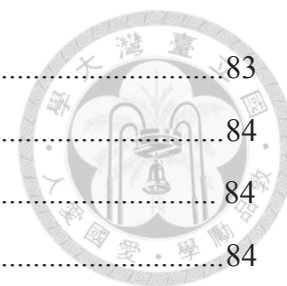


致謝	I
中文摘要	II
Abstract	IV
目錄	VI
圖目錄	X
表目錄	XI
第一章 前言	1
1.1 研究背景	1
第二章 文獻回顧	3
2.1 金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	3
2.1.1 生物特性	3
2.1.2 健康影響	3
2.1.3 空氣傳播	4
2.1.4 空氣採樣研究	5
2.2 金黃色葡萄球菌之固體培養基	10
2.2.1 非選擇性培養基	10
2.2.2 選擇性培養基	10
2.2.3 金黃色葡萄球菌鑑定	14
2.2.3.1 鑑定準確度	14
2.2.3.2 選擇性培養基相關鑑定研究	15
2.3 生物氣膠收集液	18
2.4 生物氣膠採樣器	19
2.4.1 以固體培養基為採樣介質之採樣器 (Agar-based samplers)	19
2.4.1.1 安德森單階式生物氣膠採樣器 (Andersen one stage sampler, Andersen 1-STG)	19
2.4.1.2 時間因子對採樣效能之影響	19
2.4.2 以液體為採樣介質之採樣器 (Liquid-based samplers)	20
2.4.2.1 液體衝擊瓶 (All glass impinger, AGI-30) 與離心式採樣器	

(BioSampler)	20
2.4.2.2 時間因子對採樣效能之影響	20
第三章 研究目的	21
第四章 研究架構	23
第五章 材料與方法	25
5.1 實驗菌株	25
5.2 實驗用培養基、培養液與採樣收集液	25
5.2.1 Tryptic Soy Agar (TSA)	25
5.2.2 Mannitol Salt Agar (MSA)	25
5.2.3 Baird-Parker Agar (BPA)	26
5.2.4 CHROMagar Staph aureus Agar (CSA)	26
5.2.5 Chapman Stone Medium (CSM)	26
5.2.6 Luria-Bertani (LB) broth	26
5.2.7 Phosphate buffer saline (PBS)	27
5.2.8 Tween 80 混合液	27
5.3 置備與建立金黃色葡萄球菌檢量線	27
5.4 金黃色葡萄球菌菌液濃度之調整	28
5.5 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統	28
5.6 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統之穩定性測試	31
5.6.1 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器之流量	31
5.6.2 暴露艙相對濕度	31
5.6.3 生物氣膠產生器 (Nebulizer) 中 <i>S. aureus</i> 菌液濃度	31
5.6.4 暴露艙生物氣膠濃度	32
5.6.5 採樣效能指標 (R)	32
5.6.6 <i>S. aureus</i> 粒徑分佈	33
5.7 空白試驗	33
5.8 <i>S. aureus</i> 空氣採樣方法之效能評估	34
5.8.1 以固體培養基為採樣介質之採樣器 (Agar-based samplers) 效能評估	34
5.8.1.1 選擇 <i>S. aureus</i> 最佳空氣採樣培養基	34

5.8.1.2 採樣時間對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響	37
5.8.2 以收集液為採樣介質之採樣器 (Liquid-based samplers) 效能評估	38
5.8.2.1 評估 <i>S. aureus</i> 空氣採樣收集液之採樣效能	38
5.8.2.2 評估 <i>S. aureus</i> 空氣採樣收集液之流失率	41
5.8.2.3 時間因子對 AGI-30 與 Biosampler 採樣效能之影響	42
5.9 資料分析	43
第六章 結果	45
6.1 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統之穩定性測試	45
6.1.1 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器流量	45
6.1.2 暴露艙相對濕度	47
6.1.3 生物氣膠產生器中 <i>S. aureus</i> 菌液濃度	49
6.1.4 暴露艙空氣中 <i>S. aureus</i> 濃度	50
6.1.5 採樣效能指標 (R)	51
6.1.6 <i>S. aureus</i> 粒徑分佈	54
6.2 以固體培養基為採樣介質之採樣器效能評估	56
6.2.1 選定最佳空氣採樣培養基	56
6.2.2 時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響	58
6.3 以收集液為採樣介質之採樣器 (Liquid-based samplers) 效能評估	64
6.3.1 評估 <i>S. aureus</i> 空氣採樣收集液之採樣效能	64
6.3.2 評估 <i>S. aureus</i> 空氣採樣收集液之流失率	66
6.3.3 時間因子對 AGI-30 採樣效能之影響	69
6.3.4 時間因子對 BioSampler 採樣效能之影響	75
6.3.5 以收集液為採樣介質之生物氣膠採樣方法比較	79
6.3.5.1 BioSampler 與 AGI-30 之採樣效能	79
6.3.5.2 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能	79
6.3.5.3 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能	79
6.4 Andersen 1-STG、AGI-30 與 BioSampler 之採樣效能比較	81
第七章 討論	83

7.1 <i>S. aureus</i> 氣膠產生系統	83
7.2 以固體培養基為採樣介質之採樣方法效能評估	84
7.2.1 選定 <i>S. aureus</i> 最佳空氣採樣培養基	84
7.2.1.1 非選擇性與選擇性培養基	84
7.2.1.2 選擇性培養基	85
7.2.1.3 鑑定流程	88
7.2.2 時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響	93
7.3 以收集液為採樣介質之採樣方法效能評估	97
7.3.1 評估 <i>S. aureus</i> 空氣採樣收集液之採樣效能	97
7.3.1.1 Tween 80 mixture	97
7.3.1.2 PBS 與 DW	101
7.3.2 時間因子對 AGI-30 與 BioSampler 採樣效能之影響	102
7.3.2.1 採樣時間	102
7.3.2.2 AGI-30 與 BioSampler 之採樣效能差異	105
7.3.2.3 菌種之採樣效能差異	106
7.4 Andersen 1-STG、AGI-30 與 BioSampler	108
7.5 採樣策略	110
7.6 研究限制	115
7.7 結論與建議	116
附錄	119
參考文獻	137



圖目錄



圖 1 研究流程	24
圖 2 <i>S. aureus</i> 生物氣膠產生系統	30
圖 3 選擇 <i>S. aureus</i> 最佳空氣採樣培養基之實驗流程	35
圖 4 探討時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能的影響之實驗流程	38
圖 5 <i>S. aureus</i> 採樣收集液與採樣時間之效能評估	40
圖 6 <i>S. aureus</i> 空氣採樣收集液之流失率測試	42
圖 7 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器 (Nebulizer) 之流量值	46
圖 8 暴露艙中相對濕度測試值	48
圖 9 Nebulizer 中 <i>S. aureus</i> 菌液濃度	49
圖 10 暴露艙空氣中 <i>S. aureus</i> 濃度	50
圖 11 Nebulizer 中 <i>S. aureus</i> 菌液濃度與暴露艙空氣中 <i>S. aureus</i> 濃度隨系統運作下降趨勢圖	52
圖 12 採樣效能指標 (R)	53
圖 13 以氣動粒徑分析儀 (Aerodynamic particle sizer) 所得暴露艙中高濃度 <i>S. aureus</i> 之粒徑分佈	54
圖 14 以氣動粒徑分析儀 (Aerodynamic particle sizer) 所得暴露艙中中濃度 <i>S. aureus</i> 之粒徑分佈	55
圖 15 以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 採樣 60 分鐘後，將培養基置於 37°C 下培養 18 至 48 小時之 <i>S. aureus</i> 菌落圖片	63
圖 16 以 AGI-30 搭配 PBS 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer (C_{susp}) 與暴露艙空氣中細菌濃度 (C_{air})	69
圖 17 以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer (C_{susp}) 與暴露艙空氣中細菌濃度 (C_{air})	70

表目錄

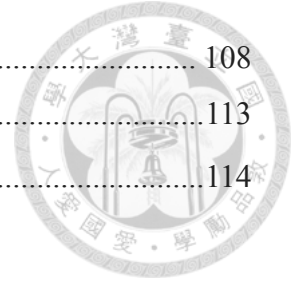


表 1 <i>Staphylococcus aureus</i> 與 MRSA 之空氣採樣研究	8
表 2 <i>Staphylococcus aureus</i> 之空氣採樣培養基	12
表 3 <i>Staphylococcus aureus</i> 鑑定相關名詞	14
表 4 <i>Staphylococcus aureus</i> 之生化測試	17
表 5 生物氣膠收集液	18
表 6 五種 <i>S. aureus</i> 培養基之空氣採樣效能 (R) 與統計檢定結果	57
表 7 TSA 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)	60
表 8 MSA 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)	61
表 9 TSA 與 MSA 之採樣效能 (R) 統計檢定	62
表 10 三種收集液之空氣採樣效能 (R) 與統計檢定結果	65
表 11 BioSampler 與 AGI-30 搭配三種收集液於採樣時間 3、6 與 15 分鐘下之液體 流失率	67
表 12 不同收集液與採樣時間之液體流失率統計檢定	68
表 13 BioSampler 與 AGI-30 之液體流失率統計檢定	68
表 14 AGI-30 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)	72
表 15 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)	74
表 16 BioSampler 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)	76
表 17 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能 (R) ...	78
表 18 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能 (R) 統計 檢定	80
表 19 Andersen 1-STG、BioSampler 與 AGI-30 之採樣效能 (R) 統計檢定	82
表 20 選擇性培養基之比較	88
表 21 <i>S. aureus</i> 鑑定流程比較	92
表 22 MRSA 鑑定流程比較	92
表 23 採樣效能評估指標	96
表 24 細菌活性與可培養性評估指標	103
表 25 採樣效能評估指標	107
表 26 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於 15-60 分鐘採樣時間下之不同菌種採樣效能	

..... 108

表 27 *S. aureus* 或 MRSA 於不同環境空氣中之濃度 113

表 28 BioSampler 於不同採樣時間下所得菌落數之推估 114



第一章 前言



1.1 研究背景

Staphylococcus aureus (金黃色葡萄球菌) 為院內感染常見之病原菌，可由帶原者的手部、痰液或鼻腔分泌物等散佈至環境中，污染醫護人員手部、醫療照護儀器或病房設備等，再透過直接接觸或空氣傳播造成院內感染 (Beggs 2003)。此外，愈來愈多研究指出 *S. aureus* 於空氣傳播的可能性，在醫院病房或手術室等環境空氣中存在之 *S. aureus*，人體吸入後可能造成肺囊性纖維化 (Cystic fibrosis, CF) (Ferroni et al. 2008)。

根據疾管局 2009 年台灣院內感染監視系統 (Taiwan Nosocomial Infections Surveillance System, TNIS) 資料顯示 (李聰明 et al. 2011)，醫學中心加護病房醫療照護相關感染常見菌株中，不同感染部位的合計菌株數 (單一感染部位分離相同菌株以 1 次計算，分離不同種類菌株則分次計算) 以 *S. aureus* 為第 7 名。而針對區域醫院加護病房，不同感染部位的合計菌株數 (單一感染部位分離相同菌株以 1 次計算，分離不同種類菌株則分次計算) 以 *S. aureus* 為第 6 名。而長期以來由於醫療院所抗生素的大量使用，也導致細菌產生抗藥性，抗藥性金黃色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 可對 Methicillin 產生抗藥性，美國於 2005 年統計有 40-70% *S. aureus* 之院內感染病例是由 MRSA 造成 (Zetola et al. 2005)，細菌抗藥性日趨嚴重之問題造成 *S. aureus* 與相關感染治療上日益困難。

有鑑於 *S. aureus* 院內感染的比率相當高、且其抗藥性問題及空氣傳播可能性亦被證實，如何進行感染風險評估，有效監測這些致病菌在環境空氣中是否存在及其濃度值，以協助釐清感染源，進一步採取適當的隔離措施與醫療處置，將有助於減少院內感染的發生、降低醫療資源的浪費、維護空氣品質及人類健康。

有效監控空氣中病原菌濃度的具體作法之一，即是進行空氣採樣，再透過適當的分析定量生物氣膠濃度。過去針對 *S. aureus* 進行空氣採樣的研究，使用過的生物氣膠採樣器包括 Andersen one-stage viable sampler 與 AGI-30 (Schulz et al. 2011) 等，然這些研究大多未針對採樣方法進行效能評估。此外，BioSampler 亦是常見的生物氣膠採樣器 (Kim et al. 2007)，但目前尚未有針對 *S. aureus* 的空氣採樣文獻或採樣方法效能進行詳細的評估研究。不同生物氣膠採樣器的設計差異使其需搭配不同類型的採樣介質，隨著採樣環境及欲捕集的生物性質的不同，會以不同的

採樣時間進行空氣採樣，而何種採樣策略最能有效捕集空氣中的 *S. aureus*，使其能確實呈現空氣中的細菌濃度，目前仍不清楚。因此本研究在實驗室建置生物氣膠產生系統，評估不同採樣器在不同設定條件下對 *S. aureus* 之採樣效能，期能找出最佳採樣策略於所研究之病原菌。



第二章 文獻回顧



2.1 金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)


2.1.1 生物特性

金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*) 為一種兼性厭氧的革蘭氏陽性球菌，在顯微鏡下排列成葡萄串狀，因此命名為葡萄球菌屬 (*Staphylococci*)，且此菌於 1884 年被成功分離並培養在固態培養基上時，發現會產生金黃色色素，所以被稱為金黃色葡萄球菌。其直徑為 0.5-1 μm ，不產芽孢，無鞭毛，大多數無莢膜，且對熱 (45°C)、乾燥有耐受性。*S. aureus* 在濃度達 10% 的食鹽肉湯中也能生存，因此可以使用高鹽分之選擇培養基將該菌分離出來。*S. aureus* 常見於皮膚表面、上呼吸道黏膜及腸道，一般情形下是附著在人的皮膚及黏膜的正常菌群。當宿主免疫力低落時，細菌容易經由傷口黏膜或侵入性醫療裝置 (如呼吸器或導尿管) 進入身體內部造成伺機性感染。1961 年，英國首先發現抗藥性金黃色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)，MRSA 會對 penicillins 與 cephalosporins 有抗藥性，易造成後續治療相關感染上的困難，至今已是最常見的院內感染病原菌之一 (Enright et al. 2002)。

2.1.2 健康影響

金黃色葡萄球菌一般最常聚集於鼻腔黏膜，在皮膚有傷口、免疫力低下、環境衛生條件較差或個人衛生習慣不佳時，皆可能透過手部接觸或空氣傳播造成感染，例如醫護人員照護帶原 *S. aureus* 之病患或操作 *S. aureus* 污染之醫療器械後未清潔雙手，即去照護其他病患，便可能導致病患感染 *S. aureus*，其為院內感染常見致病菌之一。暴露於 *S. aureus* 主要的感染症狀為肺囊性纖維化 (Cystic fibrosis, CF)，使呼吸道及肺部長期反覆的感染，導致肺功能異常，呼吸困難，為主要致死原因，其併發症為汗腺、消化道、內分泌腺等黏液分泌功能異常及性器官發育問題 (Ferroni et al. 2008)。除導致呼吸系統疾病外，不同菌型之 *S. aureus*，還會引起皮膚感染、傷口發炎、骨髓炎、肺炎及菌血症等，此菌亦為最常見引起食物中毒的病原菌之一，人類食入受 *S. aureus* 污染之食物，可引發腹痛、腹瀉或嘔吐等腸胃症狀 (Le Loir et al. 2003)。

S. aureus 除存在於醫療院所外，於環境衛生條件較差之農業相關工作環境也可發現 *Staphylococcus* spp.，2010 年 Awad 等人以 AGI-30 於麵粉廠、食品工業、



禽舍與紡織工業進行空氣採樣，發現分別有 11.72%、9.52%、13.56%與 8.00%之空氣樣本檢出，研究顯示 *Staphylococcus* spp. 為這些工作環境中主要存在菌種之一，且這些作業場所之員工會持續暴露於約 10^4 CFU/m³ 之細菌濃度之下，可能導致呼吸系統相關疾病 (Awad et al. 2010)。另外，2008 年 Moodley 等人以鼻腔拭子與問卷調查時常接觸動物皮膚之獸醫鼻腔中帶原 MRSA 之情形，結果發現獸醫相較於不常實際接觸動物皮膚之實習學生，有較高比例帶原 MRSA (獸醫：3.9%，實習學生：0.7%)，顯示獸醫具有較高風險帶原 MRSA (Moodley et al. 2008)。

2.1.3 空氣傳播

金黃色葡萄球菌是皮膚正常菌群，人體最常帶原 *S. aureus* 的部位為鼻腔黏膜，且諸多文獻指出此細菌可經由直接接觸或空氣傳播 (Beggs 2003, Noble 1975, Rutala et al. 1983, Shiomori et al. 2002)。1975年Noble以狹縫式採樣器 (Slit sampler) 進行空氣採樣，樣本經過培養與鑑定後，發現所採集到帶有 *S. aureus* 之微粒大小約 4至25 μ m，這與人類皮膚鱗狀上皮之大小十分接近，作者由此推測大多數空氣中之 *S. aureus* 存在於皮膚鱗狀上皮中，透過人類每日釋放約 3×10^8 個皮膚碎屑散布於空氣中。此外，當帶原者換穿衣物或醫護人員整理床單時，更易將帶有 *S. aureus* 之皮膚鱗狀上皮細胞散佈至空氣中；因此該研究推論，當帶有 *S. aureus* 之皮膚鱗狀上皮碎屑散佈至空氣中時，若 *S. aureus* 經人類呼吸停留於鼻腔黏膜中，*S. aureus* 易於潮濕溫暖之環境繁殖增生，而當帶原者手部接觸過鼻腔黏膜後，停留於皮膚上之 *S. aureus* 會再次隨著皮膚碎屑散佈至空氣中 (Noble 1975)。

1983年Rutala等人在爆發MRSA院內感染之燒燙傷病房，以Andersen two-stage air sampler與Rodac plates進行為期十週之院內感染調查，收集了2700個環境空氣及表面樣本採樣，結果在16%之空氣樣本、31%之病房距地面較高處物體 (例如病房書櫃頂部) 表面採樣樣本與40%病房地面採樣樣本中檢出MRSA，作者研判由於病房中較高處物體為醫護人或病患較少接觸到之區域，因此在這些區域之MRSA陽性檢出結果較可能與MRSA經空氣傳播有關，而非經由手部接觸造成該區域之汙染 (Rutala et al. 1983)。2002年Shiomori等人以Andersen six-stage air sampler於醫院病房進行空氣採樣，發現空氣中帶有MRSA之微粒能以小於4 μ m之大小散佈於空氣中，由於此種微粒可進入下呼吸道，並進而引發肺部感染之可能 (Shiomori et al. 2002)。2003年Beggs指出任何接觸傳播引起的感染，都可能因為空氣中的病原菌

落在物體表面，再經由手部接觸引起感染，因此不能忽視*S. aureus*空氣傳播的可能性 (Beggs 2003)。



2.1.4 空氣採樣研究

過去針對*S. aureus*之空氣採樣研究 (表 1)，曾使用Andersen sampler搭配不同培養基，於一般住家 (Perez et al. 2011, Gandara et al. 2006)、醫療院所 (Hsiao et al. 2011, Shiomori et al. 2002, Huang et al. 2013, Mirzaii et al. 2012)、家禽舍 (Zhong et al. 2009) 或實驗室 (Hsiao et al. 2011) 進行不同時間之空氣採樣。於一般住家環境中進行*S. aureus*空氣採樣之研究，包括了2011年Perez等人以Andersen one stage sampler (Andersen 1-STG) 搭配Nutrient Agar (NA) 進行3分鐘之空氣採樣 (Perez et al. 2011)，以及2006年Gandara等人以Andersen 2-STG搭配Tryptic Soy Agar (TSA)，於一般住家環境進行10與15分鐘之空氣採樣 (Gandara et al. 2006)。上述兩者之研究目的皆欲了解一般住家環境空氣中非抗藥性與具抗藥性之*S. aureus*的分佈情形。

至於在醫療院所進行之*S. aureus*空氣採樣研究，則包含了2012年Hsiao等人以Andersen 1-STG搭配CHROMagar staph aureus (CSA) 於醫學中心候診區、小兒病房與呼吸照護病房等處進行之7分鐘空氣採樣，以了解於實際環境中使用CSA時，其鑑定空氣中*S. aureus*之敏感性與特異性 (Hsiao et al. 2011)；此外，2002年Shiomori等人於MRSA帶原病患病房中，以Andersen 6-STG搭配MSO agar進行10分鐘之空氣採樣，以探討醫護人員整理病床前、整理病床時與整理病床後，MRSA於病房空氣中的濃度與其氣膠粒徑之大小 (Shiomori et al. 2002)。2013年Huang等人研究指出空氣中*S. aureus*在訪客進入加護病房 (ICU) 後，濃度和檢出率有上升現象 (Huang et al. 2013)。另，2012年Mirzaii等人以抹拭與空氣樣本確認ICU地面與空氣中細菌分布情形，結果顯示空氣中*S. aureus*平均濃度為 $12.1 \pm 8.11 \text{ CFU/m}^3$ ，且*S. aureus*污染濃度較高處為呼吸儀器與床架 (Mirzaii et al. 2012)。於醫療院所進行空氣採樣研究，除了使用Andersen sampler外，尚包括MAS-100 sampler。2009年Gehanno等人使用MAS-100 sampler搭配Chromogenic medium，於醫院病房進行10分鐘之空氣採樣，以評估MRSA帶原病患所住病房空氣中之MRSA濃度 (Gehanno et al. 2009)。

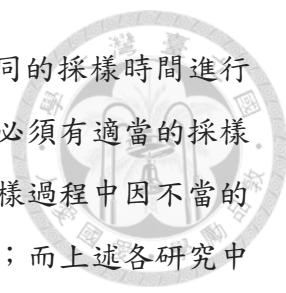
於家禽舍進行*S. aureus*空氣採樣之研究，則包括了2009年Zhong等人以Andersen 6-STG搭配Baird-Park agarose (BPA)，於雞舍進行1至5分鐘之空氣採樣，



目的係以 *S. aureus* 為該環境空氣中微生物分佈之指標細菌，以觀察雞舍室內外空氣中微生物之分佈 (Zhong et al. 2009)。2011年Schulz等人則使用AGI-30搭配磷酸緩衝液 (glycerol-phosphate buffer)，於家禽養殖場進行30與90分鐘之空氣採樣，此研究目的為以葡萄球菌為指標細菌，探討通風之養殖場其空氣中微生物分佈與擴散情形 (Schulz et al. 2011)。2012年Schulz等人亦以AGI-30搭配PBS於豬舍中採樣，調查豬舍中MRSA分布之情形。其分別自每季挑選一天於豬舍鼻腔採樣，並距豬舍遠近不同之迎風處或順風處地面採集抹拭與空氣樣本，結果顯示在夏季所有來源之樣本檢出率皆高，且豬舍內外樣本之MRSA菌種相同，亦即MRSA確實存在豬舍內且會藉由空氣傳播至豬舍外，此現象於夏季時更為明顯 (Schulz et al. 2012)。此外，2012年Friese等人以AGI-30與IOM (Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler) 於豬舍進行30與150分鐘之空氣採樣，並取豬隻皮膚樣本、鼻腔抹拭樣本與豬舍地面抹拭樣本，以確認豬舍中MRSA之分布情形，結果顯示AGI-30較IOM採樣結果有更高的檢出率，且MRSA菌種大多為t011與t034 (Friese et al. 2012)。2013年Friese等人亦以相同空氣採樣方式於雞舍進行空氣採樣，以調查雞舍中MRSA分布之情形，分別採取雞隻鼻腔抹拭樣本、雞舍地面抹拭樣本與雞舍內外之空氣樣本，結果顯示在雞隻身上、雞舍內地面與雞舍內外空氣中皆存在同菌種之MRSA，亦即MRSA不只在雞舍內傳播，亦會散佈至雞舍外 (Friese et al. 2013)。

除探究工作場所空氣中 *S. aureus* 之暴露情形外，也曾出現有限之 *S. aureus* 空氣採樣方法效能評估研究。2012年Hsiao等人發表的研究中，曾使用濾匣式採樣器 (Cassette) 於實驗室和醫院分別進行60分鐘之空氣採樣，並與Andersen 1-STG進行採樣效能比較，結果顯示Andersen 1-STG有較佳的採樣效能 (Hsiao et al. 2011)。除進行現場採樣瞭解 *S. aureus* 暴露現況或採樣效能外，2012年Hsiao等人的研究也曾於實驗室內建置生物氣膠產生系統，透過產生空氣懸浮之 *S. aureus* 以評估Andersen 1-STG搭配不同採樣介質時之 *S. aureus* 回收率，並與Cassette之採樣效能進行比較。結果發現，Andersen 1-STG搭配Luria-Bertani (LB) broth之採樣回收率高於CSA；且相較於Cassette，其對 *S. aureus* 有較佳的回收率。後者現象推測可能與Cassette於採樣過程中使微生物受到之衝擊力及乾燥有關 (Hsiao et al. 2011)。

綜觀上述研究可發現，在調查作業現場空氣中 *S. aureus* 暴露時，各研究常各



自選用不同的採樣器搭配選擇性或非選擇性之培養基，並以不同的採樣時間進行各自的空氣採樣。然若要確實呈現環境空氣中 *S. aureus* 濃度，必須有適當的採樣策略以有效捕集空氣中之 *S. aureus*，避免或降低 *S. aureus* 在採樣過程中因不當的採樣方法所造成的損失，導致研究者低估環境中 *S. aureus* 濃度；而上述各研究中所使用之不同採樣器、採樣介質與採樣時間等即是影響微生物捕集效率之重要因子。因此，若能針對這三項因子進行審慎評估，藉以釐清捕集空氣中 *S. aureus* 之最佳採樣條件，可藉此擬定適當採樣策略以有效捕集該病原菌。然目前的研究中，除了 2012 年 Hsiao 等人研究曾針對 Andersen 1-STG 與 Cassette 兩種採樣器之採樣效能進行比較外 (Hsiao et al. 2011)，其他文獻則鮮少對 *S. aureus* 空氣採樣方法進行詳細的效能評估。此外，雖然於過去 *S. aureus* 空氣採樣文獻中，並未使用改善了氣膠化現象之 BioSampler (Willeke et al.1998) 與可攜式個人採樣器 (Institute of Occupational Medicine personal inhalable air sampler, IOM) (Wang et al. 2001)，然此二種採樣器亦為常見之生物氣膠採樣設備，其是否更有利於捕集 *S. aureus*，亦需要進一步評估加以釐清。

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



採樣器	採樣時間	採樣介質	偵測上下限 (CFU/m ³)	採樣地點	Ref.
Andersen 1-STG	3 min	Nutrient Agar	430 / 29 5 / 1 (MRSA)	一般住家	Perez et al. 2011
Andersen 1-STG	7 min	CHROMagar staph aureus CMRSA (For MRSA)	8 / 2.5 7.4 / 1.7	醫學中心候診區、小兒病房 與呼吸照護病房	Hsiao et al. 2011
Andersen 1-STG	2 min	TSA	4.42±11.84 / 0.88±3.9	加護病房	Huang et al. 2013
Andersen 1-STG	10 min	TSA	13.47±9.42 / 5.86±4.09	加護病房	Mirzaii et al.2012
Andersen 2-STG	10 min、15 min	Tryptic Soy Agar	74.79 / 0.59	一般住家	Gandara et al. 2006
Andersen 6-STG	1-5 min	Baird-Park agarose	137 / 3	雞舍	Zhong et al. 2009
Andersen 6-STG	10 min	MSO agar (For MRSA)	116.0±43.7 / 0.7	醫院	Shiomori et al. 2002

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



採樣器	採樣時間	採樣介質	偵測上下限 (CFU/m ³)	採樣地點	Ref.
MAS-100	10min	Chromogenic medium	40 / 0.5	老人照護、小兒病房與呼吸 照護病房	Gehanno et al. 2009
AGI-30	30min、90min	Glycerol- phosphate buffer	ND (Not detected)	雞舍	Schulz et al. 2011
AGI-30	30 min	PBS	2.3×10 ⁴ /19 (MRSA)	家禽舍	Friese et al. 2013
IOM	150 min	Polycarbonate filter	7.4×10 ³ /89 (MRSA)		
AGI-30	-	PBS	3619 / 2	豬舍	Schulz et al. 2012
AGI-30	30 min	PBS	257 (MRSA)	豬舍	Friese et al. 2012
IOM	150 min	Polycarbonate filter	802 (MRSA)		
Nuclepore filter	60 min	Polycarbonate membrane	4.6 / 2.2 2.8 / 0.6 (MRSA)	醫學中心中候診區、小兒病 房與呼吸照護病房	Hsiao et al. 2011



2.2 金黃色葡萄球菌之固體培養基

2.2.1 非選擇性培養基

非選擇性培養基 (non-selective medium)，為一種對微生物沒有選擇性抑制之培養基，營養成分齊全。2006 年 Gandara 等人曾以 Andersen 2-STG 搭配 Tryptic Soy Agar (TSA)，於一般住家進行 10 與 15 分鐘之空氣中 *S. aureus* 採樣 (其後續鑑定流程如表 2 所示)，目的在於了解 *S. aureus* 與 MRSA 在一般住家室內外空氣中的細菌量 (Gandara et al. 2006)。2012 年 Mirzaii 等人以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 於 ICU 行 10 分鐘之空氣採樣 (其後續鑑定流程如表 2 所示)，以偵測 ICU 空氣中 *S. aureus* 之濃度與分布狀況 (Mirzaii et al. 2012)。此外，2013 年 Huang 等人亦以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 於 ICU 進行 2 分鐘之空氣採樣 (其後續鑑定流程如表 2 所示)，以了解訪客進入 ICU 前後，空氣中 *S. aureus* 之濃度變化情形 (Huang et al. 2013)。由於 TSA 含有可提供胺基酸或氮源之豐富有機物質，加上不含任何抑菌物質，因此可培養大多數挑剔性 (fastidious) 或非挑剔性 (non-fastidious) 微生物，長久以來被廣泛使用於各種微生物培養實驗。然其不含抑菌物質之特點，同時亦會造成 TSA 於環境採樣時，出現過多雜菌干擾之現象。TSA 本身呈淡黃半透明，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培養 *S. aureus* 18 小時以上，培養基上即會出現黃色菌落。

2.2.2 選擇性培養基

選擇性培養基 (selective medium) 為一種於培養基內加入特定抑菌物質，使某些微生物生長受抑制，而特定微生物穩定生長之培養基，因而有利於特定微生物之分離。其抑菌因子包含：特殊營養成份、培養條件 (如培養溫度與 pH 值等)、化學藥劑 (如高濃度鹽份) 或抗生素。過去 *S. aureus* 之空氣採樣研究，曾使用之選擇性培養基包括：Mannitol Salt Agar (MSA) (Schulz et al. 2011)、Baird-Parker agar (BPA) (Zhong et al. 2009)、CHROMagar staph aureus (CSA) (Hsiao et al. 2011) 與 Chapman Stone Medium (CSM) (Gandara et al. 2006, Perez et al. 2011)。

2011 年 Schulz 等人以 AGI-30 搭配 glycerol-phosphate buffer 於雞舍進行 30 與 90 分鐘之採樣，後續培養時即以 MSA 作為初步分離 *S. aureus* 之選擇性培養基 (Schulz et al. 2011)。MSA 含有 7.5% 之高濃度鹽類，可抑制 Staphylococci 以外之其他細菌的生長。且其含有醣類甘露醇 (mannitol)，*S. aureus* 醱酵甘露醇後之代謝物，其酸性會使培養基中之 pH 指示劑-酚紅 (phenol red) 轉變為黃色，於其菌落周圍形成黃色環，

而大多數非致病性葡萄球菌無法發酵甘露醇，於MSA上菌落較小，外觀呈粉色或與MSA相同顏色（紅色）。由於MSA含有酚紅，因此未培養*S. aureus*前培養基呈現紅色，若於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培養*S. aureus* 18小時以上，培養基上即會出現金黃色菌落。

BPA曾於2009年為Zhong等人用於Andersen 6-STG內，在雞舍進行1至5分鐘之*S. aureus*空氣採樣，目的為以*S. aureus*作為該環境空氣中微生物分佈之指標細菌，以觀察雞舍室內外空氣中微生物之分佈 (Zhong et al. 2009)。BPA成分中之鋰鹽 (Lithium) 與亞碲酸鹽 (Tellurite)，可抑制*Staphylococcus* spp.以外之雜菌生長，且因葡萄球菌可將Tellurite還原成Telluride，其反應產物會使菌落呈現黑色。BPA所添加之蛋黃液 (Egg yolk)，使培養基外觀呈現不透明之淡黃色，若於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培養*S. aureus*於BPA 18小時以上，可觀察到菌落周圍出現不透明之暈環，此為*S. aureus*之lecithinase分解蛋黃液中lecithin所造成。

2012年Hsiao等人曾以Andersen 1-STG搭配CSA於醫學中心候診區、小兒病房與呼吸照護病房等處，進行7分鐘之*S. aureus*空氣採樣，以了解使用CSA於實際環境中進行空氣採樣後，對於空氣中*S. aureus*之鑑定敏感性與特異性 (Hsiao et al. 2011)。CSA為一產色性培養基，其特殊產色原 (Chromogen) 被*S. aureus*之特定酵素代謝後，會使*S. aureus*形成淡紫色菌落。此外，CSA中添加之抑菌物質可抑制革蘭氏陰性、真菌以及其他非*S. aureus*之革蘭氏陽性球菌，因此非*S. aureus*之細菌除無法代謝Chromogen外，亦可能被CSA中所含抑菌物質所抑制，而達到篩選出*S. aureus*之目的。CSA於 37°C 下培養*S. aureus* 18小時以上，即可觀察到淡紫色菌落。

CSM則是透過高鹽分 (5.5%) 篩選出*S. aureus*之培養基。2006年Gandara等人以Andersen 2-STG搭配TSA，於一般住家環境進行10與15分鐘之*S. aureus*空氣採樣，接著將TSA於 35°C 下培養24至48小時後，再將培養出來之菌落接種至CSM，進行後續生化測試以鑑定出*S. aureus* (Gandara et al. 2006)。另外，2011年Perez等人亦以Andersen 1-STG搭配Nutrient agar (NA) 進行3分鐘之*S. aureus*空氣採樣，接著將NA置於 36°C 下培養48小時，再將培養出來之菌落接種至CSM，其培養出來之菌落再進行後續生化鑑定 (Perez et al. 2011) (後續鑑定流程如表 2所示)，以上兩次研究目的皆為了解一般住家環境空氣中非抗藥性與具抗藥性之*S. aureus*的分佈情形。CSM培養基本身呈半透明之琥珀色，成份中含有甘露醇 (mannitol)，*S. aureus*可發酵mannitol後產酸。CSM於 30°C 下培養*S. aureus* 18至48小時後，可觀察到黃色菌落。



表 2 *Staphylococcus aureus*之空氣採樣培養基

採樣器	培養介質	鑑定流程	觀察上下限值或檢出率	Ref.
Andersen 1-STG	Nutrient Agar	48hr at 36°C → Chapman Stone Medium → 48hr at 36°C → NA → 48hr at 36°C → Coagulase plasma test → Antibiotic Susceptibility Test → 48 hr at 36°C	<i>S. aureus</i> /Total Bacteria = 98% MRSA/Total Bacteria = 56%	Perez et al. 2011
	CHROMagar staph aureus	20-24hr at 37°C → Gram stain → Hemolysis test → 24hr 37°C → Catalase test → Slide coagulase test → real time PCR (<i>nuc</i>) → Antibiotic Susceptibility Test	SA : 8 (CFU/m ³)	Hsiao et al. 2011
Andersen 2-STG	Tryptic Soy Agar	24-48hr at 35°C → Chapman Stone Medium → 48hr at 35°C → Coagulase test → Antibiotic Susceptibility Test → 48 hr at 35°C	<i>S. aureus</i> /Heterotrophic organisms (%) = 37.33	Gandara et al. 2006
Andersen 6-STG	Baird-Parker agarose	24hr at 37°C → KOH reaction → 24hr at 37°C in BPA → API 20 Steph	SA : 137 (CFU/m ³)	Zhong et al. 2009
AGI-30	Glycerol-phosphate buffer	MSA → 24-48hr at 36°C → blood agar basis plates 24-36hr at 36°C → Gram stain → Morphology → Motility → Catalase test → Oxidase test → Lysostaphin susceptibility → Clumping factor test → 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR	-	Schulz et al. 2011

表 2 *Staphylococcus aureus*之空氣採樣培養基 (續)

採樣器	培養介質	鑑定流程	觀察上下限值或檢出率	Ref.
Andersen 1-STG	TSA	Gram stain→catalase test→tube coagulase test→Dnase test→ fermentation of mannitol→PCR (<i>femA</i>)	3.1-14.2%	Mirzaii et al.2012
Andersen 1-STG	TSA	GEN III Biolog method	5-15%	Huang et al. 2013





2.2.3 金黃色葡萄球菌鑑定

2.2.3.1 鑑定準確度

前述流程係針對空氣樣本中之 *S. aureus* 進行菌種鑑定。對於檢測流程之鑑定能力之評估，結果常以兩種方式呈現，亦即鑑定方法之準確度（敏感性與特異性）與其方法於某一群體之預測值（陽性預測值與陰性預測值）（表 3）

表 3 *Staphylococcus aureus* 鑑定相關名詞

	<i>S. aureus</i> or MRSA	Non- <i>S. aureus</i> or non-MRSA	Total
Positive result (+)	a	c	a+c
Negative result (-)	b	d	b+d
Total	a+b	c+d	a+b+c+d

(1) *S. aureus* or MRSA：由鑑定方法確認為 *S. aureus* 或 MRSA 菌種之菌落數目

(2) Non-*S. aureus* or non-MRSA：由鑑定方法確認為非 *S. aureus* 或 MRSA 菌種之菌落數目

(3) Positive result (+)：測試結果呈陽性反應之菌落數目

(4) Negative result (-)：測試結果呈陰性反應之菌落數目

(5) 敏感性 (Sensitivity) = $a / a + b$

(6) 特異性 (Specificity) = $d / c + d$

(7) 陽性預測值 (Positive Predictive Value, PPV) = $a / a + c$

(8) 陰性預測值 (Negative Predictive Value, NPV) = $d / b + d$

敏感性 (Sensitivity) 係指該檢驗或培養基偵測 *S. aureus* 或 MRSA 之能力，換言之，Sensitivity 高之檢驗或培養基較不會遺漏實際上係 *S. aureus* 或 MRSA 之菌落；特異性 (Specificity) 係指該檢驗或培養基能辨識非 *S. aureus* 或 MRSA 之能力，換言之，Specificity 高之檢驗或培養基較不會誤判實際上非 *S. aureus* 或 MRSA 之菌落為陽性。陽性預測值 (Positive Predictive Value, PPV) 係指該檢驗或培養基於陽性菌落之預測值，亦即試驗結果或培養基上為陽性反應時，其確實為 *S. aureus* 或 MRSA 之比例；陰性預測值 (Negative Predictive Value, NPV) 係指該檢驗或培養基於陰性菌落之預測值，亦即試驗結果或培養基上為陰性反應時，其確實非 *S.*

aureus 或 MRSA 之比例 (Hsiao et al. 2011)。


S. aureus 之空氣採樣文獻中，關於其鑑定方法之 Sensitivity 與 Specificity 研究相當有限，唯 2011 年 Hsiao 等人之研究曾以 Andersen 1-STG 搭配 CSA 於醫療院所進行 7 分鐘之空氣採樣，其樣本經多項生化測試搭配聚合酶連鎖反應 (PCR) 進行 *S. aureus* 與 MRSA 之菌種確認，結果顯示其 Sensitivity、Specificity、PPV 與 NPV 分別為 24.1%、91.2%、15%與 94.9%。Hsiao 等人推論，其 Sensitivity 偏低之原因係可能與 *S. aureus* 之生物活性受環境空氣其中其他菌種之干擾所致。該研究亦指出選擇性培養基之 PPV 係與 *S. aureus* 於空氣中之濃度高低成比例，因此若於 *S. aureus* 濃度較高之環境進行空氣採樣，該培養基之 PPV 應能提升 (Hsiao et al. 2011)。

2.2.3.2 選擇性培養基相關鑑定研究

本研究針對曾用於進行 *S. aureus* 空氣採樣之四種選擇性培養基 (MSA、BPA、CSA 與 CSM) 進行效能評估，其各自搭配不同鑑定流程，分析不同樣本來源中之 *S. aureus* 時所呈現之鑑定能力如表 4 所示。

1992 年 Van Enk 與 Thompson 首先評估於 MSA 中添加 6mg/L 之 oxacillin (OMSA) 時，其用於分離呼吸道檢體中 MRSA 之效果，該研究係將相同之臨床樣本分別培養於非選擇性培養基與 OMSA，結果顯示 29 株可於 OMSA 分離出之 MRSA，有 9 株無法於非選擇性培養基中被分離出來，研究指出若臨床樣本中所含 MRSA 濃度較低，則將樣本培養於非選擇性培養基時，易因雜菌生長過多而導致計數 MRSA 菌落之困難，而 OMSA 可有效抑制雜菌且不傷害 MRSA 生長 (Van Enk and Thompson 1992)。相較於 BPA、CSA 與 CSM 而言，直接添加抗生素於 MSA 中，以作為 MRSA 初步分離之培養基之做法常見於 MSA，亦為其特色 (Sadaka et al. 2009, Safdar et al. 2003, Merlino, Gill and Robertson 1996)。於 MSA 鑑定相關文獻中，其所搭配之生化鑑定流程之 Sensitivity、Specificity、PPV 與 NPV 較高者列於表 4。

另，BPA 係台灣行政院衛生署疾病管制局所公布之傳染病標準檢驗方法中，用於分離食品中毒案件之人體檢體中的 *S. aureus*。其鑑定流程係將糞便檢體或嘔吐物少許檢體接種於 BPA，於 37°C 培養 24-48 小時後，取黑色陽性菌落進行革蘭氏染色 (Gram stain)，其陽性反應者再接種於 TSA，於 37°C 培養 24-48 小時後，



進行 Staphylase test、凝固酶試驗 (Tube coagulase test, TCT) 與觸酶試驗 (Catalase test), 以上測試皆呈陽性結果之菌落再以 API ID 32 STAPH 生化鑑定套組進行菌種確認。BPA 亦為國際標準組織 (International Organization for Standardization, ISO) (ISO 1999) 與美國食品藥物管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 建議使用於分離食品中 *S. aureus* 之選擇性培養基 (Saito et al. 2011)。

在 CSA 部分, 2007 年 Han 等人以表 4 所列之鑑定流程分析臨床上呼吸道抹拭樣本中 *S. aureus*, 並評估 CSA 與 MSA 之鑑定能力, 結果顯示搭配 CSA 之鑑定方法, 其 Sensitivity 與 Specificity 可達 98% 與 99.6%, 然搭配 MSA 進行鑑定時, 其 Sensitivity 與 Specificity 為 84.3% 與 100%, 研究指出 CSA 相較於 MSA 對於上呼吸道抹拭樣本中 *S. aureus* 有較高鑑定敏感性 (Han et al. 2007)。另, Carricajo 等人以 CSA 搭配表 4 所列測試鑑定 775 件臨床血液與尿液檢體中 *S. aureus*, 結果顯示, 單以 CSA 與 Gram stain 進行鑑定而未加做其他生化測試時, 其 Sensitivity 與 Specificity 為 98.5% 與 97%, 然輔以 Staphychrom coagulase test 時, 其 Specificity 可增至 100%, 亦即進行適當之生化測試, 可有效改善選擇性培養基鑑定能力不足之問題。雖然 CSA 相較於其他傳統選擇性培養基而言, 所需成本較高, 然其高鑑定準確度亦可減少後續鑑定項目與鑑定時間 (Carricajo et al. 2001)。

表 4 *Staphylococcus aureus* 之生化測試

生化測試	Sensitivity /Specificity	NPV /PPV	Reference
MSA			
Gram stain→Catalase test→ Blood agar→37°C, 24hrs→TSA→37°C, 24hrs→MSA→37°C, 24hrs→DNase test→ Tube coagulase test→PCR (<i>nuc</i>)	75% /100%	100% /94%	Kateete et al. 2010
MSA→37°C, 24hrs→Gram stain→Catalase test→Mannitol fermentation test→Gelatin hydrolysis→Mixed sugar fermentation test →Voges-Proskauer test→Coagulase test→ β -haemolysis test→37°C, 24hrs →PCR : 16S rRNA (<i>rrs</i>)	100% /100%	100% /100%	Bautista- Trujillo et al. 2013
BPA			
BPA→PCR→Vitek compact	100% /100%	-	Kim and Oh 2010
CSA			
CSA→PCR→Vitek compact	100% /100%	-	Kim and Oh 2010
CSA→37°C, 18-24hrs→Blood agar→ Catalase test→Staphaurex slide test→ Tube coagulase test	98% /99.6%	-	Han et al. 2007
CSA→Gram stain→Staphychrom coagulase test	98% /100%	-	Carricajo et al. 2001



2.3 生物氣膠收集液

過去生物氣膠文獻中常使用之收集液，包括經過濾之無菌水 (Filtered deionized water, DW) (Han and Mainelis 2012, Chang and Chou 2011, Chang and Hung 2012)、磷酸緩衝液 (Phosphate buffer saline, PBS) (Awad et al. 2010, Reanprayoon and Yoonaiwong 2012, Chapin et al. 2005) 與 Tween 80 mixture (Deionized water with 1% peptone, 0.01% Tween 80, 0.005% antifoam A, TM) (Li and Lin 2001, Thorne et al. 1992)。

表 5 生物氣膠收集液

收集液種類	測試菌種	研究類型	Reference
無菌水	<i>Bacillus subtilis</i> and <i>Cladosporium cladosporioides</i> fungal spores	Laboratory chamber	Han and Mainelis 2012
	<i>Legionella pneumophila</i> and <i>Escherichia coli</i>	Laboratory chamber	Chang and Chou 2011
	<i>Legionella pneumophila</i>	Field sampling	Chang and Hung 2012
磷酸緩衝液	<i>Staphylococcus</i> spp., Gram (+) and Gram (-) bacteria	Field sampling	Awad et al. 2010
	<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp.	Field sampling	Reanprayoon and Yoonaiwong 2012
	<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp.	Field sampling	Chapin et al. 2005
Tween 80 mixture	<i>Bacillus subtilis</i> spores and <i>Escherichia coli</i>	Laboratory chamber	Li and Lin 2001
	Bacteria and fungal spores	Field sampling	Thorne et al. 1992



2.4 生物氣膠採樣器

本研究所評估之生物氣膠採樣器包含以培養皿為採樣介質之採樣器 (Agar-based sampler) 與以液體為採樣介質之採樣器 (Liquid-based sampler)

2.4.1 以固體培養基為採樣介質之採樣器 (Agar-based samplers)

2.4.1.1 安德森單階式生物氣膠採樣器 (Andersen one stage sampler, Andersen 1-STG)

Agar-based samplers 係將生物氣膠引入多孔縫隙並衝擊至培養皿中之衝擊式採樣器，例如 Andersen one stage sampler (Andersen 1-STG)。由於生物氣膠可直接收集於培養皿上並直接培養，無需採樣後之後續處理，因此被廣泛使用。

2.4.1.2 時間因子對採樣效能之影響

1995 Stewart 等人指出微生物可能於 Andersen impactor 採樣過程中之衝擊作用導致細胞膜損傷，進而影響被捕集微生物之可培養性 (Stewart et al. 1995)。1999 年 Li 與 Lin 進一步以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 對 *Escherichia coli* 與 *Bacillus subtilis* spores 進行 0.5、1、2、3、5、7、10、20、40 與 60 分鐘之空氣採樣，並以與本實驗相同之採樣效能指標評估不同採樣時間對採樣效能之影響。結果顯示，*E. coli* 於採樣時間 60 分鐘時之採樣效能，相對於採樣 0.5 分鐘時，其採樣效能顯著下降至 10 倍，另，*B. subtilis* spores 之採樣效能亦於採樣時間 60 分鐘時出現下降之現象 (Li and Lin 1999b)。2010 年 Mainelis 與 Tabayoyong 進一步提出，隨著採樣時間增加，細菌與真菌被收集至 Andersen impactor 並且被培養出來的量會下降，此結果係與微生物被收集至培養基後，於後續之採樣過程中，採樣氣流會持續進入採樣器並導致培養基之乾燥與硬化，此現象除可能使已收集至培養基上之細菌與真菌可培養性下降，亦會造成後續欲捕集之微生物自培養基表面彈開 (bounce)，而使回收率下降，故以衝擊式採樣器進行採樣時，採樣時間不宜過長，以避免影響微生物之採樣效能 (Mainelis and Tabayoyong 2010)。

時間因子對 Andersen impactor 捕集空氣中 *S. aureus* 之採樣效能影響目前尚未清楚，故本研究除評估 *S. aureus* 培養基之空氣採樣效能外，亦針對時間因子進行實驗測試與探討。



2.4.2 以液體為採樣介質之採樣器 (Liquid-based samplers)

2.4.2.1 液體衝擊瓶 (All glass impinger, AGI-30) 與離心式採樣器 (BioSampler)

Liquid-based samplers 係引入生物氣膠並使其衝擊至或以離心路徑進入液體收集介質中。種類包括 All-glass impinger-30 (AGI-30)、MAS-100 sampler 之衝擊式採樣器以及 BioSampler 等。此類採樣器之優點為採樣之液體樣本可經培養法或其他分子生物技術 (例如: qPCR) (Sirigul et al. 2006) 進行分析, 以得到定性或定量數據。其中 AGI-30 係以衝擊方式將生物氣膠收集至液體中, 而 BioSampler 為結合氣流切線方向之離心力將生物氣膠衝擊至收集液中的離心式採樣器, 由於結合離心力將生物氣膠衝擊至收集液, 改善了生物氣膠彈開 (bounce) 與再氣膠化 (re-aerosolization) 之現象 (Willeke et al. 1998)。

2.4.2.2 時間因子對採樣效能之影響

1997 年 Grinshpun 等人指出, 以收集液為介質之採樣器 (例如 AGI-30) 其採樣效能於採樣時間增加時下降, 此現象係可能與採樣氣體於採樣過程中導致收集液反覆強烈的攪動, 造成已被捕集於收集液中之微生物再氣膠化有關 (Grinshpun et al. 1997)。此外, 微生物於採樣過程中反覆撞擊收集液面與瓶壁亦會導致細菌活性下降 (Terzieva et al. 1996)。2007 年 Rule 等人置入已知濃度之 *Pantoea agglomerans* 之 DW 於 AGI-30 與 BioSampler 中, 並於暴露艙進行 30 與 60 分鐘之空氣採樣 (暴露艙通入經 HEPA 過濾之空氣)。其收集液以 Syto 62 進行總菌之染色, 以 TOPRO-3 進行非活性細菌之染色, 最後以其差值計算活性細菌濃度; 結果顯示, 當採樣時間自 30 分鐘延長至 60 分鐘, AGI-30 中具活性與可培養性細菌濃度分別下降 0.09 與 0.4 倍; 而 BioSampler 中具活性與可培養性細菌濃度則分別下降 0.88 與 0.77 倍。由上述可知, 存在於 AGI-30 與 BioSampler 收集液中之細菌, 其活性與可培養性皆隨採樣時間延長而下降 (Rule et al. 2007)。

然時間因子對以收集液為介質之採樣器採集空氣中 *S. aureus* 之影響情形目前亦未明朗, 故本研究除測試 *S. aureus* 空氣採樣收集液之採樣效能外, 亦針對採樣時間進行評估。

第三章 研究目的

從上述文獻回顧顯示，*S. aureus* 可造成相當高比率的院內感染，並可強勢存在於醫療院所、家禽養殖地點、紡織、食品、麵粉等工作環境，且其導致治療困難的抗藥性問題以及空氣傳播特性亦已被證實。因此，有效監測此致病菌於作業場所環境空氣中是否存在及正確定量其濃度，有助於釐清污染來源，及早且適時採行必要的控制措施，是相當重要的。而有效監控空氣中病原菌濃度的具體作法之一，即是進行空氣採樣，再透過適當的分析定量其病原菌之濃度。然目前針對 *S. aureus* 之空氣採樣效能研究相當有限，因此本研究將在實驗室建置一 *S. aureus* 氣膠產生系統，藉此評估不同採樣器在不同採樣條件下對 *S. aureus* 之採樣效能，期能找出最佳採樣策略用於所研究之病原菌。

本研究主要目的如下：

1. 建置實驗室 *S. aureus* 氣膠產生及採效能評估系統。
2. 評估一種非選擇性培養基 (Tryptic Soy Agar) 與四種選擇性培養基 (Mannitol Salt Agar、Baird-Park agarose、CHROMagar staph aureus 與 Chapman Stone Medium) 對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能，決定最佳空氣採樣培養基。
3. 以培養基為採樣介質之採樣器 (Andersen one stage sampler)，搭配先前實驗決定具最佳採樣效能之培養基，透過培養法評估不同採樣時間對其採樣效能之影響。
4. 評估三種採樣液體 (Filtered deionized water、Phosphate buffer saline、Tween 80 mixture) 對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能與採樣流失率，決定最佳空氣採樣效能收集液。
5. 以液體為採樣介質之採樣器 (AGI-30 與 BioSampler)，搭配先前實驗決定具最佳採樣效能之收集液，透過培養法評估採樣器種類與採樣時間對採樣效能之影響。
6. 透過統計檢定結果提出適當的採樣策略。

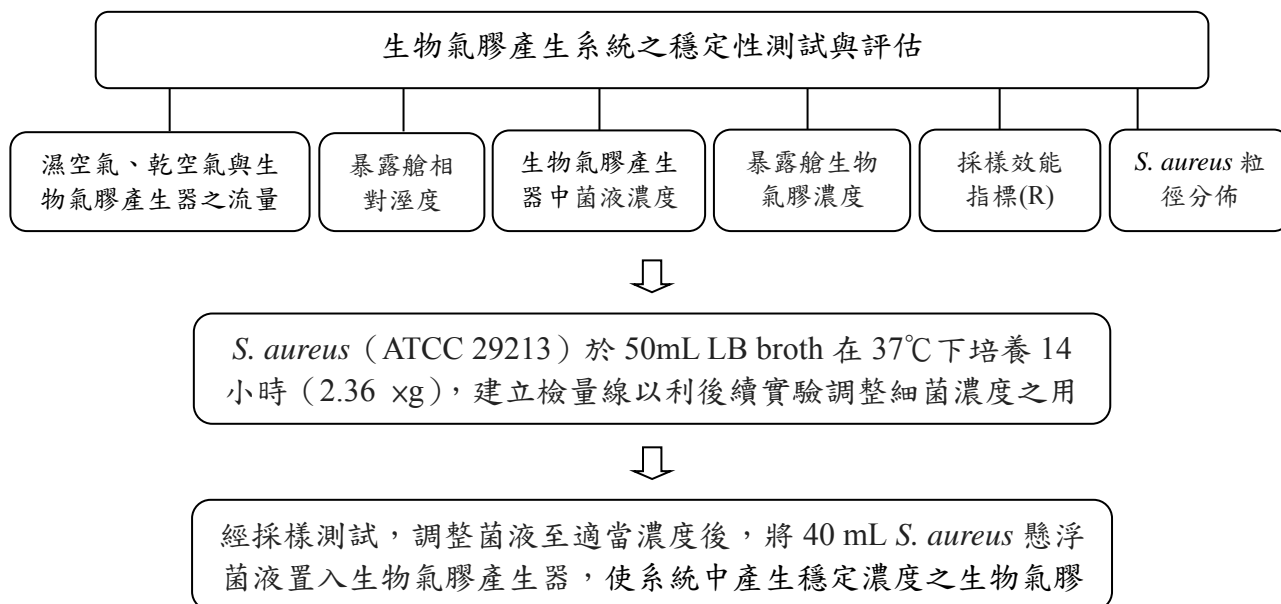


第四章 研究架構



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

採樣效能評估實驗之第一部份為評估以培養基為採樣介質之生物氣膠採樣方法，實驗設計以 Andersen one stage sampler 搭配五種不同培養基，進行採樣時間皆為 6 分鐘之 *S. aureus* 空氣採樣，藉此評估不同培養基採集空氣中 *S. aureus* 之效能。決定最佳採樣效能之培養基後，將評估不同採樣時間對以相同培養基為採樣介質之採樣器的效能影響，方法係以 Andersen one stage sampler 搭配本研究測試具較佳採樣效能之培養基，進行採樣時間為 3、6、15、30 與 60 分鐘之實驗。第二部分為評估以液體為採樣介質之生物氣膠採樣方法，首先以 AGI-30 搭配三種不同收集液，於相同採樣時間 3 分鐘下比較不同收集液對空氣中 *S. aureus* 之採樣效能，並於採樣時間 3、6 與 15 分鐘下比較三種收集液之流失率；而後以 AGI-30 與 BioSampler 搭配本研究測試具較佳採樣效能之收集液，進行採樣時間為 3、6、15、30 與 60 分鐘之實驗，以觀察不同生物氣膠採樣器與不同採樣時間對 *S. aureus* 採樣效能的影響。



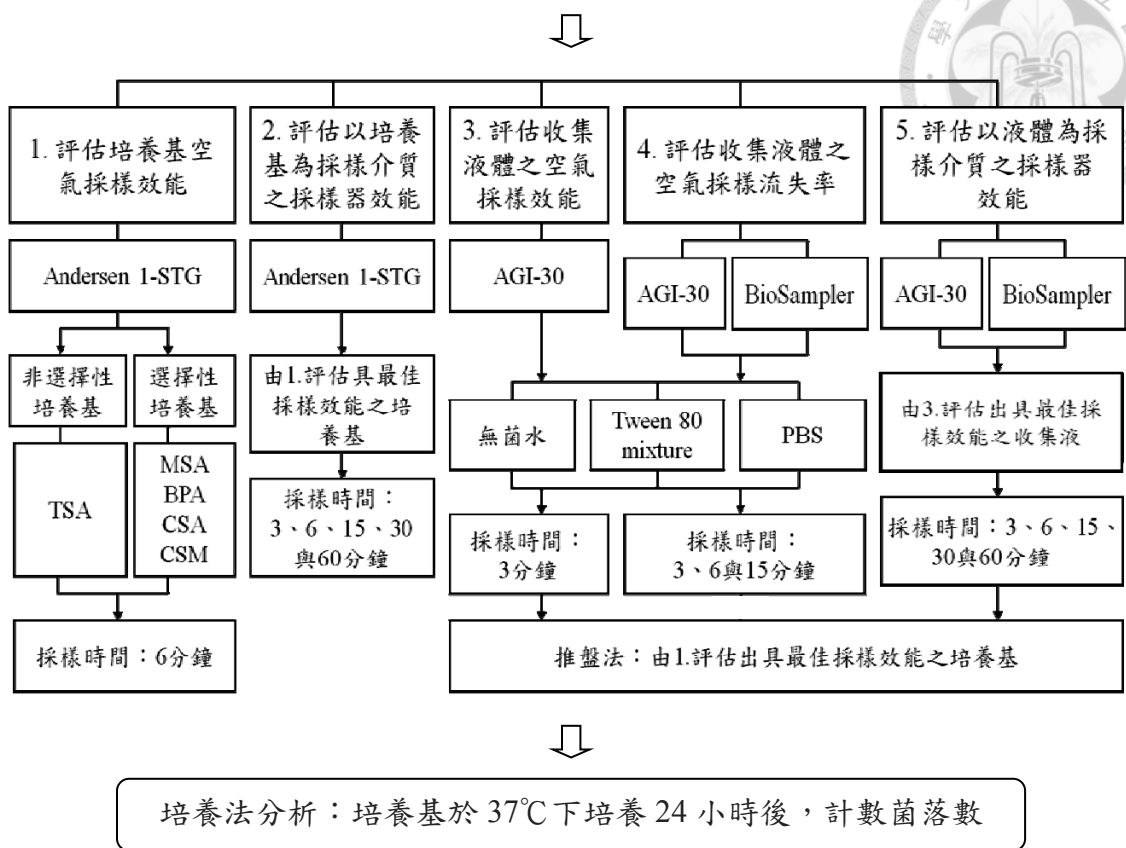


圖 1 研究流程

第五章 材料與方法



5.1 實驗菌株

本研究所採用菌種為 *S. aureus* (ATCC 29213)。*S. aureus* 為兼性厭氧之革蘭氏陽性球菌，不產芽孢(spore)，無鞭毛(flagella)，菌直徑為 0.5-1 μm (Lai et al. 2003)，可於 37°C 下生長良好，其氣動粒徑 (aerodynamic diameter) 為 0.65-0.7 μm (Chang et al. 2013)。

5.2 實驗用培養基、培養液與採樣收集液

5.2.1 Tryptic Soy Agar (TSA)

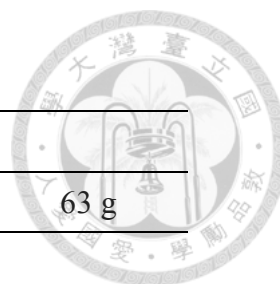
配方 / 公升	
Tryptic soy agar (Difco, Detroit MI, USA)	40 g

將 40g TSA 粉末 (Difco, Detroit MI, USA) 置入 1000 mL 經過濾之去離子水 (其過濾方式係將經紫外光與純化管柱去除離子與有機物之純化水，進一步以幫浦加壓方式使其通過超濾膜與 0.22 μ 之濾膜，以去除水中微生物與大於 0.22 μ 之微粒，Milli-Q Academic, Millipore, Bedford, MA, USA)，慢慢加熱至沸騰，使 TSA 粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 TSA 置於水溫 50°C 的水浴槽使之降溫，最後輕輕混合倒入無菌培養皿 (20 mL/plate)。

5.2.2 Mannitol Salt Agar (MSA)

配方 / 公升	
Mannitol Salt Agar (Difco, Detroit MI, USA)	111 g

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



5.2.3 Baird-Parker Agar (BPA)

配方 / 公升	
Baird-Parker Agar Base (Difco, Detroit MI, USA)	63 g

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

5.2.4 CHROMagar Staph aureus Agar (CSA)

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

5.2.5 Chapman Stone Medium (CSM)

配方 / 公升	
Chapman Stone Medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)	202.5 g

取 202.5g CSM 粉末 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 懸浮於 1000 mL 經過濾之去離子水 (Millipore)，接著慢慢加熱至沸騰，使 CSM 粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 CSM 置於水溫 50°C 的水浴槽使之降溫，最後輕輕混合倒入無菌培養皿 (20 mL/plate)。

5.2.6 Luria-Bertani (LB) broth

配方 / 公升	
LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (Difco, Detroit MI, USA)	25 g

取 25g LB Broth 粉末 (Difco) 懸浮於 1000 mL 經過濾之去離子水 (Millipore)，

加熱至沸騰，使粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，滅菌過後將 LB Broth 置於水溫 50°C 的水浴槽使之降溫，保存於 4°C 下備用。



5.2.7 Phosphate buffer saline (PBS)

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

將上述成分之粉末懸浮於 1000 mL 經過濾之去離子水 (Millipore)，加熱至沸騰使粉末完全溶解於水中，再以 121°C 高壓滅菌消毒 15 分鐘，保存於室溫環境。

5.2.8 Tween 80 混合液

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

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

5.3 置備與建立金黃色葡萄球菌檢量線

在置備 *S. aureus* 菌液時，先將儲存於 -20°C 之 *S. aureus* (ATCC 29213) 進行

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

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

5.4 金黃色葡萄球菌菌液濃度之調整

在進行生物氣膠產生前，先量測備製之 *S. aureus* 懸浮液的 OD 值，再利用先前所製備之檢量線推估當次準備懸浮液內 *S. aureus* 濃度，並以無菌水調整菌液濃度至適合於該次系統採樣之 *S. aureus* 濃度，以進行採樣方法評估實驗。

5.5 *S. aureus* 氣膠產生系統

本研究建置之 *S. aureus* 氣膠產生系統詳如圖 2。系統運作方式為先將 40 mL 之 *S. aureus* 懸浮液置於 Collision three-jet nebulizer (BGI Collision Nebulizer, BGI Inc., Waltham, USA) 中，通入經 HEPA-filter 過濾且流量為 3 L/min 之壓縮空氣後，nebulizer 內之 *S. aureus* 呈氣膠化，並藉由壓縮空氣的推送通過長度一公尺之管線，而後進入系統暴露艙中。HEPA-filter 過濾之壓縮空氣同時亦進入另兩條管線，其中一條管線空氣將經過加濕器 (Humidifier) 以增加濕度，此管線 (長度為 1.1 公尺) 稱之為濕空氣，預設流量為 30 L/min；另一條未經過加濕器之管線 (長度為 0.6 公尺) 則為乾空氣，預設流量為 27 L/min。此兩條管線交會後，形成具有一定相對濕度 (Relative humidity, RH, %) 之混合氣體，並進入系統之暴露艙中。暴露艙中置有溫濕度計 (Thermo-hydrometer HT800, INS Enterprise Co., Ltd., Taiwan) 以確認暴露艙中 RH 是否介於 55-60% 濕度範圍，此濕度範圍較接近一般室內環境中大部分情況下之相對濕度 (Tseng et al. 2011)。

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

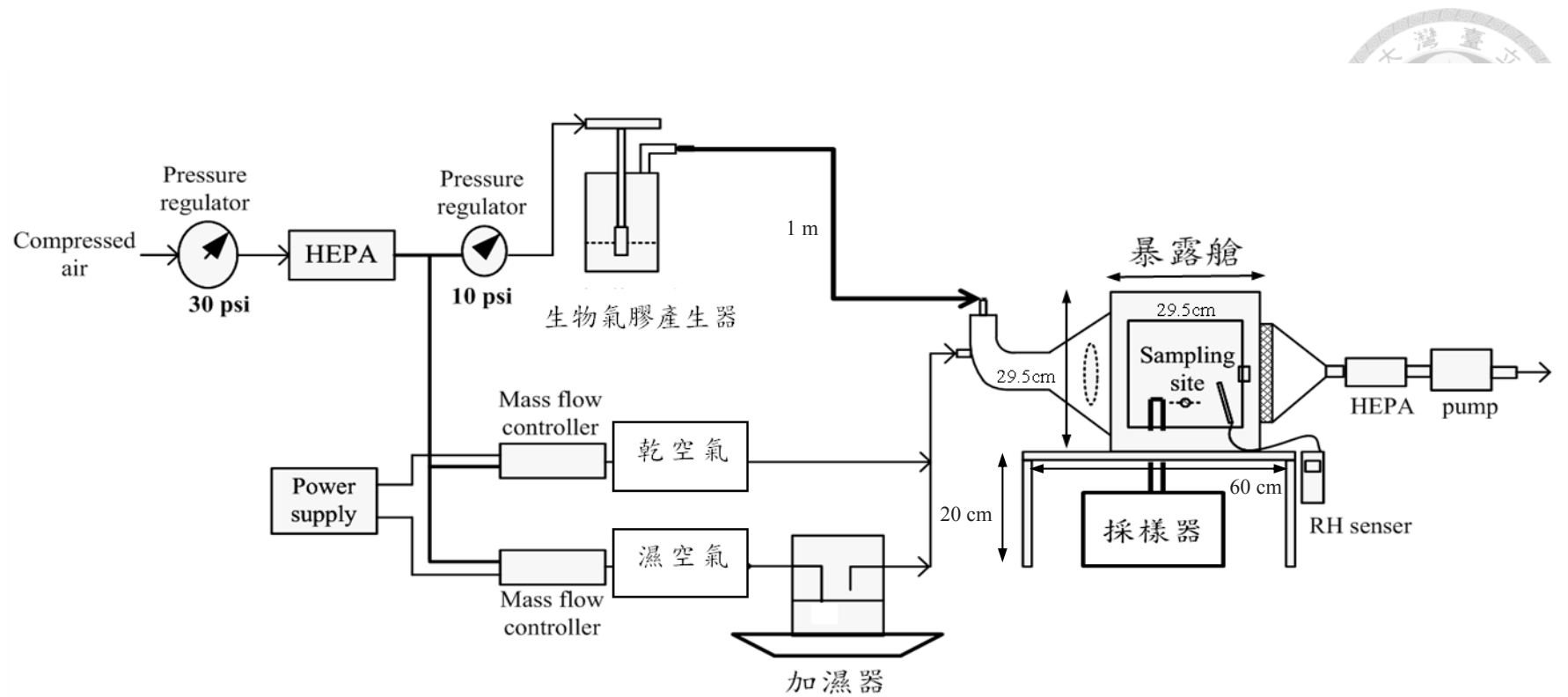


圖 2 *S. aureus* 生物氣膠產生系統



5.6 *S. aureus* 氣膠產生系統之穩定性測試

5.6.1 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器之流量

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

5.6.2 暴露艙相對濕度

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

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

為了解 Nebulizer 中菌液濃度變化情形，本研究於系統開啟壓縮空氣 20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度為 10^4 CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液取代無菌水後，重新開啟連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使其產生 *S. aureus* 生物氣膠。自置入 *S. aureus* 菌液於 Nebulizer 後，每隔 30 分鐘即短暫關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，自 Nebulizer 中取出 0.1 mL 菌液，經適當稀釋後於 TSA 進行推盤，總計量測 300 分鐘，且進行三次重複測試。TSA 培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後計數菌落，再由菌落數與其推盤時之稀釋倍數的乘積，推算於不同時間點 (T_i) 時 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度 (C_{susp} , CFU/mL)。Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度計算公式如下：

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

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



N (CFU)：TSA 於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

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

D：推盤時之稀釋倍數

5.6.4 暴露艙生物氣膠濃度

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

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

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

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

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

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

T (min)：空氣採樣時間 (20 分鐘)

0.001：將空氣採樣之單位體積由 1 L 換算為 1 m³

5.6.5 採樣效能指標 (R)

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

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

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

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



5.6.6 *S. aureus* 粒徑分佈

為瞭解暴露艙中 *S. aureus* 之粒徑分佈，本研究於系統開啟壓縮空氣 20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度分別為 10^8 、 10^7 與 10^5 CFU/mL 之高、中與低濃度 *S. aureus* 菌液取代無菌水後，重新開啟連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使其產生 *S. aureus* 生物氣膠。自置入 *S. aureus* 菌液於 Nebulizer 後，每 5 分鐘以氣動粒徑分析儀 (Aerodynamic particle sizer APS, model 3310A, TSI, Inc., St. Paul, MN, USA) 於系統暴露艙中偵測一次艙內微粒粒徑，共計偵測 150 分鐘，且進行三重複測試。微粒進入 APS 之流量為 5 L/min，其中包含 inlet flow rate 4 L/min 與 sheath flow rate 1 L/min，微粒粒徑測量範圍設定為 0.453 μm 至 2.943 μm 。

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

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

i ：粒徑區間數

d_i ：第 i 個粒徑區間內之平均粒徑值

n_i ：粒徑為 d_i 時之平均微粒數

N ：所有粒徑區間之平均微粒數之總和

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

d_g ：幾何平均氣動粒徑

5.7 空白試驗

本研究之空白試驗進行方式係開啟生物氣膠產生系統之壓縮空氣，使其通過乾、溼空氣管線與內裝有 40 mL 無菌水之 Nebulizer，並校正三種氣體流量至前述之預設流量。20 分鐘後，將已經流量校正之 Andersen 1-STG (28.3 L/min)、AGI-30

(12.5 L/min) 與 BioSampler (12.5 L/min)，置於暴露艙中各進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣。Andersen 1-STG 所搭配之培養基為 TSA，而 AGI-30 與 BioSampler 所搭配之收集液為 20mL PBS，採樣完成後量測 PBS 總體積，並取其中 0.1 mL 以推盤法塗抹至 TSA。上述培養基皆將置於 37°C 培養箱中培養 24 小時。

5.8 *S. aureus* 空氣採樣方法之效能評估

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

本研究所評估之 Agar-based sampler 係指 Andersen 1-STG (Andersen Samplers, Ins., Atlanta, GA, USA)。Andersen 1-STG 為一階衝擊採樣器，內有 400 個孔徑為 0.25 mm 之孔洞，抽氣流量為 28.3 L/min，截取粒徑 (cut-off size) 為 0.57 μm (Li et al. 2003b)。Andersen 1-STG 之流量校正皆於每次進行效能評估實驗前完成，並於採樣實驗結束時再進行流量後測。

5.8.1.1 選擇 *S. aureus* 最佳空氣採樣培養基

根據文獻顯示，曾用於 *S. aureus* 空氣採樣之培養基包括非選擇性培養基 Tryptic soy agar (TSA) (Gandara et al. 2006) 與四種選擇性培養基，後者為 Mannitol salt agar (MSA) (Schulz et al. 2011)、Baird-Park agarose (BPA) (Zhong et al. 2009)、CHROMagar staph aureus (CSA) (Hsiao et al. 2011) 與 Chapman Stone Medium (CSM) (Gandara et al. 2006)。故本研究針對此五種培養基，評估其對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能。實驗過程如圖 3 所示，在備製與調整 *S. aureus* 菌液濃度後，開啟生物氣膠產生系統之壓縮空氣，使其通過乾、溼空氣管線與內裝有 40 mL 無菌水之 Nebulizer，並校正三種氣體流量至前述之預設流量。20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度為 10^5 CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液取代無菌水後，重新開啟連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使 *S. aureus* 菌液氣懸，並受到壓縮空氣推送而進入暴露艙中，共運作 30 分鐘。此時暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，並自 Nebulizer 中取出 0.1 mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後利用推盤法塗抹至與 Andersen 1-STG 內相同之測試培養基上，作為 Andersen 1-STG 採樣前 Nebulizer 中菌液濃度之測試值。其後重新開啟壓縮空氣，等待 10 分鐘後至暴露艙中生物氣膠分佈均勻，再將置有相同培養基之 Andersen 1-STG 置於暴露艙下方採樣口並進行 6 分鐘空氣採樣。採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1 mL 菌液進行同樣

培養基之推盤，以獲得空氣採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。被測試之五種培養基係採隨機順序方式置入 Andersen 1-STG 內以進行採樣效能評估，暴露艙內空氣中生物氣膠濃度為 10^2 至 10^3 CFU/m³。每種培養基均進行四重複測試。

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

1000 ×g 於 4°C 下離心 5 分鐘 ↓

移除上清液後加入適量無菌水，再將此細菌懸浮液進行 A₆₀₀ 測定，調製為 40 mL 10⁵ CFU/mL 之菌液



開啟系統壓縮空氣，進行乾、溼空氣與 Nebulizer 的流量校正
(乾空氣：27 L/min、溼空氣：30 L/min、Nebulizer：3 L/min)

20 分鐘 ↓

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

30 分鐘 ↓

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

10 分鐘 ↓

Andersen 1-STG 隨機搭配 TSA、MSA、BPA、CSA 與 CSM，於暴露艙進行 6 分鐘空氣採樣

6 分鐘 ↓

關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，進行空氣採樣後 Nebulizer 中菌液濃度測試



培養基置於 37°C 培養箱中培養 24 小時後計數菌落，並計算 R 值以評估五種培養基之採樣效能

圖 3 選擇 *S. aureus* 最佳空氣採樣培養基之實驗流程

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

Andersen 1-STG 採樣所得之暴露艙空氣中 *S. aureus* 細菌濃度($C_{\text{air_Andersen 1-STG}}$) 計算公式如下：

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

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

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

T (min)：空氣採樣時間

0.001：將空氣採樣之單位體積由 1 L 換算為 1 m³

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

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

N (CFU)：測試培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

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

D：推盤時之稀釋倍數

採樣效能指標(R)計算公式如下：

$$R = C_{\text{air_Andersen 1-STG}} / C_{\text{susp}}$$

$C_{\text{air_Andersen 1-STG}}$ (CFU/m³)：以 Andersen 1-STG 於暴露艙採樣所得之空氣中 *S. aureus* 濃度

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

以 R 作為比較各類採樣方法之指標曾應用於評估 Andersen 1-STG 與 cassette 對於 *S. aureus* 之採樣效能研究 (Hsiao et al. 2011)、評估 Andersen impactor、AGI-30 等採樣器對病毒性生物氣膠之採樣效能研究 (Tseng and Li 2005)，以及評估紫外

光和奈米光觸媒對空氣中 *Legionella pneumophila* 之控制效果研究中 (Li et al. 2003b)。



5.8.1.2 採樣時間對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響

本實驗流程如圖 4 所示。於系統開啟壓縮空氣後，將通過乾、溼空氣管線與內裝 40 mL 無菌水之 Nebulizer 的氣體流量分別校正為前述之預設流量。20 分鐘後，將連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度介於 5×10^3 至 5×10^4 CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液取代無菌水後，重新開啟連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使 *S. aureus* 菌液氣懸，並受到壓縮空氣推送而進入暴露艙中。30 分鐘後暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，以取出 0.1mL Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後利用推盤法塗抹至與 Andersen 1-STG 內相同之測試培養基上，作為空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度之測試。其後重新開啟壓縮空氣，等待 10 分鐘後暴露艙中生物氣膠分佈均勻，再將內裝有先前實驗 (5.8.1.1) 評估具較佳採樣效能之培養基的 Andersen 1-STG，置於系統之暴露艙下方採樣口，進行 3、6、15、30 與 60 分鐘等不同採樣時間採樣，暴露艙內空氣中生物氣膠濃度為 10^2 至 10^3 CFU/m³。採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1mL 菌液進行推盤，以與採樣前相同實驗方式測試採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。

上述培養基將置於 37°C 培養箱中培養 24 小時。不同採樣時間之效能指標值(R) 如前述 (5.8.1.1) 之方式進行計算，每種採樣時間進行四重複測試。

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

1000 ×g 於 4°C 下離心 5 分鐘 ↓

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



開啟系統壓縮空氣，將乾、溼空氣與 Nebulizer 管線校正為預設流量

20 分鐘 ↓

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

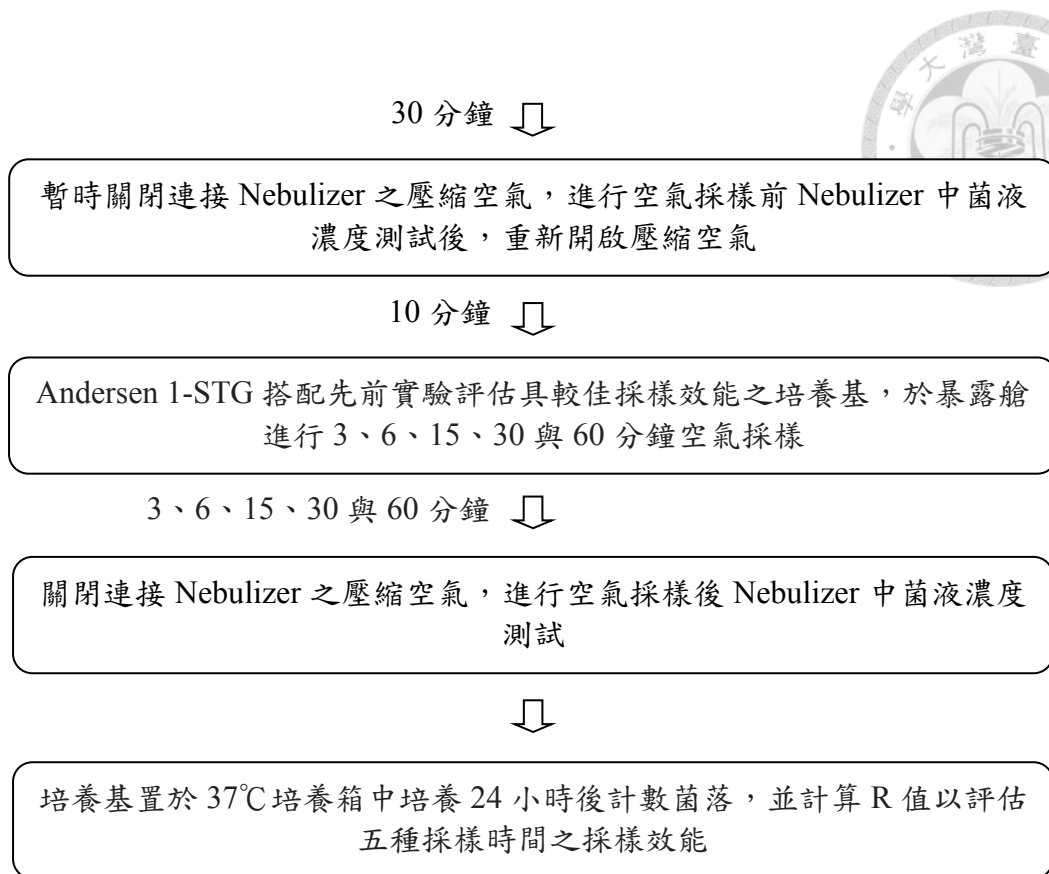


圖 4 探討時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能的影響之實驗流程

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

本研究評估之 Liquid-based samplers 包括 All glass impinger-30 (AGI-30) 與 BioSampler (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA)，AGI-30 與 BioSampler 之 50% 截取氣動粒徑 (d_{50}) 分別為 $0.31\mu\text{m}$ (Macher and Burge 2001) 與 $0.3\mu\text{m}$ (Deloge-Abarkan et al. 2007)，兩者抽氣流量均為 12.5 L/min 。AGI-30 與 BioSampler 之流量校正皆於每次進行採樣評估實驗前完成，並於採樣實驗結束再進行流量後測。

5.8.2.1 評估 *S. aureus* 空氣採樣收集液之採樣效能

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

連接 Nebulizer 之壓縮空氣暫時關閉，並以 40 mL 且濃度為 10^8 CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液取代無菌水後，重新開啟連接 Nebulizer 之壓縮空氣，使 *S. aureus* 菌液氣懸，並受到壓縮空氣推送而進入暴露艙中，共運作 30 分鐘。此時暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，並自 Nebulizer 中取出 0.1 mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後利用推盤法塗抹至先前實驗 (5.8.1.1) 評估具最佳採樣效能之培養基上，定量空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度。其後重新開啟壓縮空氣，等待 10 分鐘後至暴露艙中生物氣膠分佈均勻，再將內裝有 20 mL 隨機選取之三種收集液的 AGI-30 置於暴露艙下方採樣口，進行 3 分鐘採樣；採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1 mL 菌液進行推盤，以與採樣前相同實驗方式定量採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。

採樣結束後即進行量測 AGI-30 內之收集液總體積，且收集液不經過儲放，即取出其中 0.1 mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後推盤至先前實驗 (5.8.1.1) 評估具最佳採樣效能之培養基上。

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

1000 $\times g$ 於 4°C 下離心 5 分鐘 ↓

移除上清液後加入適量無菌水，再將此細菌懸浮液進行 A₆₀₀ 測定，調製為 40 mL 且濃度為 10^8 CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液

↓

開啟系統壓縮空氣，將乾、溼空氣與 Nebulizer 管線校正為預設流量

20 分鐘 ↓

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

30 分鐘 ↓

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

10 分鐘 ↓

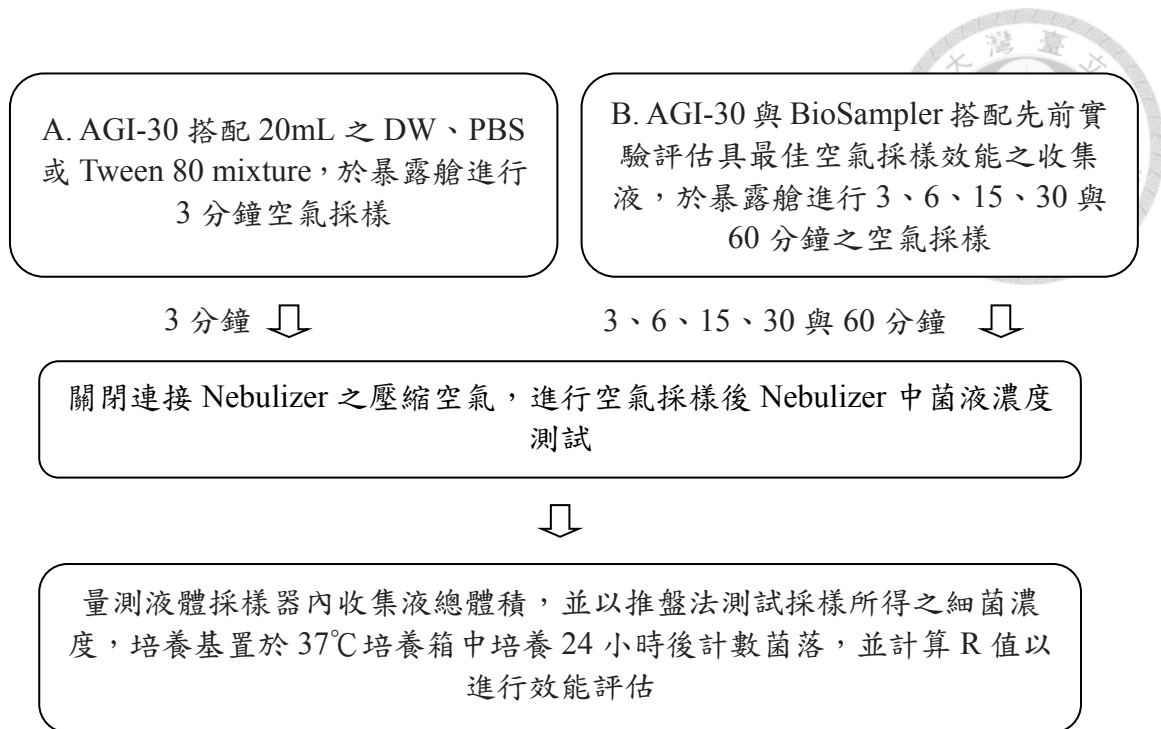


圖 5 *S. aureus* 採樣收集液與採樣時間之效能評估

上述培養基皆置於 37°C 培養箱中培養 24 小時並計數菌落。AGI-30 搭配三種收集液採樣所得之菌落數，經收集液體積、採樣時間與採樣流量的校正，可得到其空氣中 *S. aureus* 採樣濃度 (C_{air_AGI-30})。將此濃度除以其相對應採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度 (C_{susp}) 之平均值，此比值即作為該收集液空氣採樣之效能指標 (R , $R = C_{air_AGI-30}/C_{susp}$)，每種收集液進行四重複測試。有關上述各濃度與 R 值之計算公式如下：

AGI-30 採樣所得之暴露艙空氣中 *S. aureus* 細菌濃度 (C_{air_AGI-30}) 計算公式如下：

$$C_{air_AGI-30}(\text{CFU}/\text{m}^3) = ((N / 0.1) \times D \times V) / (L \times T \times 0.001)$$

N (CFU)：培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

0.1 (mL)：因自收集液中取出 0.1 mL 菌液推盤，需換算為 1 mL

D ：將收集液推盤時之稀釋倍數

V (mL)：收集液採樣後之總體積

L (L/min)：AGI-30 採樣流量 (12.5 L/min)

T (min)：空氣採樣時間

0.001：將空氣採樣之單位體積由 1 L 換算為 1 m³



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

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

N (CFU)：培養基於 37°C 培養箱中培養 24 小時後之菌落數

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

D ：推盤時之稀釋倍數

採樣效能指標(R)計算公式如下：

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

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

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

5.8.2.2 評估 *S. aureus* 空氣採樣收集液之流失率

以液體為介質之採樣器在引入生物氣膠於收集液的過程中，收集液之再氣膠化可能造成液體與細菌流失 (Lin et al. 2000)。因此本研究評估收集液之採樣效能外，亦測試 DW、PBS 與 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之液體流失率。本實驗流程如圖 6 所示。完成 *S. aureus* 菌液之製備與濃度調整後，即進行 AGI-30 與 BioSampler 重量之量測 (W_{empty} , mg)，而後進行內裝有 20 mL 收集液之液體採樣器總重之量測 (W_{before} , mg)，其重量差值與收集液體積相除即為該收集液之密度 (D , mg/mL)，密度值將用於計算液體流失率。

接著以與前述相同操作方式進行系統流量與濕度調控，並將 40 mL 且濃度為 10⁸ CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液置入 Nebulizer，俟其穩定後再將內裝有 20 mL 收集液之 AGI-30 或 BioSampler，置於暴露艙下方採樣口進行 3、6 與 15 分鐘採樣；完成採樣後亦將液體採樣器進行秤重 (W_{after} , mg)，其採樣前後之重量差值，與該收集液之密度相除後即可得流失液體之體積，此數值以採樣時間進行校正後，可計算收集液之流失率 (%)。流失率計算公式如下：

$$\text{流失率 (\%)} = ((W_{\text{after}} - W_{\text{before}}) / D) / 20$$

$$D \text{ (mg/mL)} = (W_{\text{before}} - W_{\text{empty}}) / 20$$

W_{before} (mg)：採樣前內裝收集液之採樣器重量

W_{empty} (mg)：採樣前未裝收集液之採樣器重量

W_{after} (mg)：採樣後內裝收集液之採樣器重量

20 (mL)：收集液體積

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

1000 ×g 於 4°C 下離心 5 分鐘 ↓

移除上清液後加入適量無菌水，再將此細菌懸浮液進行 A₆₀₀ 測定，調製為 40 mL 且濃度為 10⁸ CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液

↓

量測 AGI-30 與 BioSampler 之淨重與內裝有 20 mL 收集液之總重，記錄重量差值以計算收集液之密度

↓

開啟系統壓縮空氣，將乾、溼空氣與 Nebulizer 管線校正為預設流量

20 分鐘 ↓

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

30 分鐘 ↓

暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，其後重新開啟壓縮空氣

10 分鐘 ↓

內裝 20mL DW·PBS 或 Tween 80 mixture 之液體採樣器於暴露艙進行 3、6 與 15 分鐘空氣採樣

3、6 與 15 分鐘 ↓

關閉壓縮空氣後，量測內裝收集液之液體採樣器總重，以計算流失率

圖 6 *S. aureus* 空氣採樣收集液之流失率測試

5.8.2.3 時間因子對 AGI-30 與 Biosampler 採樣效能之影響

本實驗流程如圖 5 之 B 流程所示。於系統開啟壓縮空氣後進行流量校正。俟 20 分鐘後，以與前述相同操作方式以 40 mL 且濃度為 10⁸ CFU/mL 之 *S. aureus* 懸浮菌液取代無菌水。30 分鐘後暫時關閉連接 Nebulizer 之壓縮空氣，以測試空氣採樣前 Nebulizer 中菌液濃度。其後重新開啟壓縮空氣，等待 10 分鐘後再將內裝有

20 mL 先前測試 (5.7.2.1) 評估具最佳空氣採樣效能之收集液之 AGI-30 或 Biosampler 置於暴露艙下方採樣口，進行 3、6、15、30 與 60 分鐘採樣；採樣結束後亦自 Nebulizer 中取 0.1 mL 菌液進行推盤，以與採樣前相同實驗方式測試採樣後 Nebulizer 中菌液濃度。

液體採樣器內之收集液總體積將於採樣結束後進行量測，且收集液不經過儲放步驟，即取出其中 0.1mL *S. aureus* 菌液，經適當稀釋後推盤至先前實驗 (5.8.1.1) 評估具最佳採樣效能之培養基上。

上述培養基皆將置於 37°C 培養箱培養 24 小時候計數菌落。AGI-30 與 Biosampler 於不同採樣時間之效能指標值 (R) 如前述 (5.8.2.1) 之方式進行計算，每種採樣時間進行四重複測試。

5.9 資料分析

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



第六章 結果

6.1 *S. aureus* 氣膠產生系統之穩定性測試

6.1.1 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器流量

系統流量測試結果如圖 7 所示，濕空氣流量平均值為 30.12 L/min，變異數 (Coefficient of variation, CV) 為 0.57% (附表 1); 乾空氣流量平均值為 27.05 L/min (CV = 0.45%, 附表 2); Nebulizer 流量平均值為 3.01 L/min (CV = 0.59%, 附表 3)。三種流量測試結果之 CV 值皆小於 1%，顯示氣膠產生系統於開啟壓縮空氣後之 360 分鐘運作時間內，濕空氣、乾空氣與 Nebulizer 流量皆呈穩定 (圖 7)。



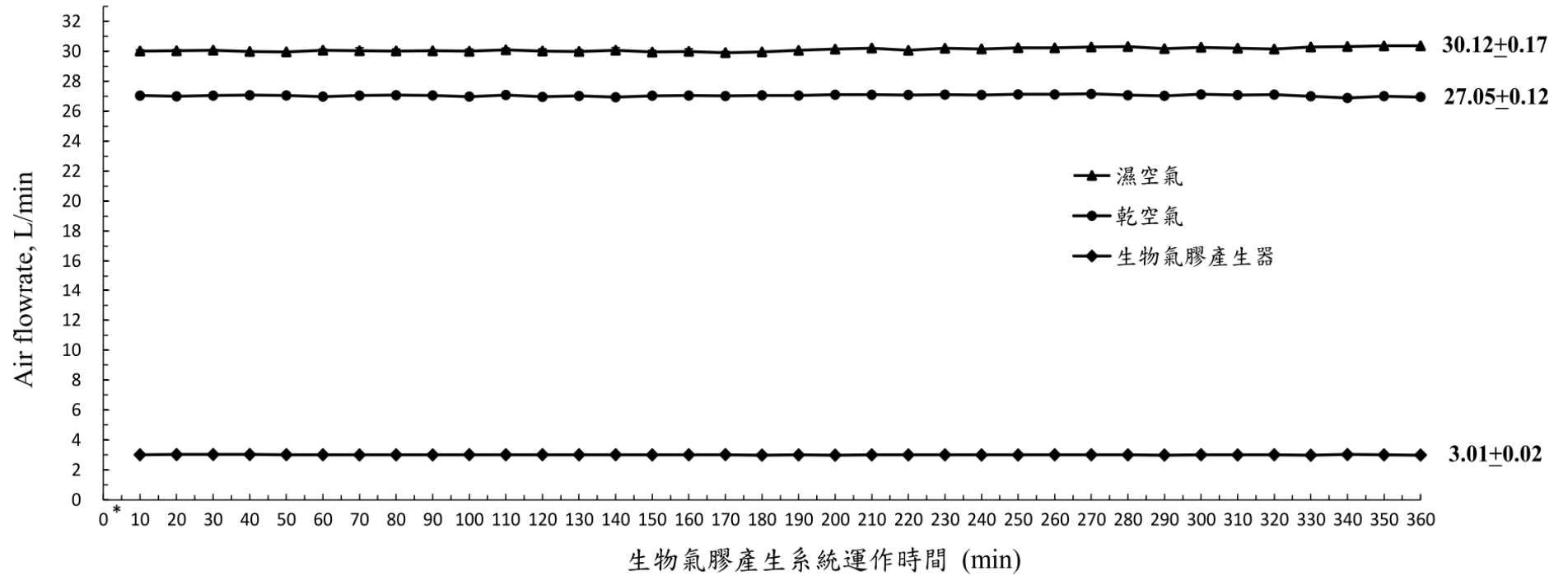


圖 7 濕空氣、乾空氣與生物氣膠產生器 (Nebulizer) 之流量值

(*0 min : 開啟系統壓縮空氣時間)

6.1.2 暴露艙相對濕度

暴露艙相對濕度測試結果如附表 4 所示，開啟系統壓縮空氣後之 20 分鐘內，三次測試之暴露艙中相對濕度平均值為 51.93%與 54.90%，低於系統原先設定之 55%~60%，且三次批次之 CV 值介於 6.48%至 6.63%。當開啟系統壓縮空氣 30 至 360 分鐘間，暴露艙中 RH 介於 57.37%與 60.33%，其平均值為 59.07%，CV 值為 1.58%（附表 4）。由於開啟系統壓縮空氣後之 30 至 360 分鐘，暴露艙中 RH 較為穩定且為系統預設之 RH 範圍（55~60%）（圖 8）。因此，後續實驗均於系統開啟壓縮空氣 20 分鐘後，其 RH 達預設且穩定階段時，將 *S. aureus* 懸浮菌液置入 Nebulizer 中以進行氣懸。

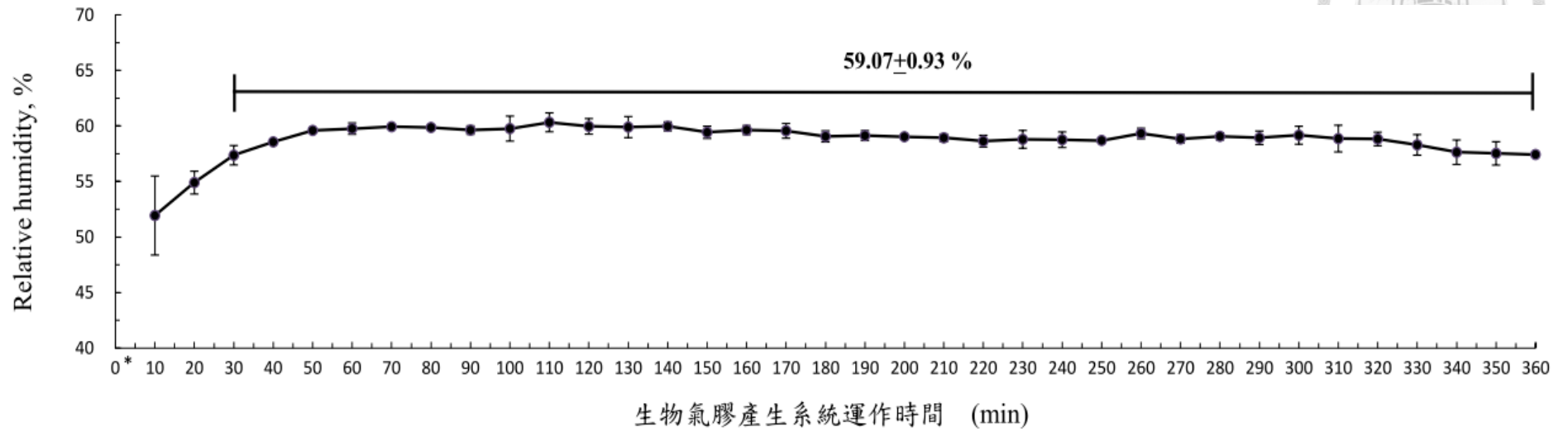


圖 8 暴露艙中相對濕度測試值

(*0 min：開啟系統壓縮空氣時間)

6.1.3 生物氣膠產生器中 *S. aureus* 菌液濃度

如圖 9 所示，於開啟系統壓縮空氣產生生物氣懸後之 20 分鐘至 320 分鐘間，Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度呈現持續下降現象。當開啟系統運作至 80、230 與 320 分鐘時，Nebulizer 中之菌液濃度為未氣懸前菌液濃度（系統運作時間 20 分鐘時）之 52.02%、10.48%與 5.36%（附表 5）。

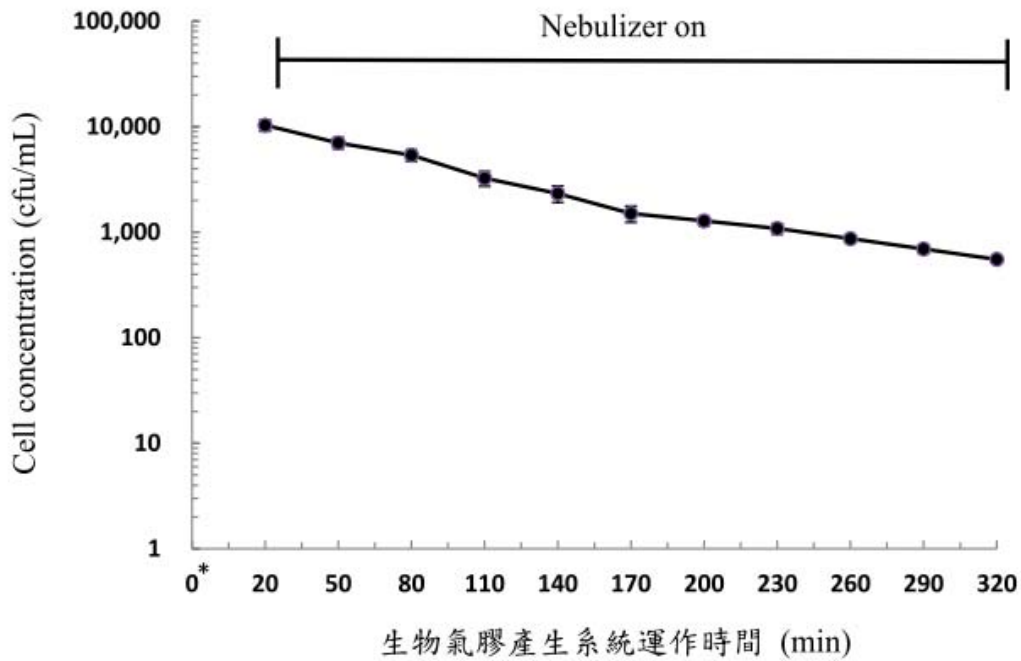


圖 9 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度

(*0 min：開啟系統壓縮空氣時間)

6.1.4 暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度

如圖 10 顯示，暴露艙空氣中之 *S. aureus* 濃度於系統運作之 40 分鐘至 310 分鐘間呈現下降趨勢。在系統運作至 130、220 與 310 分鐘時，暴露腔內空氣中 *S. aureus* 濃度為系統運作 40 分鐘時 Andersen 1-STG 於暴露艙內第一次採樣所得濃度(系統運作 30-50 分鐘時) 之 21%、11%與 6% (附表 6)。

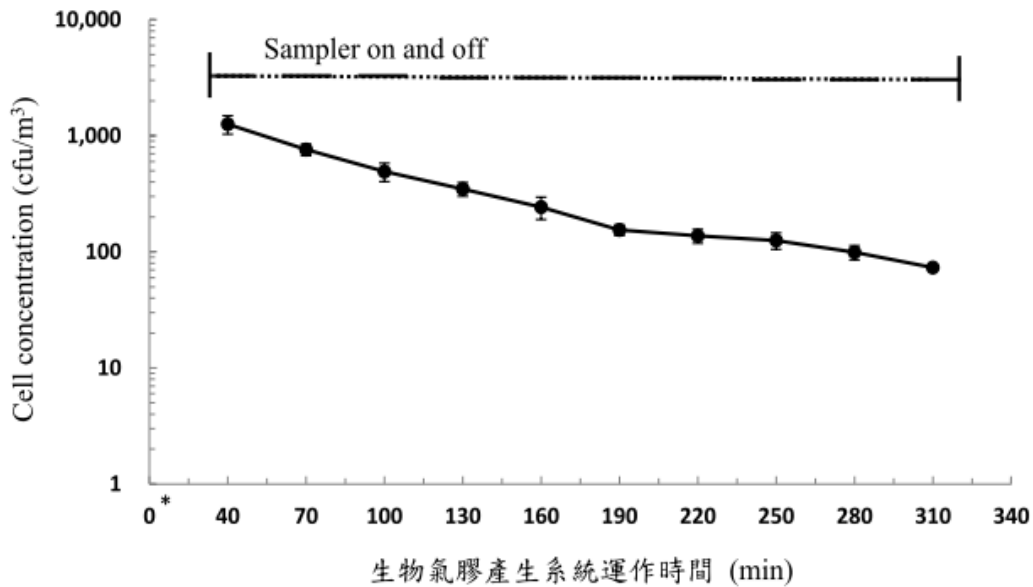


圖 10 暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度

(*0 min：開啟系統壓縮空氣時間；實線：Sampler on，亦即以 Andersen 1-STG 採樣 20 分鐘；虛線：Sampler off)

6.1.5 採樣效能指標 (R)

將 Nebulizer 中菌液濃度 (附表 5) 與暴露艙空氣中細菌濃度 (附表 6) 合併製圖，觀察隨系統運作時間之下降趨勢，結果如圖 11 所示，下降幅度相似。因此進一步計算以 Andersen 1-STG 於暴露艙中採樣 20 分鐘測得之細菌濃度 (附表 6) 與該次空氣採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度 (附表 5) 平均值之比值 (R)，其結果如附表 7 與圖 12 所示。當系統運作 30 分鐘至 50 分鐘時，三次重複實驗所得之平均 R 值為 0.14，其 CV 為 16.83%；而系統運作 60 至 320 分鐘間所進行的第二次至第十次空氣採樣，三次重複實驗所得之平均 R 值介於 0.11 至 0.13，CV 值則均小於 15%，介於 2.54% 至 14.89%，總平均 R 值為 0.12，顯示系統運作時間 60 至 320 分鐘間，其 R 值較為穩定 (圖 12)。

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

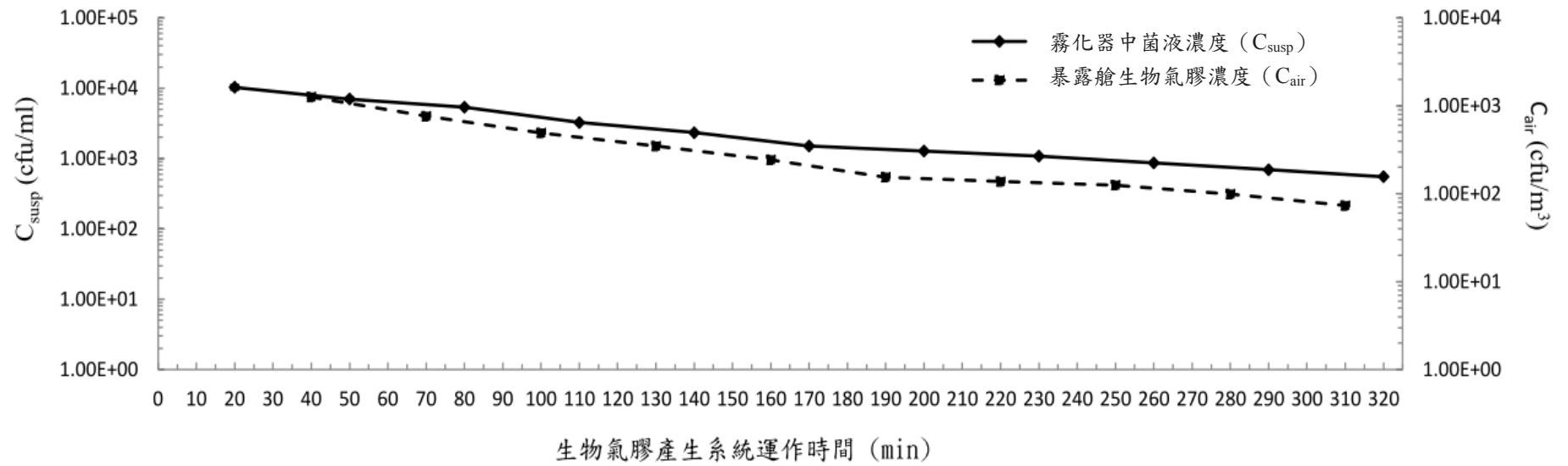


圖 11 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度與暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度隨系統運作下降趨勢圖

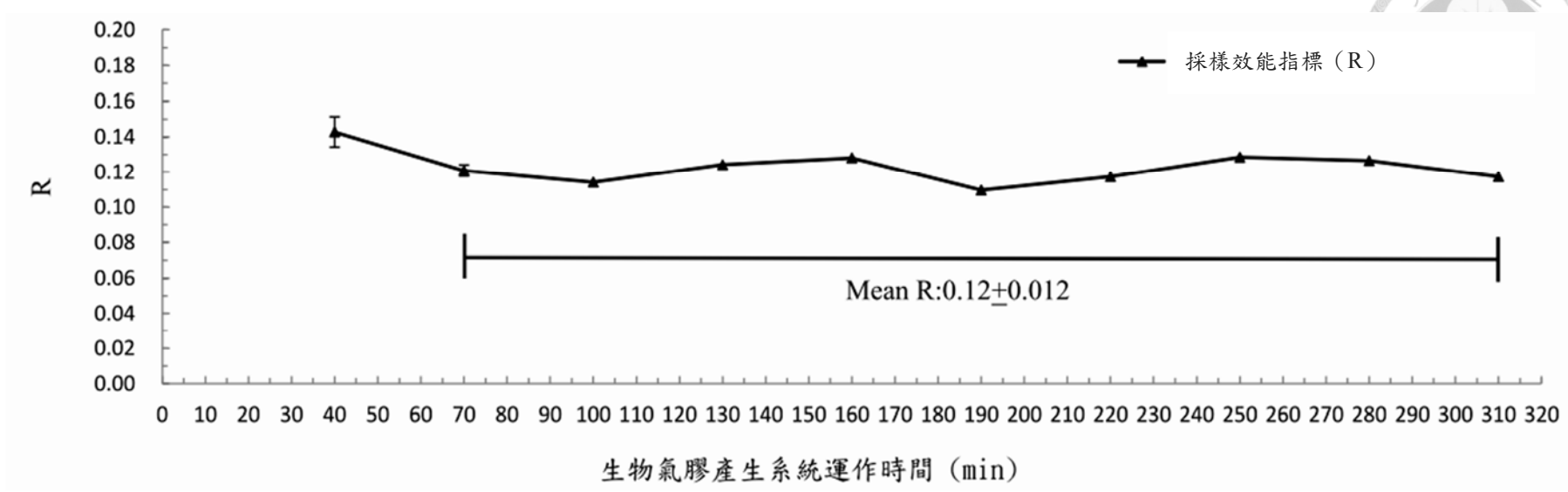
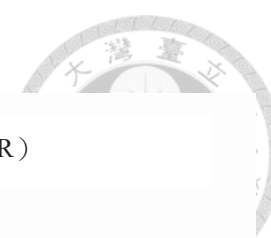


圖 12 採樣效能指標 (R)

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

6.1.6 *S. aureus* 粒徑分佈

在三種空氣流量（濕空氣、乾空氣與 Nebulizer 流量）、暴露艙相對濕度與採樣效能指標皆達穩定之運作時間區段內（亦即 60 分鐘至 320 分鐘內），以 APS 每 5 分鐘偵測一次暴露艙空氣中微粒，共偵測 150 分鐘，取得 30 筆數據，並重複測試三次，其高濃度（ 10^8 CFU/mL）與中濃度（ 10^7 CFU/mL）粒徑分佈數據如附表 8 附表 10 所示，而低濃度（ 10^5 CFU/mL）部分，由於菌液經氣懸後進入暴露艙中微粒數較少，以 APS 偵測時無法清楚呈現暴露艙空氣中微粒濃度與其粒徑分佈，故無顯示數據。進一步計算測量數據顯示，高濃度 *S. aureus* 氣動粒徑之 GM 為 $0.77 \mu\text{m}$ ，GSD 為 1.17（圖 13 與附表 9），而中濃度 *S. aureus* 氣動粒徑之 GM 為 $0.78 \mu\text{m}$ ，GSD 為 1.15（圖 14 與附表 11），顯示暴露艙空氣中之高與中濃度之 *S. aureus* 皆為單一粒徑分佈。

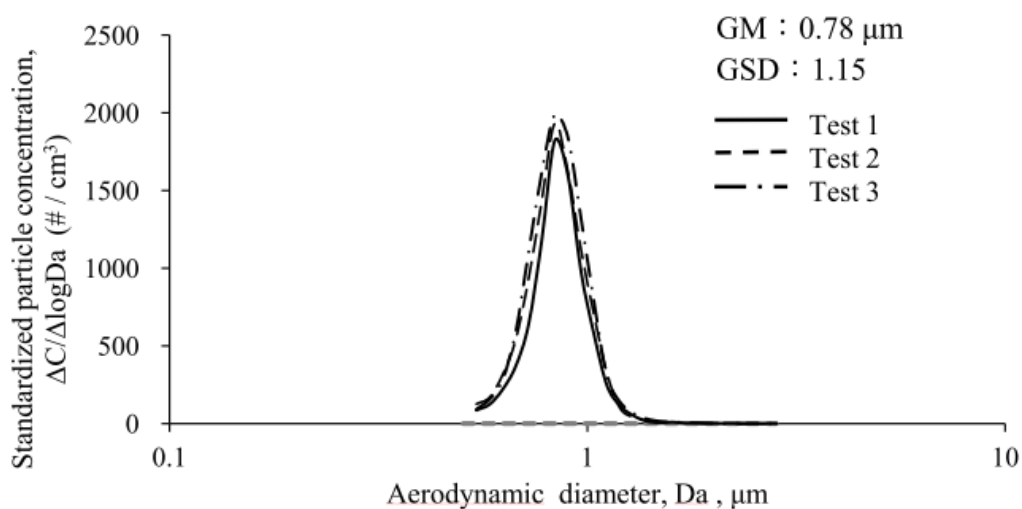


圖 13 以氣動粒徑分析儀（Aerodynamic particle sizer）所得暴露艙中高濃度 *S. aureus* 之粒徑分佈

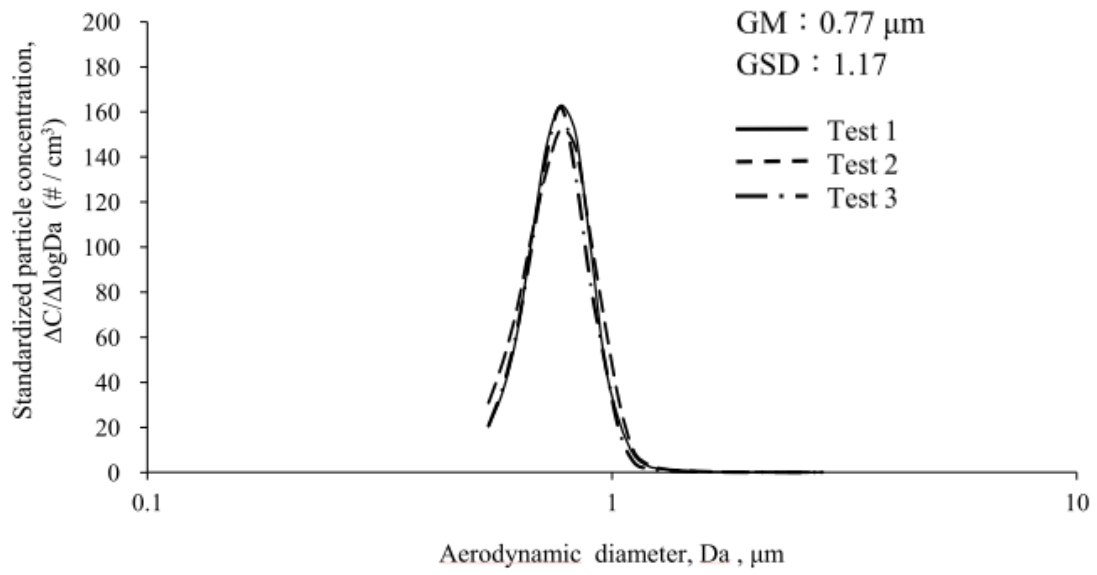


圖 14 以氣動粒徑分析儀 (Aerodynamic particle sizer) 所得暴露艙中中濃度 *S. aureus* 之粒徑分佈



6.2 以固體培養基為採樣介質之採樣器效能評估

6.2.1 選定最佳空氣採樣培養基

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

結果表 6 所示，Andersen 1-STG 搭配 TSA 採樣之 R 平均值為 0.139 (CV = 16.37%)，而以 Andersen 1-STG 搭配 MSA、BPA、CSA 與 CSM 採樣，其 R 平均值分別為 0.085、0.069、0.066 與 0.061。若將 TSA 之平均 R 值設為 1，MSA 之平均 R 值為 TSA 的 0.61 倍，而 BPA、CSA 與 CSM 之平均 R 值分別為 TSA 的 0.49、0.48 與 0.44 倍。

進一步將五種培養基之 R 值以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 進行統計檢定，結果如表 6 所示，非選擇性培養基 TSA 之 R 值顯著高於 MSA、BPA、CSA 與 CSM 等選擇性培養基之 R 值，而四種選擇性培養基之 R 值彼此間無顯著差異 (表 6，Kruskal Wallis test, $p = 0.0092$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)。顯示當五種培養基在相同空氣採樣條件下 (相同系統流量、溫濕度環境、生物氣膠採樣器與採樣時間)，TSA 能採集到並培養出來之空氣中 *S. aureus* 顯著多於其他四種選擇性培養基，亦即 TSA 之空氣採樣效能顯著優於其他四種選擇性培養基。

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

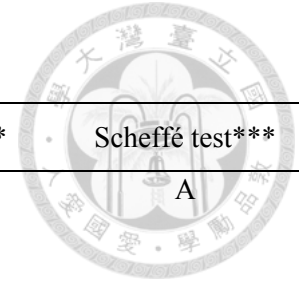


表 6 五種 *S. aureus* 培養基之空氣採樣效能 (R) 與統計檢定結果

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

*設 TSA 之平均 R 值為 1，其他培養基與其相對 R 值

**Kruskal Wallis test

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



6.2.2 時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響

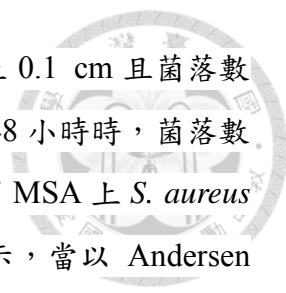
本實驗係以 Andersen 1-STG 搭配採樣效能較佳之 TSA 與 MSA 兩種培養基，分別進行不同時間之空氣採樣，以了解時間因子對該採樣方法效能之影響。實驗操作上係將內置有 TSA 或 MSA 之 Andersen 1-STG 於系統暴露艙中進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣。且於每次空氣採樣前後，以推盤法定量 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度，進一步計算該採樣時間下所得之採樣效能 (R)。

對於非選擇性培養基 TSA (表 7)，在採樣時間為 3、6、15、30 與 60 分鐘時，其 R 平均值分別為 0.179、0.139、0.111、0.130 與 0.132。若以 TSA 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘採樣平均 R 值的 0.77、0.62、0.72 與 0.73 倍 (表 7)。進一步以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 對五種採樣時間之 R 值進行統計檢定，結果顯示，採樣 3 分鐘時之 R 值顯著高於採樣 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值 (表 7, Kruskal Wallis test, $p = 0.008$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)；而採樣 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值彼此之間則無統計上顯著差異。

至於在選擇性培養基 MSA 部分 (表 8)，採樣時間為 6、15、30 與 60 分鐘時，所得之 R 平均值分別為 0.119、0.085、0.084、0.088 與 0.083。若以 MSA 採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值則分別為 3 分鐘之平均 R 值的 0.72、0.71、0.74 與 0.70 倍 (表 8)。進一步進行統計檢定，結果發現採樣時間 3 分鐘之 R 值亦顯著高於採樣時間為 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值 (表 8, Kruskal Wallis test, $p = 0.0447$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)，且採樣時間 6、15、30 與 60 分鐘之 R 值彼此間亦未達統計上顯著差異。綜合上述結果，以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 或 MSA 進行 *S. aureus* 之空氣採樣時，於採樣 3 分鐘時之採樣效能最佳，而採樣時間 6 至 60 分鐘之採樣效能相近。

當以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，以了解兩種培養基於 3-60 分鐘採樣時間下之採樣效能是否有達統計上顯著差異。結果如表 9 所示，TSA 之採樣效能顯著高於 MSA。

在進行採樣時間評估時，研究發現其中採樣 60 分鐘之樣本需要培養較長的時間，才能正確評估其採樣效能。如圖 15 顯示之一代表範例，當以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 進行 60 分鐘之空氣採樣後，將培養基置於 37°C 培養箱培養至 18 小時時，其 *S. aureus* 菌落直徑小於 0.05 cm 且菌落數為 115 CFU，此時菌落外觀呈淡黃色；



當繼續培養至 24 小時時，培養基上菌落直徑增加至介於 0.05 至 0.1 cm 且菌落數亦增加至 173 CFU，而菌落外觀呈黃色；繼續延長培養時間至 48 小時時，菌落數增加至 288 CFU 且外觀呈金黃色。若培養時間大於 48 小時，則 MSA 上 *S. aureus* 菌落大小、數目或顏色上未再繼續出現明顯變化。以上結果顯示，當以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 進行 60 分鐘空氣採樣後，MSA 需於 37°C 下培養至 48 小時，才可觀察到所有被收集至 MSA 且可被培養出來之 *S. aureus* 菌落數；同樣進行 60 分鐘之空氣採樣之 TSA 則未發現此現象。至於以 TSA 與 MSA 進行 3、6、15 與 30 採樣之樣本，於培養 18 小時後皆已達到最大菌落數，故無須延長培養時間。

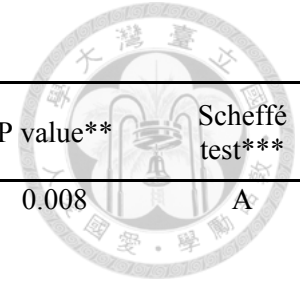


表 7 TSA 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)

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

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

**Kruskal Wallis test.

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

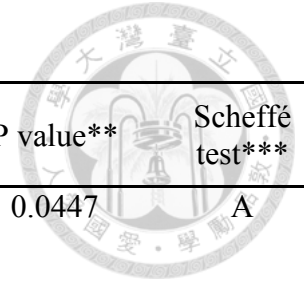


表 8 MSA 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)

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

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

**Kruskal Wallis test.

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

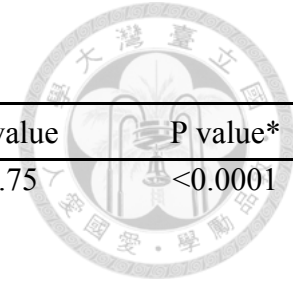


表 9 TSA 與 MSA 之採樣效能 (R) 統計檢定

培養基	採樣時間 (min)	樣本數 (n)	Mean R	SD	CV (%)	Z value	P value*
TSA	3	4	0.179	0.02	12.22	4.75	<0.0001
	6	4	0.139	0.02	16.30		
	15	4	0.111	0.01	6.70		
	30	4	0.130	0.01	5.93		
	60	4	0.132	0.01	7.60		
MSA	3	4	0.119	0.02	12.82		
	6	4	0.085	0.01	13.41		
	15	4	0.084	0.00	4.29		
	30	4	0.088	0.01	10.74		
	60	4	0.083	0.01	12.61		

*Wilcoxon rank sum test

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

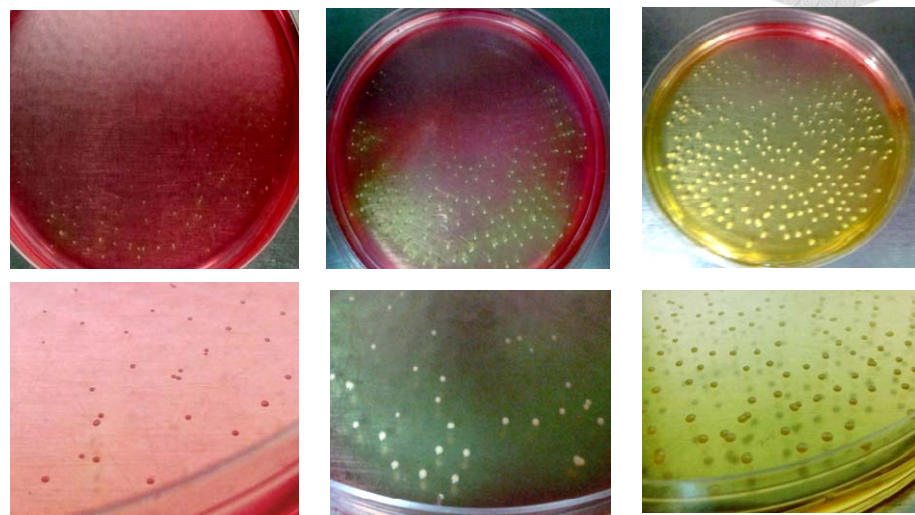


圖 15 以 Andersen 1-STG 搭配 MSA 採樣 60 分鐘後，將培養基置於 37°C 下培養 18 至 48 小時之 *S. aureus* 菌落圖片

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

6.3.1 評估 *S. aureus* 空氣採樣收集液之採樣效能

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

結果如表 10 所示，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣後以 TSA 推盤，其 R 平均值為 0.142 (CV = 3.85%)，搭配 PBS 與 DW 採樣之 R 平均值則分別為 0.112 與 0.025。若將 Tween 80 mixture 以 TSA 推盤之平均 R 值設為 1，則 PBS 與 DW 之平均 R 值分別為 Tween 80 mixture 的 0.79 與 0.17 倍。若改以選擇性培養基 MSA 推盤時，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣之 R 平均值則為 0.105 (CV = 7.36%)，而搭配 PBS 與 DW 採樣，其 R 平均值則分別為 0.092 與 0.012。以上數據顯示，AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，無論搭配何種培養基，其 R 值皆高於 PBS 與 DW。

進一步將三種收集液之 R 值以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 進行統計檢定，發現 Tween 80 mixture 之 R 值顯著高於 PBS 與 DW 之 R 值，而 PBS 之 R 值顯著高於 DW 之 R 值 (表 10, Kruskal Wallis test, $p = 0.0002$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)。顯示三種收集液於相同空氣採樣與分析條件下 (以同一種液體採樣器進行單一時間之空氣採樣，並以相同培養基進行推盤分析)，Tween 80 mixture 之採樣效能最佳。另以 Wilcoxon rank sum test 進行所有 TSA 與 MSA 之 R 值之統計檢定，以了解三種收集液於不同培養基推盤分析時，其採樣效能是否有達統計上顯著差異。結果顯示 TSA 之採樣效能顯著高於 MSA ($p = 0.0464$)。

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

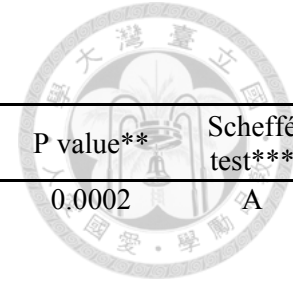


表 10 三種收集液之空氣採樣效能 (R) 與統計檢定結果

收集液	採樣時間 (min)	培養基	樣本數 (n)	R	R			Relative R*	χ^2 value	P value**	Scheffé test***
					Mean	SD	CV (%)				
Tween 80 mixture	3	TSA	4	0.139980	0.142	0.01	3.85	1	17.165	0.0002	A
				0.148846							
				0.136265							
				0.144701							
		MSA	4	0.108801	0.105	0.01	7.36	1			
				0.110285							
				0.093653							
				0.107989							
PBS		TSA	4	0.112589	0.112	0.01	10.12	0.79			B
				0.108736							
				0.127588							
				0.100421							
		MSA	4	0.097332	0.092	0.01	6.79	0.88			
				0.093584							
				0.094181							
				0.082974							
DW		TSA	4	0.024032	0.025	0.00	8.40	0.17			C
				0.023273							
				0.027802							
				0.023782							
		MSA	4	0.010939	0.012	0.00	10.82	0.11			
				0.010295							
				0.013092							
				0.012230							

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

**Kruskal Wallis test

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

6.3.2 評估 *S. aureus* 空氣採樣收集液之流失率

本研究評估 DW、PBS 與 Tween 80 mixture 於 AGI-30 與 BioSampler 兩種採樣器中，經過不同採樣時間之液體流失率。實驗方法係將內置有 DW、PBS 或 Tween 80 mixture 之 AGI-30 與 BioSampler 於暴露艙中進行 3、6 與 15 分鐘空氣採樣；並於每次空氣採樣前後，將採樣器秤重，以計算流失率。

結果如表 11 所示，於採樣 3、6 與 15 分鐘時，BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之流失率分別為 $4.31 \pm 0.36\%$ 、 $8.65 \pm 0.46\%$ 與 $20.91 \pm 1.28\%$ ，搭配 PBS 時其流失率分別為 $3.33 \pm 0.21\%$ 、 $6.17 \pm 0.76\%$ 與 $11.72 \pm 0.7\%$ ，而搭配 DW 時其流失率則分別為 $4.49 \pm 0.29\%$ 、 $8.04 \pm 0.39\%$ 與 $18.08 \pm 0.48\%$ 。顯示三種收集液中以 PBS 之流失率較低，且三種收集液之流失率均隨採樣時間增加而上升。此現象在 AGI-30 時亦同，亦以搭配 PBS 之流失率最低（3、6 與 15 分鐘採樣時之流失率：PBS 分別為 $2.8 \pm 0.12\%$ 、 $5.0 \pm 0.5\%$ 與 $10.78 \pm 0.66\%$ ；Tween 80 mixture 為 $3.65 \pm 0.14\%$ 、 $7.03 \pm 0.53\%$ 與 $16.64 \pm 1.03\%$ ；DW 為 $3.37 \pm 0.12\%$ 、 $6.49 \pm 0.53\%$ 與 $14.97 \pm 1.2\%$ ），且當採樣時間增加時，三種收集液之流失率亦隨之上升。

進一步檢定不同收集液體與不同採樣時間對液體流失率之影響，結果顯示（表 12 與表 13），三種收集液與二種採樣器之流失率彼此間無統計上顯著差異；然採樣 15 分鐘時之流失率顯著高於採樣 3 與 6 分鐘者，且採樣 6 分鐘時之流失率亦顯著高於採樣 3 分鐘時之流失率（表 12，Kruskal Wallis test， $p < 0.0001$ ，Scheffé test， $p < 0.05$ ）。

表 11 BioSampler 與 AGI-30 搭配三種收集液於採樣時間 3、6 與 15 分鐘下之液體流失率

採樣時間 (min)	收集液	液體流失率 (%)							
		BioSampler				AGI-30			
		樣本數(n)	Mean	SD	CV (%)	樣本數(n)	Mean	SD	CV (%)
3	Tween 80 mixture	4	4.31	0.36	8.39	4	3.65	0.14	3.96
	PBS	4	3.33	0.21	6.21	4	2.80	0.12	4.29
	DW	4	4.49	0.29	6.34	4	3.37	0.12	3.51
6	Tween 80 mixture	4	8.65	0.46	5.34	4	7.03	0.53	7.59
	PBS	4	6.17	0.76	12.34	4	5.00	0.50	9.97
	DW	4	8.04	0.39	4.81	4	6.49	0.53	8.12
15	Tween 80 mixture	4	20.91	1.28	6.10	4	16.64	1.03	6.17
	PBS	4	11.62	0.70	5.99	4	10.78	0.66	6.16
	DW	4	18.08	0.48	2.67	4	14.97	1.20	8.00

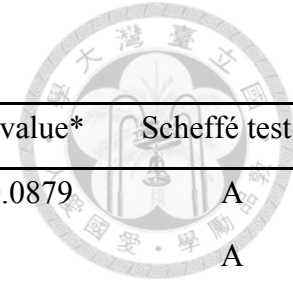


表 12 不同收集液與採樣時間之液體流失率統計檢定

		樣本數 (n)	平均流失率 (%)	SD (%)	CV (%)	χ^2 value	P value*	Scheffé test**
收集液	Tween 80 mixture	24	10.20	7.02	68.82	4.8636	0.0879	A
	PBS	24	6.62	3.75	56.74			A
	DW	24	9.24	5.95	64.37			A
採樣時間	15	24	15.50	3.87	24.95	62.688	<0.0001	A
	6	24	6.90	1.32	19.15			B
	3	24	3.66	0.64	17.42			C

*Kruskal Wallis test.

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

表 13 BioSampler 與 AGI-30 之液體流失率統計檢定

採樣器	樣本數 (n)	平均流失率 (%)	SD (%)	CV (%)	Z value	P value*
BioSampler	36	9.51	6.25	65.67	1.5035	0.1327
AGI-30	36	7.86	5.13	65.25		

*Wilcoxon rank sum test



6.3.3 時間因子對 AGI-30 採樣效能之影響

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

以 AGI-30 搭配 PBS 採樣時(圖 16)，生物氣膠產生系統內 Nebulizer 中 *S. aureus* 細菌濃度 (C_{susp}) 隨系統運作時間增長，呈現逐漸下降之趨勢。而 AGI-30 於四重覆之實驗中，皆依序進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣，其於暴露艙採樣所得之空氣中細菌濃度 (C_{air}) 亦出現隨採樣時間與系統運作時間增加而下降之趨勢(圖 16)。顯示當以 AGI-30 搭配 PBS 於暴露艙採樣時，其所得空氣中細菌濃度與 Nebulizer 中細菌濃度之變化趨勢一致。

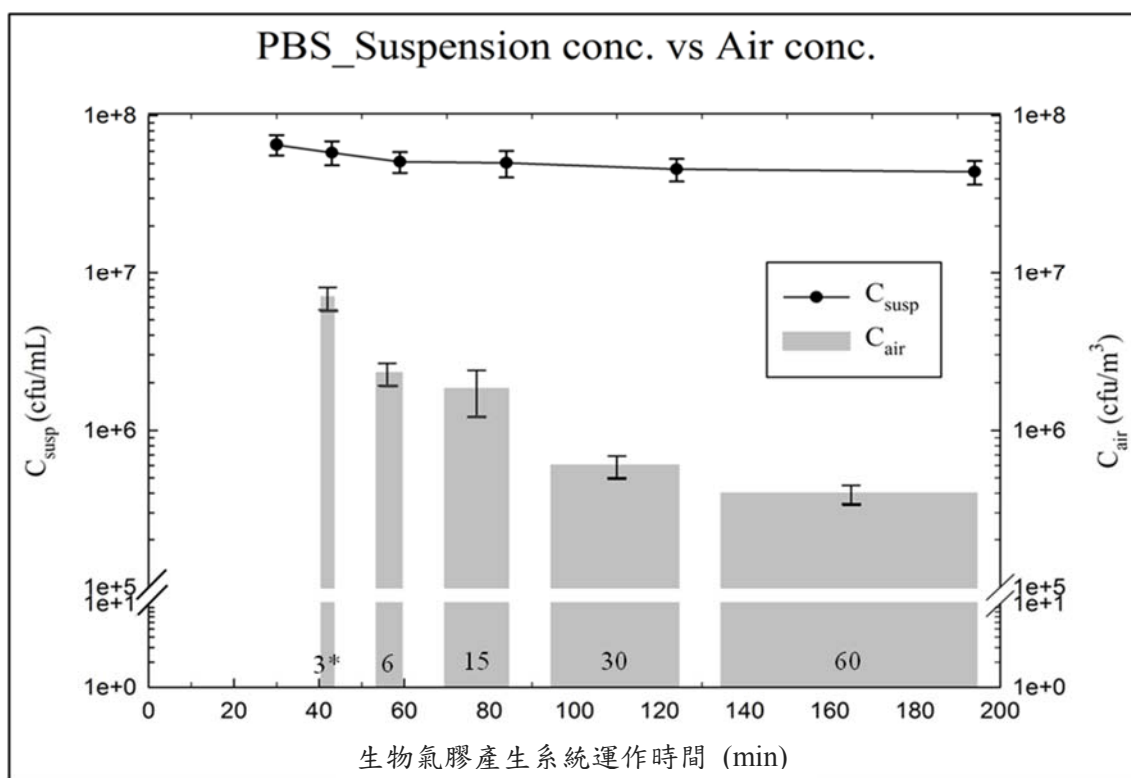


圖 16 以 AGI-30 搭配 PBS 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer (C_{susp}) 與暴露艙空氣中細菌濃度 (C_{air}) (*空氣採樣時間 (min))

當以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，亦可發現 Nebulizer 中 *S. aureus*

細菌濃度 (C_{susp}) 隨系統運作時間延長而逐漸下降 (圖 17)。然有別於 PBS 的結果 (圖 16)，當以 AGI-30 結合 Tween 80 mixture 如前述方式進行五種不同時間空氣採樣時，其所得之空氣中細菌濃度 (C_{air}) 隨採樣時間與系統運作時間增長卻出現先升後降之現象，亦即於採樣 6 分鐘所測得之空氣細菌濃度較前次採樣 3 分鐘時為高，且後續採樣 15 與 30 分鐘時所得之空氣中細菌濃度與採樣 3 分鐘之濃度相比，亦無明顯下降現象 (圖 17)。此結果顯示，以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於暴露艙採樣時，其收集到之空氣中 *S. aureus* 濃度與 Nebulizer 中細菌濃度之變化趨勢相異。

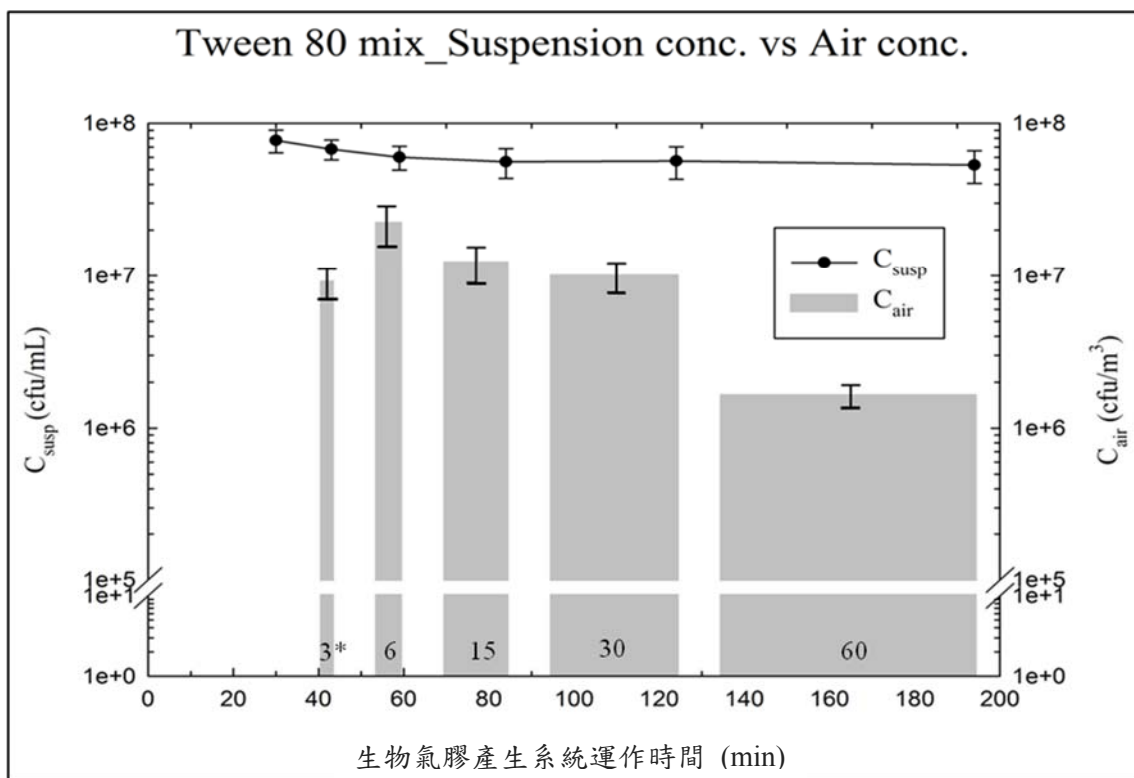


圖 17 以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行不同時間之空氣採樣時 Nebulizer (C_{susp}) 與暴露艙空氣中細菌濃度 (C_{air}) (*空氣採樣時間 (min))

進一步將 PBS 與 Tween 80 mixture 採樣所得之空氣中細菌濃度以 Nebulizer 中細菌濃度進行校正，以計算不同採樣時間之 R 值。PBS 之結果如表 14 所示，在採樣 3、6、15、30 與 60 分鐘時，其 R 平均值逐步下降，分別為 0.114、0.042、0.035、0.012 與 0.009。若以採樣 3 分鐘之平均 R 值為 1，採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘採樣平均 R 值的 0.37、0.3、0.11 與 0.08 倍 (表 14)。將以上五

種採樣時間之 R 值進行統計檢定，結果顯示，採樣 3 分鐘時其 R 值顯著高於採樣 6、15、30 與 60 分鐘時之 R 值，而採樣 6 與 15 分鐘時其 R 值亦顯著高於採樣 30 與 60 分鐘時之 R 值（表 14，Kruskal Wallis test， $p = 0.0014$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$ ）。此結果顯示，以 AGI-30 搭配 PBS 進行 *S. aureus* 3-60 分鐘採樣，其採樣效能隨採樣時間增加而下降。

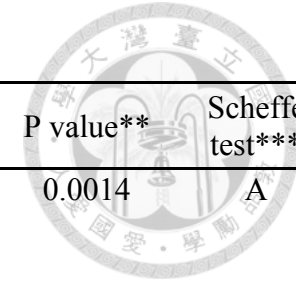



表 14 AGI-30 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)

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

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

**Kruskal Wallis test

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



AGI-30 結合 Tween 80 mixture 採樣所得 R 值則如表 15 所示，採樣 3、6、15、30 與 60 分鐘下之 R 平均值分別為 0.124、0.342、0.208、0.175 與 0.03，其中 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘之平均 R 值的 2.75、1.67、1.41 與 0.24 倍（表 15）。統計檢定結果則顯示，採樣 6 分鐘時之 R 值顯著高於採樣 3、15、30 與 60 分鐘時之 R 值，採樣 15 分鐘之 R 值亦顯著高於採樣 3 與 60 分鐘時之 R 值，而採樣 3 與 30 分鐘之 R 值亦顯著高於採樣 60 分鐘之 R 值（表 15，Kruskal Wallis test, $p = 0.0013$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$ ）。顯示當以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 3-60 分鐘採樣時，相較於初始之 3 分鐘採樣結果，其採樣效能隨採樣時間增加，在採樣 6-30 分鐘時出現不降反升現象，此採樣效能之變化情形與 AGI-30 於暴露艙採樣所得之空氣中細菌濃度變化趨勢（圖 17）一致，然相異於 Nebulizer 中細菌濃度之變化趨勢（圖 17）。Nebulizer 為系統產生生物氣膠之來源，由於系統運作期間 Nebulizer 內菌液濃度隨時間而下降（圖 17），故由此氣懸而進入暴露艙中之細菌濃度亦應隨之為下降，然以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣暴露艙內細菌時，卻出現其所定量之細菌濃度與採樣效能皆出現不降反升之趨勢（圖 17 與表 15），此現象是否為 Tween 80 mixture 於採樣過程中導致 *S. aureus* 增生，抑或存在其他原因，值得後續進一步研究加以釐清。

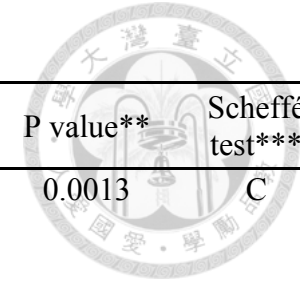


表 15 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)

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

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

**Kruskal Wallis test

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

6.3.4 時間因子對 BioSampler 採樣效能之影響

本實驗操作流程與 AGI-30 相同，係以 BioSampler 搭配採樣效能較佳之 Tween 80 mixture 與 PBS 兩種收集液，進行不同時間之空氣採樣，以了解時間因子對該採樣方法效能之影響。同樣將 BioSampler 搭配 PBS 與 Tween 80 mixture 採樣所得之空氣中細菌濃度以 Nebulizer 中細菌濃度進行校正，以計算不同採樣時間之 R 值。PBS 之結果如表 16 所示，在採樣時間為 3、6、15、30 與 60 分鐘時，其 R 平均值分別為 0.341、0.266、0.238、0.136 與 0.09，且採樣 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘採樣平均 R 值的 0.78、0.7、0.4 與 0.26 倍（表 16）。統計結果則顯示五種採樣時間之 R 值彼此間皆達統計顯著差異（表 16，Kruskal Wallis test， $p = 0.0011$ ，Scheffé test 事後檢定， $p < 0.05$ ）。由上述可知，BioSampler 搭配 PBS 進行 3-60 分鐘空氣採樣，其採樣效能隨採樣時間增加而下降。此現象與 AGI-30 搭配 PBS 進行 3-60 分鐘空氣採樣結果（表 14）相似。

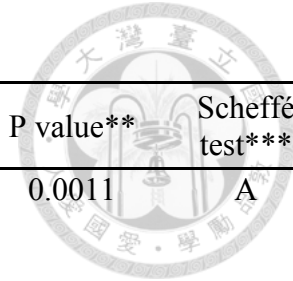



表 16 BioSampler 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)

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

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

**Kruskal Wallis test

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



當以 Tween 80 mixture 搭配 BioSampler 進行 3、6、15、30 與 60 分鐘時，所得之 R 平均值分別為 0.326、0.376、0.369、0.294 與 0.175，其中 6、15、30 與 60 分鐘之平均 R 值分別為 3 分鐘之 R 值的 1.16、1.13、0.9 與 0.54 倍（表 17）。統計檢定發現，採樣 6 分鐘時其 R 值顯著高於採樣 3、30 與 60 分鐘時之 R 值，採樣 15 分鐘時其 R 值亦顯著高於採樣 30 與 60 分鐘時之 R 值，而採樣 3 與 30 分鐘時其 R 值皆顯著高於採樣 60 分鐘時之 R 值（表 17，Kruskal Wallis test, $p = 0.0018$ ，Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$ ）。顯示以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 進行 3-60 分鐘空氣採樣時，採樣 6 分鐘之採樣效能顯著優於 3 分鐘，而採樣時間大於 15 分鐘時，其採樣效能則隨採樣時間增加而下降。與表 15 相比，發現當以 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，6 分鐘之採樣效能皆顯著高於 3 分鐘之 R 值，且為 3-60 分鐘採樣下之最高者，之後即隨採樣時間增長而逐步下降；然即便如此，其 15 分鐘之 R 平均值均高於初始之 3 分鐘採樣結果。

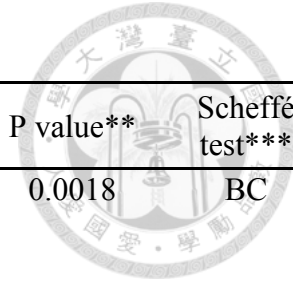


表 17 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 於不同採樣時間下之採樣效能 (R)

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

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

**Kruskal Wallis test

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



6.3.5 以收集液為採樣介質之生物氣膠採樣方法比較

6.3.5.1 BioSampler 與 AGI-30 之採樣效能

以 Wilcoxon rank sum test 對所有以 BioSampler 與 AGI-30 採樣所得之 80 筆 R 值 (表 14-表 17) 進行統計檢定, 以了解兩種採樣器搭配不同收集液於 3-60 分鐘採樣時間下之採樣效能是否具統計上顯著差異。結果顯示, BioSampler 之採樣效能顯著高於 AGI-30 ($p < 0.0001$)。

6.3.5.2 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能

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

6.3.5.3 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能

以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 對 BioSampler 與 AGI-30 搭配兩種收集液之四種採樣方法所得 R 值進行統計檢定, 結果顯示 (表 18), BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 於 3-60 分鐘採樣下之採樣效能顯著高於其他三種採樣方法 (表 18, Kruskal Wallis test, $p < 0.0001$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$); 反之, AGI-30 搭配 PBS 之採樣效能最低 ($p < 0.05$)。至於 BioSampler 搭配 PBS 以及 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能則介於其間, 彼此未達統計上顯著差異。

表 18 BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 之採樣效能 (R) 統計檢定

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

*Kruskal Wallis test.

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

6.4 Andersen 1-STG、AGI-30 與 BioSampler 之採樣效能比較

將本研究評估之 Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA、AGI-30 與 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 與 PBS 等六種採樣方法所得 R 值，以 Kruskal-Wallis test 與事後 Scheffé test 進行統計檢定，以了解其採樣效能。結果如表 19 所示，BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能最佳，顯著高於其他五種採樣方法；BioSampler 搭配 PBS 以及 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 次之；然值得注意的是，AGI-30 搭配 PBS 之採樣效能最差，其 R 值甚至顯著低於 Andersen 1-STG 搭配 TSA 之結果，並略遜於 Andersen 1-STG 搭配 MSA 之 R 值(表 19, Kruskal Wallis test, $p < 0.0001$, Scheffé test 事後檢定, $p < 0.05$)。

表 19 Andersen 1-STG、BioSampler 與 AGI-30 之採樣效能 (R) 統計檢定

採樣器	採樣介質	採樣時間 (min)	樣本數 (n)	Mean R	SD	CV (%)	χ^2 value	P value**	Scheffé test***
Andersen 1-STG	TSA	3	4	0.179	0.02	12.22	76.0269	<0.0001	CD
		6	4	0.139	0.02	16.30			
		15	4	0.111	0.01	6.70			
		30	4	0.130	0.01	5.93			
		60	4	0.132	0.01	7.60			
	MSA	3	4	0.119	0.02	12.82			DE
		6	4	0.085	0.01	13.41			
		15	4	0.084	0.00	4.29			
		30	4	0.088	0.01	10.74			
		60	4	0.083	0.01	12.61			
BioSampler	Tween 80 mixture*	3	4	0.326	0.01	4.52	A		
		6	4	0.376	0.03	8.16			
		15	4	0.369	0.02	4.76			
		30	4	0.294	0.02	7.48			
		60	4	0.175	0.01	6.14			
	PBS	3	4	0.341	0.01	2.49	B		
		6	4	0.266	0.01	3.59			
		15	4	0.238	0.01	2.87			
		30	4	0.136	0.01	7.61			
		60	4	0.090	0.00	1.46			
AGI-30	Tween 80 mixture	3	4	0.124	0.02	14.44	BC		
		6	4	0.342	0.05	14.22			
		15	4	0.208	0.03	14.13			
		30	4	0.175	0.01	6.19			
		60	4	0.030	0.00	8.93			
	PBS	3	4	0.114	0.01	11.70	E		
		6	4	0.042	0.01	14.72			
		15	4	0.035	0.01	16.07			
		30	4	0.012	0.00	11.38			
		60	4	0.009	0.00	7.16			

*液體採樣器之收集液皆推盤至 TSA

**Kruskal Wallis test.

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

第七章 討論

7.1 *S. aureus* 氣膠產生系統

本研究建置經穩定性測試與評估之 *S. aureus* 氣膠產生系統，確定其於開啟壓縮空氣 60 分鐘後至 270 分鐘之系統運作期間，具穩定系統流量、暴露艙相對濕度與效能評估指標 (R)，且暴露艙中 *S. aureus* 氣膠呈單一粒徑分佈。採樣效能評估測試皆於此時間區段內進行，以減少系統變動性與其他於實際現場採樣時其環境因子對採樣介質、採樣時間與採樣器本身所提供之採樣效能之干擾；此外，Nebulizer 提供之單一菌源可使評估對象清楚呈現其對於空氣中 *S. aureus* 之採樣效能，而不受其他菌種干擾。文獻指出，環境空氣中之細菌濃度、生理特性與菌種分佈與採樣當地環境特性（人口密度、職場作業性質、相對濕度、風速與風向等）有關，因此於實場環境採樣較難進行採樣方法之比較，例如細菌於環境相對濕度較高時，其整體回收率亦高，若環境中相對濕度變動程度大或變動頻率高，則評估結果亦會出現較大變異性，此外當環境中出現具孢子或其他生理結構較為堅實之優勢菌種，易使欲收集然生理結構相對脆弱之目標致病菌之回收率下降 (Thompson et al. 1994)。

然未來應用於環境現場進行空氣中 *S. aureus* 暴露風險評估前，尚須進行採樣與分析方法之實場比較，以瞭解混合菌群與環境特性等複雜因子對不同採樣分析方法之影響。



7.2 以固體培養基為採樣介質之採樣方法效能評估

7.2.1 選定 *S. aureus* 最佳空氣採樣培養基

7.2.1.1 非選擇性與選擇性培養基

本實驗以 Andersen 1-STG 隨機搭配非選擇性培養基 TSA 與四種適用於 *S. aureus* 之選擇性培養基 MSA、BPA、CSA 與 CSM 於暴露艙進行 6 分鐘之空氣採樣，並以其空氣採樣濃度與其採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度平均值之比值 (R)，顯示其採樣效能。統計結果顯示，TSA 之採樣效能顯著高於 MSA、BPA、CSA 與 CSM 之採樣效能，此結果意味著在相同採樣條件（採樣器、抽氣流量、相對濕度與採樣時間）下，相較於選擇性培養基，無添加任何抑菌成份之非選擇性培養基可培養出較多 *S. aureus* 生物氣膠。Stewart 等人曾以 Andersen six stage sampler 搭配非選擇性 (TSA) 與選擇性培養基 (MacConkey agar 與 TSA plus 5% NaCl)，於暴露艙中對 *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) (適用之選擇性培養基為 MacConkey agar) 與 *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) (適用之選擇性培養基為 TSA plus 5% NaCl) 進行 15 分鐘之空氣採樣，而後計數培養基上菌落數以計算回收率 (Relative recovery, %)。其結果顯示，*P. fluorescens* 氣膠於 TSA 與 MacConkey agar 之回收率分別為 20±4% 與 0%，而 *M. luteus* 氣膠於 TSA 與 TSA plus 5% NaCl 之回收率則分別為 14±3% 與 13±1%。該研究指出生物氣膠以衝擊方式收集至培養基上時，可能造成菌體結構損傷或喪失部分生理功能，致使較脆弱細菌 (*P. fluorescens*) 於選擇性培養基上的回收率下降 (Stewart et al. 1995)。

然 2011 年 Hsiao 等人發現非選擇性 TSA 與選擇性培養基 CSA 對於 *S. aureus* 生物氣膠之回收率相似。該研究使用的係與本研究相同之 *S. aureus* (ATCC 29213)，其實驗過程係以 Andersen 1-STG 搭配不同培養基於暴露艙進行 7 分鐘空氣採樣，而後計數菌落數以計算不同培養基之採樣效能 (Relative recovery, RR；等同於本研究之 R)。其結果顯示，於相對溼度 RH 為 55% 時，TSA 與 CSA 之 RR 值相似 (0.5-0.9) (Hsiao et al. 2011)。而本研究 TSA 與 CSA 之採樣效能分別為 0.139 與 0.061，且 TSA 採樣效能顯著高於 CSA。推測造成兩者差異之可能原因包括：不同的生物氣膠採樣器評估系統 (如：Nebulizer 之壓力 (Hsiao 等人為 20 psi)、系統總流量 (Hsiao 等人為 50 L/min)、連接 Nebulizer 與暴露艙之管線長度與材質等)、不同的空氣採樣時間 (Hsiao 等人為 7 分鐘) 以及採樣結束至 37°C 培養之時間間隔等。



7.2.1.2 選擇性培養基

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

在 CSM 部分，其成分與篩選原理皆與 MSA 相近，然關於其鑑定準確度或 Recovery 之研究相當有限，觀察過往於實場環境進行 *S. aureus* 空氣採樣後之樣本處置方法發現，研究者以 Andersen sampler 搭配 TSA (Gandara et al. 2006) 或 NA (Perez et al. 2011) 完成空氣採樣並將 TSA 與 NA 培養一至二日後，再將生長之菌落接種至 CSM 並接續培養二日，其後再進行生化鑑定。雖然兩篇文獻的作者並未說明為何以接種方式培養至 CSM 而未直接以 CSM 進行空氣採樣，然以本研究實驗結果而論，因其採樣效能最低，上述兩篇文獻之做法亦是本研究建議使用 CSM 培養基之方式，亦即先以非選擇性培養基進行空氣採樣以獲得高採樣效能，再接種至空氣採樣效能相對較差之 CSM，以進行後續生化鑑定。此作法的優點係可避免因培養基採樣效能較低，致使於空氣採樣過程中損失較多具可培養性之 *S. aureus*，致使研究者低估環境空氣中 *S. aureus* 之濃度；然其缺點為耗時且鑑定過程較為繁瑣。

在 MSA、BPA、CSA 與 CSM 部分，1995 年 Sato 等人發現對於泳池中之水樣，BPA、MSA、CSM、Vogel Johnson 與 m-Staphylococcus agar 等培養基之 *S. aureus* 回收率分別為 28.6%、22.9%、21.0%、19.1%、11.4% (表 20)，然五種培養基之回收率未達統計上顯著差異 (Sato et al. 1995)。該研究在 MSA、BPA 與 CSM 之回收率統計結果與本研究之採樣效能相似 (MSA、BPA 與 CSM 之 R 值分別為 0.085 ± 0.01 、 0.069 ± 0.01 與 0.061 ± 0.01)，三者間均未達顯著差異。2010 年 Kim 與 Oh 亦有近似發現，該研究以 MSA、BPA、Vogel johnson、RAPID'Staph 與 CSA 等五種培養基測試米飯與魚肉中之 *S. aureus* 之回收率，結果發現回收率分別為 63.3%、70.0%、56.7%、53.3%、50.0% (表 20)，且五種培養基之回收率亦無統計上顯著差異 (Kim and Oh 2010)。上述結果顯示，環境水樣與食品中之 *S. aureus* 於三種培養基中被分離並培養出來之能力相近。水樣或食品之採樣過程及樣本前處理步驟

雖與空氣樣本相異，且 *S. aureus* 於水體或食品中之生理特性與其存在空氣中亦可能不同，然上述兩研究各自針對同類型樣本、以相同前處理步驟評估不同培養基對於環境水體與食品中 *S. aureus* 之回收率，亦可作為後續實場空氣採樣分析時選擇培養基之參考。

值得注意的是，2010 年 Kim 與 Oh 之研究亦評估 BPA、MSA、Vogel johnson、RAPID'Staph 與 CSA 之對於米飯與魚肉中 *S. aureus* 之鑑定能力，結果顯示除 MSA 之 Sensitivity 與 Specificity 分別為 96.5%與 66.6%外，其他四種培養基中皆為 100% (表 20)，亦即 BPA、MSA 與 CSA 之 *S. aureus* 回收能力相當，然 MSA 之鑑定準確度不足 (Kim and Oh 2010)。其中 BPA 部分，其內含 1%之 Sodium pyruvate 可促進具活性然不具可培養性 (viable but non- culturable, VBNC) 之 *S. aureus* 於培養基中分離 (Saito et al. 2011)，原理係因 *S. aureus* 受熱或乾燥致使其 catalase 活性下降時，Sodium pyruvate 將有助於減少 peroxide 於此過程中對 *S. aureus* 代謝功能之影響 (Baird-Parker et al. 1965)。然 DeBuyser 等人研究指出，一般而言，乳製品中之污染雜菌濃度較高，當以 BPA 分析 77 件乳製品樣本中之 *S. aureus*，其中有 18 件 (23.4%) 出現陽性菌落數過多以致無法計數之現象，然於分析相同樣本之 rabbit plasma fibrinogen agar (RPFA) medium 中，僅有 2 件 (2.6%) 樣本出現上述現象，因此推論 BPA 對抑制雜菌生長之能力需要進一步被評估 (De Buyser et al. 1995)。上述結果顯示 BPA 對不同食品類型之鑑定能力有所差異，其與樣本處理過程與食品中所含細菌濃度皆有關係，因此對於可能混合多種菌群之空氣樣本中 *S. aureus* 之鑑定準確度是否能如 Kim 與 Oh 之研究結果，亦需進一步被評估。

CSA 部分，其確切成分為製造廠商之機密，故無從得知。2001 Carricajo 等人以 CSA 對臨床血液、尿液與上呼吸道等檢體進行 *S. aureus* 鑑定，結果顯示其 Sensitivity 與 Specificity 分別為 98%與 100% (Carricajo et al. 2001) (表 20)，以上結果與 Kim 等人之研究皆顯示 CSA 對於食品與臨床樣本具有良好 *S. aureus* 鑑定能力。然 2011 年 Hsiao 等人以 Andersen 1-STG 搭配 CSA 於暴露艙對 *S. aureus* 進行 7 分鐘之空氣採樣時，結果如前述，其採樣效能與 TSA 無統計上顯著差異；然其於醫療院所以相同採樣條件進行空氣採樣時，CSA 對 *S. aureus* 之鑑定 Sensitivity 與 Specificity 分別為 24.1%與 91.2% (Hsiao et al. 2011) (表 20)，其低敏感性可能與環境中不同來源之菌種其生物活性差異有關 (Perez et al. 2003)，而此亦為未來

於實際環境以選擇性培養基進行 *S. aureus* 空氣採樣時可能面臨之問題，屆時恐需搭配適當生化測試以提高鑑定敏感性。

雖過往文獻 (Kim and Oh 2010) 指出 MSA 對於食品中 *S. aureus* 之鑑定能力相對於 BPA 與 CSA 等培養基不足，然本研究中 MSA 於四種選擇性培養基中採樣效能最高，其應與內含之 7.5% NaCl 有關 (Chapman 1945)。過去文獻指出，添加 7.5% NaCl 於一般廣效性固體培養基時，致病性葡萄球菌屬 (Staphylococci) 可於其上生長良好，並可有效抑制非葡萄球菌屬 (non-Staphylococci) 的生長；此外，在 37°C 下培養 Staphylococci 於內含 7.5% NaCl 之 bacto phenol red mannitol agar 12 小時後，其 Staphylococci 凝固酶 (coagulase) 活性上升；另於 proteose lactose agar 添加 7.5% NaCl 時，除可抑制雜菌生長，亦可促進 Staphylococci 產色原 (chromogen) 與凝固酶活性，因此可作為保存 Staphylococci 之最佳培養基 (Chapman 1945)。除高濃度鹽分外，MSA 配方中之 peptones 與牛肉衍生物 (beef extract) 可提供微生物生長之氮源、有機碳、維他命及無機鹽類之來源。換言之，MSA 本身富含 *S. aureus* 生長所需之營養成分，且其內含之高鹽分除可抑制其他菌種與 *S. aureus* 競爭培養基養分，亦可促進 *S. aureus* 之生物活性，推測上述成分是 MSA 於四種選擇性培養基中具最佳採樣效能之因素。而於其鑑定能力而言，MSA 於臨床樣本中 *S. aureus* 之 Sensitivity 與 Specificity 不容小覷。2006 年 Sharp 與 Searcy 指出，MSA 為長期被使用於肺囊性纖維化 (CF) 病患之呼吸道檢體之選擇性培養基，研究發現 200 件檢體於 MSA 進行四區劃線培養後，於未加做其他鑑定測試之情況下，有大於 98% 之樣本顯示只要第二區出現菌落則最後鑑定即為 *S. aureus* (Sharp and Searcy 2006)。此外，2013 年 Bautista-Trujillo 等人對牛奶樣本進行 *S. aureus* 鑑定，結果顯示於其他測試項目皆相同之情況下，以 MSA 作為 *S. aureus* 初步分離之培養基時，其 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 皆為 100% (表 20)，而 CSA 之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 則分別為 92.31%、94.46%、99.09% 與 75% (Bautista-Trujillo et al. 2013)，亦即若以 MSA 取代 CSA 將使該測試流程具更高之 *S. aureus* 鑑定能力。上述研究與 Kim 與 Oh 研究結果相異，雖同樣分析食品中 *S. aureus*，然食品種類與樣本處理過程不同亦可能影響鑑定結果。

綜合以上研究，可知於分析臨床或食品樣本時，MSA 本身即提供良好之鑑定能力，且輔以其他測試後，其鑑定結果之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 皆

可達 100%，雖樣本類型不同時可能對鑑定結果造成影響，然對空氣樣本而言，本研究除重視選擇性培養基之鑑定能力外，亦需考量 *S. aureus* 於實場環境以 Andersen 1-STG 採樣過程中之乾燥、衝擊力與環境中混合菌群等因子對其活性之影響，2011 年 Hsiao 等人即指出，該研究使用 CSA 於環境空氣採樣後其 Sensitivity 僅 24.1% 之鑑定結果，係可能與 *S. aureus* 酵素活性受其他菌種干擾所致，以致無法與 CSA 上產色原作用而呈現陽性結果 (Hsiao et al. 2011)。故本研究選擇四種選擇培養基中具最佳採樣效能、充足養分、並能維持甚至促進 *S. aureus* 生長活性之培養基收集，期能於空氣採樣時減少 *S. aureus* 因採樣過程而喪失之可培養性，避免研究者低估環境空氣中之 *S. aureus* 濃度；綜合上述，故本研究選定 MSA 作為評估生物氣膠採樣方法效能之選擇性培養基。


表 20 選擇性培養基之比較

	MSA		BPA		CSA		CSM	
R(This study)	0.085±0.01		0.069±0.01		0.066±0.01		0.061±0.01	
Sensitivity(%)	100	96.5	100	92.31	98	24.1	100	-
Specificity(%)	100	66.6	100	94.46	100	91.2	100	-
NPV	100	-	-	99.09	-	94.9	-	-
PPV	100	-	-	75.00	-	15.0	-	-
Reference	Bautista-Trujillo et al. 2013	Kim and Oh 2010	Kim and Oh 2010	Bautista-Trujillo et al. 2013	Carricajo et al. 2001	Hsiao et al. 2011	Kim and Oh 2010	-
	MSA		BPA		CSA		CSM	
Recovery(%)	28.6	63.3	22.9	70.0	50.0		21.0	
	Sato et al. 1995	Kim and Oh 2010	Sato et al. 1995	Kim and Oh 2010	Kim and Oh 2010		Sato et al. 1995	


7.2.1.3 鑑定流程

本研究評估之最佳採樣方法，預期將應用於實際環境中進行空氣採樣。然由於環境空氣中存在其他菌種經採樣與培養亦可能形成菌落，故需對培養後樣本進行生化鑑定以確認目標致病菌是否存在與其濃度值。對此，需了解搭配 TSA 與 MSA 之具高 Sensitivity 與 Specificity 之鑑定方法，並同時評估其鑑定所需時間與成本，以期達到準確並有效率鑑定 *S. aureus* 與 MRSA 之目的。

影響鑑定結果之因子包括細菌之生物活性與其測試項目等 (Kateete et al. 2010)

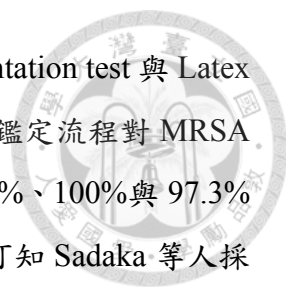


等，例如非致病性 *Staphylococci* 一般而言無法發酵 MSA 之 mannitol，然 Shittu 等人於 2006 年即分離出亦出現 mannitol 陽性之非致病性之 *Staphylococci*，若無其他測試輔助排除 *S. aureus*，則可能造成 *S. aureus* 偽陽性之結果 (Shittu et al. 2006)。2010 年 Kateete 等人以 Gram stain、Catalase test、MSA、DNase test 與 TCT 等測試針對血液、腦脊髓液、皮膚與傷口之檢體進行 *S. aureus* 鑑定，並以 PCR(*nuc* gene) 為確認 *S. aureus* 之標準方法。實驗方法係先將經前處理之臨床檢體於培養後進行 Gram stain 與 Catalase test，其陽性菌落於 Blood agar 培養 24 小時後，再接種於 TSA 上，培養 24 小時後再分別接種於 MSA、DNase agar 與 TCT 測試管中，MSA 陽性結果係 37°C 下培養 24 小時後之金黃色菌落；DNase 陽性結果則為於 37°C 下培養 24 小時後，加入濃度為 1 N 之 HCl 時，周圍出現透明環之菌落；TCT 陽性結果係指接種於測試管中之菌落於 35°C 下培養 4 小時後，出現凝集反應之菌落。該研究發現，僅做 TCT 測試時，其 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 分別為 91%、11%、33% 與 54%，然於 TCT 測試前先以 MSA 初步篩選，而後輔以 DNase 測試，該流程之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 則分別為 75%、100%、100% 與 94%，亦即 MSA 與 DNase 測試顯著提高了僅以 TCT 測試時其鑑定結果之 NPV 與 PPV (Kateete et al. 2010)。本研究樣本來源雖與 Kateete 等人之臨床樣本相異，然推論若以 MSA 作為空氣樣本之培養介質，應可於採樣當下 (以 Andersen 1-STG 採樣時) 或採樣結束後之收集液培養 (以液體採樣器採樣時) 時即對空氣中之 *S. aureus* 進行有效之初步篩選。2013 年 Bautista-Trujillo 等人以 MSA 搭配 Gram stain、Catalase test、Mannitol fermentation test、Gelatin hydrolysis、mixed sugar fermentation test、Voges-Proskauer test、Coagulase test 與 β -haemolysis test 等測試針對罹患乳腺炎之牛隻，其產出之牛奶樣本進行 *S. aureus* 鑑定，最後以 16S rRNA (*rrs*) 基因定序進行 *S. aureus* 菌種確認，除一般生化測試外，其 Coagulase test 使用之試劑 (Coagulase Plasma Rabbit kit, BD-BBL) 需培養 24 小時後才能觀察結果。結果顯示 Bautista-Trujillo 等人之鑑定流程若未搭配 Coagulase test 與 β -haemolysis test 時，MSA 之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 分別為 86.96%、79.78%、95.95% 與 52.63%，然若增加 Coagulase test 與 β -haemolysis test 時，其鑑定結果之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 則皆為 100%，因此研究建議使用 MSA 初步篩選 *S. aureus* 後輔以 Coagulase test 與 β -haemolysis test，其將有助於提高鑑定之準確度 (Bautista-Trujillo



et al. 2013)。比較上述兩研究之鑑定流程（表 21），可知樣本類型雖相異，然 Bautista-Trujillo 等人採用之鑑定流程相對於 Kateete 等人之方法，其準確度較高，且預估鑑定時間較短，另評估兩研究於鑑定流程上之經濟成本，除其共同測試項目 MSA、Gram stain、Catalase test 與 Coagulase test 之外，Bautista-Trujillo 等人採用之生化測試項目多於 Kateete 等人鑑定時測試項目（表 21），因此推論 Bautista-Trujillo 等人之鑑定成本應高於 Kateete 等人之測試成本。綜合以上比較，本研究認為，Bautista-Trujillo 等人之鑑定結果應較能準確且有效率的反應環境空氣中 *S. aureus* 之真實濃度值，於經濟許可情況下，此流程係本研究建議未來於實場採樣後可用以搭配 MSA 鑑定 *S. aureus* 之流程。而 TSA 係無法初步篩選出環境混合菌群中之 *S. aureus* 之非選擇性培養基，目前欲分離臨床或環境樣本中 *S. aureus* 之相關文獻中，直接將樣本於 TSA 培養之研究相當有限，然其空氣採樣效能顯著優於選擇性培養基之特性為其優勢。有鑑於以上文獻所述與本研究結果，本研究建議，若於細菌濃度較低之環境進行 *S. aureus* 空氣採樣時，可使用 TSA 以提高環境空氣中 *S. aureus* 之回收率，而後續則仿照 2006 年 Gandara 等人研究，搭配一選擇性培養基進行 *S. aureus* 之鑑定，以本研究而言，建議以 MSA 搭配 Bautista-Trujillo 等人之生化測試流程完成鑑定。

另針對 MRSA 部分，2003 年 Safdar 等人將 5% (v/v) 之 lipovitellin 添加入 MSA，並置入 1 μ g 之 oxacillin 紙錠製成 MSA (MSAL_{ox})，以其對臨床上呼吸道抹拭樣本進行 MRSA 鑑定。實驗方法係將抹拭樣本於 Stuart's medium (具緩衝特性之運送培養基) 中 4°C 下靜置 72 小時，接著將抹拭樣本浸潤於含 6.5% 之 0.5mL TSB 中培養 24 小時，而後將菌液接種於 MSA (MSAL_{ox}) 培養 96 小時，菌落週圍出現透明環者將被視為陽性菌落，進一步以 Catalase test 與 Tube coagulase test 進行鑑定，前述兩種測試皆為陽性反應之菌落，則以 Latex agglutination test 偵測具 MRSA 特異性之 PBP2a 抗體以確認為 MRSA。該研究顯示，上述鑑定流程對 MRSA 之 Sensitivity 與 Specificity 可達 100% 與 93% (Safdar et al. 2003)。另，2009 年 Sadaka 等人研究添加 4 mg/L cefoxitin 於 MSA 中製成 Mannitol salt agar-cefoxitin (MSA-FOX)，以其對臨床呼吸道、血液與傷口抹拭樣本進行 MRSA 鑑定。實驗方法係將抹拭樣本於 Columbia blood agar 培養 24-48 小時後，將菌落懸浮於 5mL PBS，並取其中 1 μ L 之菌液於 MSA-FOX 培養 24-48 小時，其金黃色陽性菌落以後



續 Gram stain、Catalase test、Tube coagulase test 與 Mannitol fermentation test 與 Latex agglutination test 等測試進行 MRSA 菌種確認。結果顯示，上述鑑定流程對 MRSA 之 Sensitivity、Specificity、NPV 與 PPV 分別為可達 100%、93.1%、100%與 97.3% (Sadaka et al. 2009)。比較上述兩研究之鑑定流程 (表 22)，可知 Sadaka 等人採用之鑑定測試相對於 Safdar 等人之方法，其 Sensitivity 與 Specificity 皆約略為 100% 與 93%，Safdar 等人未顯示其 NPV 與 PPV 之數據，故不可知，然就預估之鑑定時間而言，Sadaka 等人之測試明顯少於 Safdar 等人其研究所述，進一步對兩研究之鑑定成本進行初估，除其共同測試項目 Catalase test、Coagulase test 與 Latex agglutination test 之外，Sadaka 等人採用之鑑定項目亦多於 Safdar 等人鑑定時之項目 (表 22)，因此推論 Sadaka 等人之鑑定成本應較高。然綜合以上比較，本研究認為，Sadaka 等人之測試流程應較能有效率且準確的鑑定出環境空氣中之 MRSA，於經濟許可情況下，本研究建議未來可以添加 cefoxitin 之 MSA 進行空氣採樣以利後續 MRSA 之鑑定。以 TSA 而言，由 Sadaka 等人之鑑定流程中可知，其最初使用之培養基質亦為非選擇性之 Columbia blood agar，其樣本來源雖與本研究之空氣樣本不同，然可知非選擇性基質亦可適用於 MRSA 之鑑定流程中，因此本研究建議可參考 Sadaka 等人之方法，未來於實場環境中以 TSA 完成空氣採樣後，可將菌落懸浮於 PBS，而後取適量菌液接種於含 cefoxitin 之 MSA-FOX 中以進行後續鑑定。因本研究樣本來源與 Sadaka 等人之研究差異甚大，故上述建議流程仍需進一步評估以確定其鑑定準確度。

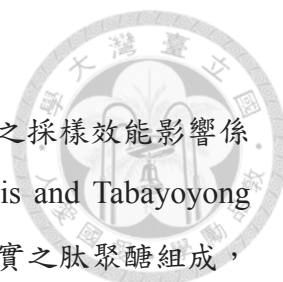


表 21 *S. aureus* 鑑定流程比較

鑑定流程 (依照測試順序)	Gram stain Catalase test Blood agar TSA MSA DNase test Tube coagulase test (TCT) PCR : <i>nuc</i> gene	MSA Gram stain Catalase test Mannitol fermentation test Gelatin hydrolysis Mixed sugar fermentation test Voges-Proskauer test Coagulase test β -haemolysis test PCR : 16S rRNA (rrs)
樣本類型	臨床皮膚與傷口等之檢體	沾取牛奶之抹拭樣本
Sensitivity	75%	100%
Specificity	100%	100%
NPV	100%	100%
PPV	94%	100%
鑑定時間	至少 4 days	至少 3 days
經濟成本	應稍低於 Bautista-Trujillo 等人	應稍高於 Kateete 等人
文獻	Kateete et al. 2010	Bautista-Trujillo et al. 2013

表 22 MRSA 鑑定流程比較

鑑定流程 (依照測試順序)	MSAL _{Ox} Catalase test Tube coagulase test Latex agglutination test	Columbia blood agar MSA-FOX Gram stain Catalase test Tube coagulase test Mannitol fermentation test Latex agglutination test
樣本類型	上呼吸道抹拭樣本	呼吸道、血液與傷口抹拭樣本
Sensitivity	100%	100%
Specificity	93%	93.1%
NPV	-	100%
PPV	-	97.3%
鑑定時間	至少 9 days	至少 4 days
經濟成本	應稍低於 Sadaka 等人	應稍高於 Safdar 等人
文獻	Safdar et al. 2003	Sadaka et al. 2009



7.2.2 時間因子對 Andersen 1-STG 採樣效能之影響


時間因子對如 Andersen 1-STG 之衝擊式採樣器 (impactor) 之採樣效能影響係與採樣菌種之菌體結構 (Li 1999b) 與搭配之採樣介質 (Mainelis and Tabayoyong 2010) 有關。例如 Gram positive 菌種之細胞壁主要由多層緻密厚實之肽聚醣組成，而 Gram negative 菌種之細胞壁係由較鬆散之肽聚醣與一層由雙層脂質所構成之外膜，因此 Gram positive 菌種較 Gram negative 菌種更能抵抗採樣時之衝擊，前者隨採樣時間延長，其採樣效能下降之程度小於後者 (Li 1999b)；此外，隨採樣時間增加，採樣氣流持續通過易導致培養基表面逐漸乾燥且失去彈性，使欲收集之微生物自培養基表面彈開，而降低採樣效能 (Mainelis and Tabayoyong 2010)。

本研究結果顯示，以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA 對 *S. aureus* 進行 3 分鐘空氣採樣，其採樣效能 (R) 皆顯著高於採樣時間大於採樣 6 分鐘時之效能，TSA 與 MSA 之 R 值分別下降 0.77 倍與 0.72 倍；而採樣時間 6 至 60 分鐘之採樣效能彼此間則無顯著差異。顯示使用相同採樣器與培養基下，採樣時間等於或高於 6 分鐘時，其採樣產生的衝擊力或乾燥作用將顯著影響 *S. aureus* 之可培養性；然 *S. aureus* 之可培養性於採樣 6 至 60 分鐘間並無顯著不同。1991 年 Buttner 等人以 Andersen 6-STG 搭配含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rifampin 與 cycloheximide 之 King medium B 與含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide 之 NA 分別對 *Pseudomonas syringae* (Gram-negative) 與 *Bacillus subtilis* spores (Gram-positive) 進行 5、10 與 20 分鐘之空氣採樣，並以所得之空氣中細菌濃度 (CFU/m³) 作為採樣效能指標 (表 23)，結果顯示細菌濃度隨採樣時間增加而下降 (Buttner et al. 1991)。另，1999 年 Li 與 Lin 以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 對 *E. coli* (Gram-negative) 與 *B. subtilis* spores (Gram-positive) 進行 0.5、1、2、3、5、7、10、20、40 與 60 分鐘之空氣採樣，並以與本實驗相同之採樣效能指標 (表 23) 評估不同採樣時間之影響，結果顯示，*E. coli* 於採樣時間 0.5 至 20 分鐘時，其 R 值為 0.01 (Li and Lin 1999b)，對照本研究使用 TSA 以近似時間 (3、6 與 15 分鐘) 採樣空氣中 *S. aureus* 之 R 值 (0.179、0.139 與 0.111)，可發現 *S. aureus* 之採樣效能為 *E. coli* 之 11 至 18 倍；採樣時間 60 分鐘時，*E. coli* 之 R 值顯著下降至 0.001，而 *S. aureus* 於相同採樣時間下其採樣效能為 0.132，是 *E. coli* 之 132 倍。當本研究以 MSA 採樣空氣中 *S. aureus* 時，*S. aureus* 於採樣時間 3、6 與 15 分鐘時之採樣效能 (0.119、0.085 與 0.084) 為 *E. coli* 之 8 至 12 倍，採樣時

間同為 60 分鐘時，*S. aureus* 之採樣效能 (0.083) 為 *E. coli* 之 83 倍。上述比較顯示，無論是否以選擇性培養基進行採樣，於近似採樣時間下，*S. aureus* 之採樣效能皆明顯高於 *E. coli*，且隨著採樣時間增加，兩菌種間之採樣效能差異愈大，此差異可能為菌種生理結構差異所造成。過往文獻曾指出 Gram-negative 相較於 Gram-positive 細菌較易受到採樣過程中衝擊力之影響，而導致採樣時間增加時其可培養性之顯著下降 (Stewart et al. 1995)，而 *E. coli* 即為 Gram-negative 菌種。

於 Li 與 Lin 之研究中，Gram-positive *B. subtilis* spores 於採樣時間 0.5 至 20 分鐘時其 R 值為 0.2 (Li and Lin 1999b)，對照本研究以 TSA 採樣空氣中 *S. aureus* 時，於近似採樣時間 (本研究之 3、6 與 15 分鐘) 下，其採樣效能為 0.179、0.139 與 0.111，是 *B. subtilis* spores 之 0.6 至 0.9 倍；以 MSA 採樣時，*S. aureus* 於採樣 3、6 與 15 分鐘時之採樣效能 (0.119、0.085 與 0.084) 為 *B. subtilis* spores 之 0.4 至 0.6 倍。推測因 *B. subtilis* spores 其芽孢外層結構複雜且內含 dipicolic acid，對高熱、冷凍、放射線、乾燥與化學藥品之抗性很高 (Paidhungat et al. 2000)，因此其於採樣過程中應較 *S. aureus* 更能夠維持其可培養性，故其採樣效能略高於 *S. aureus*。

1995 年 Stewart 等人曾以細菌於非選擇性與選擇性培養基上之回收率 (relative recovery) 差異，量化細菌於空氣採樣後之菌體結構之損傷程度 (structural injury, %) 與生理代謝功能之損傷程度 (metabolic injury, %)。其回收率定義係採樣後培養所得菌落數與進入採樣器之總細菌數之比值；而 structural injury 定義為細菌可於非選擇性培養基上生長，然無法於選擇性培養基上培養出來之現象，以 Gram-negative 菌種而言，其細胞外層含脂多醣體，對於如膽鹽之界面活性劑之具屏蔽作用，因此當菌體外層結構損傷，Gram-negative 菌種即難以於含膽鹽之選擇性培養基形成菌落，故 structural injury 之量化公式為： $(\text{relative recovery}_{\text{Complete}} - \text{relative recovery}_{\text{Selective}}) / \text{relative recovery}_{\text{Complete}}$ 。另，metabolic injury 定義為細菌可於非選擇性培養基上生長，然無法於含無機鹽類之培養基上生長之現象，因過往研究顯示細菌之 β -半乳糖酶 (β -galactosidase) 與脫氫酶 (dehydrogenase) 等酵素功能受損時，其無法於含微量鹽分之基質中生長良好 (Ray and Speck 1973)。故 metabolic injury 之量化公式為： $(\text{relative recovery}_{\text{Complete}} - \text{relative recovery}_{\text{Minimal}}) / \text{relative recovery}_{\text{Complete}}$ 。1995 年 Stewart 等人即以 Andersen 6-STG 搭配 MacConkey agar (Selective) 與 TSA (Complete) 對 Gram-negative *P. fluorescens* 進行 15 分鐘之空



氣採樣後，其 structural injury 與 metabolic injury，分別達 99% 以上與 25±13%，然對 Gram-positive 之 *M. luteus* 而言（以 TSA plus 5% NaCl 與 TSA 採樣），僅有分別接近 0% 與 7±2% 之損傷程度 (Stewart et al. 1995)，據此可支持 Gram-negative *E. coli* 其採樣效能下降程度大於 Gram-positive *S. aureus* 之結果。然 2010 年 Chang 等人針對 Gram-negative *E. coli* 與 *L. pneumophila*，以 Andersen 1-STG 搭配進行 1、2 與 4 分鐘之空氣採樣，結果顯示採樣時間自 1 分鐘延長至 4 分鐘時 *E. coli* 之採樣效能（表 23）下降 54%，而 *L. pneumophila* 之採樣效能則下降 34%，然此結果並未達統計顯著 ($p \geq 0.04$) (Chang et al. 2010)。

此外，1999 年 Li 與 Lin 以 Andersen 1-STG 搭配 MEA 對真菌孢子 (*Penicillium citrinum* spores) 與酵母菌 (*Candida famata var flareri* 與 *Rhodotorula mucilaginosa*) 進行 10、20、30、40、50 與 60 分鐘之空氣採樣，並以與本實驗相同之採樣效能指標（表 23）評估不同採樣時間之影響，結果顯示 *P. citrinum* spores 於採樣時間 10 至 30 分鐘時，其 R 值為 0.31 (Li and Lin 1999a)，對照本研究使用 TSA 以近似時間 (15 與 30 分鐘) 採樣空氣中 *S. aureus* 之 R 值 (0.111 與 0.13)，可發現 *S. aureus* 之採樣效能為 *P. citrinum* spores 之 0.36 至 0.42 倍；採樣時間 60 分鐘時，*P. citrinum* spores 之 R 值顯著下降至 0.25 以下，而 *S. aureus* 於相同時間 (60 分鐘) 下其採樣效能為 0.132，然因該研究未提及採樣時間 60 分鐘時之確切 R 值，故無法直接比較 R 值差異。當本研究以 MSA 採樣空氣中 *S. aureus* 時，*S. aureus* 於採樣時間 15 與 30 分鐘時之採樣效能 (0.084 與 0.088) 則為 *P. citrinum* spores 之 0.27 至 0.28 倍。上述比較顯示，無論是否以選擇性培養基進行採樣，於近似採樣時間下，*P. citrinum* spores 之採樣效能皆明顯高於 *S. aureus*。至於酵母菌部分，於採樣時間 10 至 30 分鐘時其 R 值為 0.144，對照本研究以 TSA 採樣空氣中 *S. aureus* 時，於近似採樣時間 (15 與 30 分鐘) 下，其採樣效能為 0.111 與 0.13，是酵母菌之 0.77 至 0.9 倍；以 MSA 採樣時，*S. aureus* 於採樣 15 與 30 分鐘時之採樣效能 (0.084 與 0.088) 為酵母菌之 0.58 至 0.61 倍。由上述結果可發現 *S. aureus* 之採樣效能略低於酵母菌之結果，唯於以 MSA 採樣 *S. aureus* 時，*S. aureus* 與酵母菌之採樣效能差異增加。上述結果可能係因真菌與酵母菌之生理結構相較於細菌，更能抵抗空氣採樣過程中之衝擊力與乾燥影響 (Li and Lin 1999a)。

表 23 採樣效能評估指標

Test bioaerosols	Sampler	Collection agar	Sampling time (min)	Performance indicator	Reference
<i>Pseudomonas fluorescens</i> and <i>Micrococcus luteus</i>	Andersen 6-STG	TSA MacConkey agar TSA plus 5% NaCl	15 min	CFU/m ³	Stewart et al. 1995
<i>Staphylococcus aureus</i>	Andersen 1-STG	LB TSA BAP CSA	7 min	Relative recovery(RR) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/mL) _{nebulizer}	Hsiao et al. 2011
<i>Pseudomonas syringae</i> and <i>Bacillus subtilis</i> spores	Andersen 6-STG	King medium B NA	5, 10, 20 min	CFU/m ³	Buttner et al. 1991
<i>Escherichia coli</i> and <i>Bacillus subtilis</i> spores	Andersen 1-STG	TSA	0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 60 min	Colony survival (CS) = (CFU/m ³) _{sampler} / (FU/ml) _{nebulizer}	Li and Lin 1999b
<i>Escherichia coli</i> and <i>Legionella pneumophila</i>	Andersen 1-STG	TSA BCYE agar	1, 2, 4 min	R= (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/m ³) _{APS}	Chang et al. 2010
<i>Penicillium citrinum</i> spores, <i>Candida famata</i> var <i>flareri</i> and <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Andersen 1-STG	MEA	10, 20, 30, 40, 50, 60 min	Colony survival (CS) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/ml) _{nebulizer}	Li and Lin 1999a



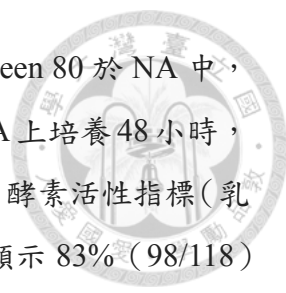
7.3 以收集液為採樣介質之採樣方法效能評估

7.3.1 評估 *S. aureus* 空氣採樣收集液之採樣效能

7.3.1.1 Tween 80 mixture

本研究根據空氣採樣文獻採用之 Tween 80 mixture 配方係含有 1% (w/v) Peptone、0.01% (v/v) Tween 80 與 0.005% (v/v) Antifoam Y-30 emulsion 之混和溶液，然過往文獻曾指出 Tween 80 對細菌活性具抑制作用，如 1996 年 Kane 與 Plaut 指出添加 0.47 ± 0.25 ppm 之 Tween 80 至濃度為 5×10^7 CFU/mL 之 *Helicobacter pylori* 菌液 (以 A_{600} 測定 OD 值)，培養 24 小時後再測定 OD 值，並與初始 OD 值比較，結果顯示菌液濃度下降為其初始濃度之 50% (Kane and Plaut 1996)；2009 年 Mondello 等人研究顯示，當 *Melaleuca alternifolia* Cheel oil 中添加濃度高於 0.06% (v/v) 之 Tween 80 時，會抑制 *Legionella pneumophila* 生長而無法量測 OD 值，導致無法評估精油抑菌效果 (Mondello et al. 2009)。有鑑於 Tween 80 於不同濃度下對不同菌種之抑菌程度相異，進一步觀察 *S. aureus* 與 Tween 80 之研究發現，2007 年 Moore 與 Griffith 於含有濃度為 10^4 CFU/mL 之 *S. aureus* 菌液的抹拭樣本潤洗液中加入濃度為 1.5% (w/v) 之 Tween 80 後，將潤洗液塗抹於 Plate count agar 上並經 24 小時培養，其 *S. aureus* 菌落數相較於未添加 Tween 80 之潤洗液所培養出來之菌落數，濃度下降 0.4 log CFU/mL，顯示 1.5% (w/v) 之 Tween 80 可能對 *S. aureus* 具抑菌效果 (Moore and Griffith 2007)。2012 年 Kavanaugh 與 Ribbeck 於 cassia oil 中添加濃度為 0.1% (v/v) Tween 80，以增加精油於 Mueller-Hinton broth (MHB) 中之溶解度，藉以評估經 MHB 序列稀釋之精油於對於形成生物膜之 *Pseudomonas* spp. 與 *S. aureus* 之殺菌能力，結果顯示於此濃度下之 Tween 80 不會抑制懸浮態細菌 (planktonic cell) 與生物膜細菌的活性 (未顯示數據) (Kavanaugh and Ribbeck 2012)。綜合上述研究，意味著介於 0.1-1.5% (v/v) 之 Tween 80 不致生物膜內或液態中之 *S. aureus* 造成顯著抑菌效果。


過往研究雖未提及 Tween 80 與空氣中 *S. aureus* 活性之關聯性，然進一步分析 Tween 80 與 *S. aureus* 之間可能出現之交互作用，1998 年 Plou 與 Emanuilova 等人指出，Tween 常被使用於培養基中作為微生物脂解酶 (lipase) 之基質，且 lipase 分解 Tween 之量化結果將作為微生物之活性指標 (Plou et al. 1998, Emanuilova et al. 1993)，其中關於 *S. aureus* 部分，2009 年 Gould 等人針對臨床樣本分離出之 *S. aureus*



進行 lipase 酵素活性分析研究，實驗方法係添加濃度為 1% 之 Tween 80 於 NA 中，再將濃度為 1.5×10^8 CFU/mL 之 *S. aureus* 與 MRSA 菌液塗抹於 NA 上培養 48 小時，並以菌落周圍存在乳白色暈環之菌落數比例作為 *S. aureus* lipase 酵素活性指標(乳白色暈環係為 lipase 分解 Tween 80 後之脂肪酸沉澱物)，結果顯示 83% (98/118) 之 *S. aureus* 與 73% (189/260) 之 MRSA 出現 lipase-positive 之活性(Gould et al. 2009)。綜合分析 Tween 80 曾應用於 *S. aureus* 之濃度 (0.1-1.5%, v/v) 考量 Tween 80 可為該菌分解之特性 (Gould et al. 2009)，本研究認為所使用的 Tween 80 mixture 中 0.01% (v/v) Tween 80 應不致對 *S. aureus* 造成抑菌效果。

本實驗統計結果顯示，Tween 80 mixture 之 R 值顯著高於 PBS 與 DW 之 R 值，此意味著 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 3 分鐘採樣後，能夠收集並培養之 *S. aureus* 數顯著高於 PBS 與 DW。然值得注意的是，本研究發現以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 3、6、15、30 與 60 分鐘採樣時，Nebulizer 中 *S. aureus* 濃度隨系統運作時間延長而下降，然 AGI-30 採樣所得之空氣中 *S. aureus* 濃度卻出現隨系統運作時間增加而先升後降，亦即採樣 6 分鐘時所得空氣中細菌濃度較前次採樣 3 分鐘時為高，且後續採樣 15 與 30 分鐘時所得之空氣中細菌濃度與採樣 3 分鐘時相比，亦無明顯下降趨勢。進一步計算不同採樣時間之 R 值，其統計結果顯示採樣 6 與 15 分鐘時之 R 值皆顯著高於採樣 3 分鐘時之 R 值。因 Nebulizer 中 *S. aureus* 濃度若呈下降趨勢，進入暴露艙中之細菌濃度應亦呈遞減趨勢，使採樣器採樣所得之空氣中細菌濃度下降，即使 Nebulizer 中 *S. aureus* 濃度與採樣器採樣所得之濃度下降幅度相異，下降趨勢上亦應為一致。由於 *S. aureus* 具有分解利用 Tween 80 之能力 (Gould et al. 2009)，因此本研究中 Tween 80 mixture 之 R 值顯著高於 PBS 與 DW 且出現不降反升之之結果，推測可能係因 Tween 80 mixture 於採樣過程中相對於 PBS 與 DW 提供 *S. aureus* 更多保護作用以致具較高之採樣效能，抑或甚至是 *S. aureus* 於 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣過程中出現微生物複製增生現象，而使菌落數增加以致 R 值上升，值得未來進一步的實驗驗證。

除 Tween 80 外，Tween 80 mixture 中之 1% (w/v) peptone 含有豐富氮源，可供微生物生長。Li 與 Nan 觀察 *Embellisia astragali* 於含有能提供氮源成份之 NA 中其生長情形，實驗方法係量測其於 NA 上形成孢子之範圍直徑以評估其生長速度。結果顯示，*E. astragali* 於含有 0.7 % peptone 之 NA 中培養 4 週時，其生長速度為



1.05±0.04 (mm day⁻¹)，培養 12 週時其生長速度為 0.53±0.06 (mm day⁻¹)，而 *E. astragali* 於含有其他能提供氮源之成份的 NA 中生長速度則相對較慢，此現象係與 peptone 能提供充分氮源供微生物利用有關 (Li and Nan 2009)。另，2008 年 Gray 等人評估不同濃度之 peptone 對 *Salmonella serovar Typhimurium* 生長活性之影響，評估方法係將固定濃度之菌液置入含有不同濃度 peptone 的 buffered peptone water (BPW) 中，於 24 小時內每 10 分鐘量測菌液 OD 值並換算其 Generation time (g, min)，結果顯示當添加 0.25% 與 3% peptone 於 BPW 時，其 g 值分別為 90.8±1.5 (min) 與 36.4±0.2 (min)，此外，當 peptone 濃度由 0.1% 升高至 3%，該菌之濃度於 6 小時內，由 3.51×10⁸ CFU/mL 上升至 2.7×10⁹ CFU/mL，亦即較高濃度之 peptone 促進該細菌之生長速度。此外，值得注意的是，Gray 等人研究亦顯示，*S. aureus* 於含有濃度為 1% (w/v) 之不同廠牌的 peptone 的 BPW 中時，其 g 值最小為 6.8±1.5 (min)，其所使用之 peptone 廠牌 (Merck) 雖與本研究 (Oxoid) 相異，然不同廠牌間成分比例變異小，亦即培養基質中若含有 1% (w/v) peptone，*S. aureus* 確有可能於此段時間內複製 (Gray et al. 2008)。上述研究對象雖不全是 Gram-positive 細菌，然可推論 Tween 80 mixture 中含有 peptone 對 *S. aureus* 之生長速度應具支持甚至是促進作用。

至於 Tween 80，2009 年 Gould 等人指出其可為 *S. aureus* 分解 (Gould et al. 2009)，本研究於此進一步進行其他微生物之文獻回顧，以了解其是否有促進 *S. aureus* 活性之可能性。2006 年 Prema 等人於 MRS medium 中添加濃度介於 0.1-0.5% 之 Tween 80，以分析 *Staphylococcus warneri* 於不同濃度之 Tween 80 處理下，其分泌 warnerin 之活性 (以 medium 上 warnerin 作用面積換算為 Arbitrary Unit, AU/ml) 與細菌濃度 (測定 OD₆₀₀ 值) 之變化。結果顯示，相較於 0.1% (v/v) Tween 80，*S. warneri* 於含有 0.5% Tween 80 之 MRS medium 中時，其分泌 warnerin 之活性由 0 (AU/ml) 上升至 25000 (AU/ml)，且細菌濃度 OD 值亦由 0.5 上升至 1.5 (Prema et al. 2006)。另，Ogunbanwo 等人分析 *Lactobacillus brevis* 於含有濃度介於 0.0-1.0% (v/v) 之 Tween 80 之 MRS medium 中，其分泌 bacteriocin 之活性 (Arbitrary Unit, AU/ml)，結果顯示 *L. brevis* 於含有 0.5% (v/v) Tween 80 之 MRS medium 中時，其分泌 bacteriocin 之活性最高 (Ogunbanwo et al. 2003)。上述研究對象分別為 *Staphylococcus* spp. 與 Gram-positive 細菌，此兩篇研究結果顯示濃度低於 0.5% (v/v)

之 Tween 80 對其生物活性應具促進作用。推測對同屬 *Staphylococcus* spp. 及 Gram-positive 的 *S. aureus* 而言，Tween 80 收集液中所含之 0.01%(v/v) Tween 80，也可能促進了 *S. aureus* 活性。

至於減緩收集液起泡程度之 antifoam (Li 1999a)，2007 年 Jérôme 等人研究發現其對於 *Hyphomicrobium zavarzinii* ZV 580 具抑菌作用 (Jérôme et al. 2007)。其實驗方法係加入固定細菌濃度於含不同濃度之 antifoam 之 mineral medium 中，於培養 27 小時後量測其 biomass (測定 OD₆₀₀ 值換算為 cell dry weight)，結果顯示 medium 中之 antifoam 濃度由 0.3% (v/v) 上升至 5% (v/v) 時，*H. zavarzinii* ZV 580 之 biomass 下降比例 (與未添加 antifoam 時其 medium 中 biomass 相比) 5% 上升至 60%。上述結果顯示 0.3% (v/v) 之 antifoam 即對 *H. zavarzinii* ZV 580 生長具負面影響，然本研究使用之 antifoam 濃度為 0.005% (v/v)，推測其對 *S. aureus* 之抑菌影響應相當有限。

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

綜合以上對 Tween 80 mixture 成份之分析 (Gray et al. 2008, Prema et al. 2006)，並參考 Li 與 Lin (2001) 研究可知，細菌經氣懸作用之乾燥影響與 AGI-30 採樣過程中造成之損傷後，其於室溫下之 Tween 80 mixture 中除可維持其可培養性，還具複製增生之生物活性。上述結論提供本研究發現較合理的解釋，本研究以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣後未經儲放過程即推盤分析，結果發現採樣 6 與 15 分鐘之 R 值顯著高於首先採樣 3 分鐘時之 R 值，此時 Nebulizer 中之 *S. aureus* 濃度雖持續下降，然相對於 3 分鐘時，AGI-30 於 6 與 15 分鐘採樣與培養後卻獲得濃度更高之 *S. aureus*，推論此極可能係於採樣時 *S. aureus* 於 Tween 80 mixture 收集液中複製增生之結果。有鑑於此，本實驗結果雖顯示 Tween 80 mixture 之 R 值顯著高於 PBS 與 DW，然其高 R 值可能部分係因被收集之 *S. aureus* 增生造成，值得

注意。

本研究流失率數據亦顯示，當以 AGI-30 與 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，採樣時間由 3 分鐘延長至 15 分鐘，Tween 80 mixture 流失率分別自 $3.65\pm 0.14\%$ 與 $4.31\pm 0.36\%$ 增加至 $16.64\pm 1.03\%$ 與 $20.91\pm 1.28\%$ ，顯示 Tween 80 mixture 流失率亦隨採樣時間增加而上升。然本研究結果顯示 AGI-30 與 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 於採樣時間 3-60 分鐘之採樣效能有別於搭配 PBS 之結果，具不降反升之趨勢，且採樣 6 與 15 分鐘時之 R 值皆顯著高於採樣 3 分鐘時之 R 值。參考前述研究結果，本研究推論，於流失率持續增加之 3-15 分鐘採樣時間內，Tween 80 mixture 中 *S. aureus* 之活性應以某種程度被維持甚至促進，以致其可培養性未於採樣過程中減少，甚至出現濃度上升之結果。

7.3.1.2 PBS 與 DW

至於 PBS 與 DW 內則未提供細菌有機質或氮源之成分；而本實驗結果顯示，PBS 之 R 值顯著高於 DW 之 R 值。2003 年 Liao 與 Shollenberger 將於穩定生長期之 *Listeria monocytogenes* Scott A 接種於 brain heart infusion broth (BHIB) 以製備能夠長期存放之 stock culture，並取其菌落置於 PBS 與 DW 中存放 30 週，期間每 5 週取菌液推盤測試 PBS 與 DW 中細菌濃度。結果顯示於 30 週間，*L. monocytogenes* Scott A 於 DW 與 PBS 中之濃度分別下降 6.18 與 1.63 log CFU/mL；該研究亦將製備成 stock culture 之 *S. aureus*，置於 PBS 與 DW 中存放 4 週，每週取菌液推盤測試濃度，結果顯示於 4 週間，*S. aureus* 於 DW 與 PBS 中之濃度分別下降 1.55 與 1 log CFU/mL，亦即 *L. monocytogenes* Scott A 與 *S. aureus* 之濃度於 DW 中下降幅度皆高於其在 PBS 中下降幅度。該研究指出，Gram-positive 細菌於 PBS 中之活性應較於 DW 高 (Liao and Shollenberger 2003)。上述研究結果支持本實驗 PBS 之採樣效能顯著高於 DW 之結論。

此外，PBS 與 DW 之採樣效能差異，亦可能與其於空氣採樣過程中之液體流失率有關。過往研究指出，當 Impinger 內收集液體積於採樣過程中因流失而減少時，抽進 Impinger 之氣流會將噴口下方收集液推向瓶壁，而所收集之生物氣膠易因此撞擊瓶底反彈，隨氣流離開收集液面或是再次衝擊進入收集液中，前者將使生物氣膠回收率降低，後者易造成微生物於採樣過程中受損影響可培養性，兩者

皆會導致 Impinger 之採樣效能下降 (Grinshpun et al. 1997)。而本研究流失率測試結果顯示，AGI-30 搭配 PBS 與 DW 採樣 3 分鐘時之流失率為 $2.8 \pm 0.12\%$ 與 $3.37 \pm 0.12\%$ ；若將 AGI-30 分別搭配 PBS 與 DW 進行 3、6 與 15 分鐘之所有採樣流失率數據進行計算，PBS 與 DW 之平均流失率則分別為 $6.19 \pm 3.54\%$ 與 $8.39 \pm 5.27\%$ ，統計上雖未達顯著差異，然可知 PBS 相對於 DW 之液體流失率低，較能於採樣過程中將所收集之 *S. aureus* 保留於收集液當中，有助於維持較高之採樣效能。

總結以上說明，考量所得之 R 與液體流失率，本研究認為相較於 Tween 80 mixture 與 PBS，DW 之低 R 與高流失率使其不適合作為空氣中 *S. aureus* 之採樣收集液；而 Tween 80 mixture 之 R 值雖顯著高於 PBS 與 DW，然可能係因其促進 *S. aureus* 增生之結果。若空氣採樣目的係為監測環境中 *S. aureus* 濃度值，因 *S. aureus* 於 Tween 80 mixture 中複製增生之結果將可能導致高估暴露風險，故其亦有不適用之處。據此，本研究建議在進行環境空氣中 *S. aureus* 濃度監測時，使用 PBS 作為 *S. aureus* 空氣採樣收集液較為適當。

7.3.2 時間因子對 AGI-30 與 BioSampler 採樣效能之影響

7.3.2.1 採樣時間

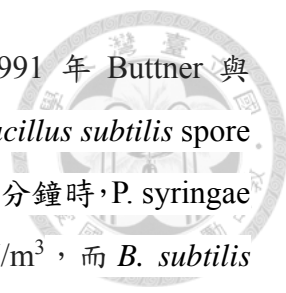
本實驗係以 AGI-30 與 BioSampler 搭配 R 值較高之 Tween 80 mixture 與 PBS 兩種收集液，進行 3、6、15、30 與 60 分鐘之空氣採樣。以不具促進 *S. aureus* 增生爭議的 PBS 而言，AGI-30 與 BioSampler 之採樣結果顯示隨採樣時間由 3 分鐘延長至 60 分鐘，其採樣效能分別下降為採樣 3 分鐘時之 0.08 與 0.26 倍。延長採樣時間造成採集可培養性 *S. aureus* 之負面效應，可能與採樣氣體衝擊收集液造成採樣器中已採集之微生物再氣膠化有關 (Grinshpun et al. 1997)，此外，亦與微生物於採樣過程中反覆撞擊收集液面與瓶壁之影響導致細菌活性下降有關 (Terzieva et al. 1996)。1996 年 Terzieva 等人以 AGI-30 搭配 DW 針對 *Pseudomonas fluorescens* 進行 15、30、45 與 60 分鐘採樣，並以染劑區分收集液中總菌與活性細菌以計算活性細菌比例 (詳如表 24 所述)。結果顯示，採樣 15 分鐘時 AGI-30 中活性 *P. fluorescens* 比例為 $38 \pm 12\%$ ；採樣 30、45 與 60 分鐘時，活性細菌比例則分別為 30%、32% 與 20% (未顯示其 SD 值)，亦即 *P. fluorescens* 之活性比例隨採樣時間增加而下降 (Terzieva et al. 1996)。另，2007 年 Rule 等人置入已知濃度之 *Pantoea*

agglomerans 之 DW 於 AGI-30 與 BioSampler 中，並於暴露艙進行 30 與 60 分鐘之空氣採樣（暴露艙通入經 HEPA 過濾之空氣），而後以染劑區分收集液中總菌與非活性細菌以計算活性細菌濃度（表 24）。結果顯示，當採樣時間自 30 分鐘延長至 60 分鐘，AGI-30 中活性與可培養性細菌濃度分別由 $1.6 \times 10^9 \pm 4.1 \times 10^8$ viable cells/mL 與 $1.6 \times 10^9 \pm 5.8 \times 10^8$ CFU/mL 下降至 $1.5 \times 10^8 \pm 7.1 \times 10^8$ viable cells/mL 與 $6.8 \times 10^8 \pm 2.9 \times 10^8$ CFU/mL，亦即活性與可培養性比例分別下降 0.09 與 0.4 倍；而 BioSampler 中活性與可培養性細菌濃度則分別由 $7.3 \times 10^9 \pm 1.5 \times 10^9$ viable cells/mL 與 $1.2 \times 10^{10} \pm 6.8 \times 10^9$ CFU/mL 下降至 $6.4 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^9$ viable cells/mL 與 $9.2 \times 10^9 \pm 5.1 \times 10^9$ CFU/mL，亦即活性與可培養性比例分別下降 0.88 與 0.77 倍。由該研究結果可知，*P. agglomerans* 之活性與可培養性細菌濃度隨採樣時間延長而下降，且 BioSampler 中活性與可培養性細菌下降比例小於 AGI-30 (Rule et al. 2007)。綜合上述研究可知，本實驗結果發現 AGI-30 與 BioSampler 採樣效能隨採樣時間之增加而下降，可部分歸因於較長時間之採樣過程中其細菌活性下降之現象。

表 24 細菌活性與可培養性評估指標

Test bioaerosols	Dye	Viability indicator	Culturability indicator	Reference
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BacLight stain	% viable bacteria = (Live count _{BL} / Total count _{BL}) × 100%	% culturable bacteria = CFU _{nonselective} / Total count _{BL}	Terzieva et al., 1996
<i>Pantoea agglomerans</i>	Syto 62、 TOPRO-3	viable cells/mL = (total cells/mL) _{Syto 62} - (nonviable cells/mL) TOPRO-3	Culturability efficiency (CE) _{impingers} = (CFU/mL) _{after test} / (CFU/mL) _{before test}	Rule et al. 2007

另，流失率數據顯示，AGI-30 與 BioSampler 搭配 PBS 進行 3-15 分鐘之空氣採樣時，其流失率分別自 $2.8 \pm 0.12\%$ 與 $3.33 \pm 0.21\%$ 增加至 $10.78 \pm 0.66\%$ 與 $11.62 \pm 0.7\%$ ，統計檢定亦顯示採樣時間由 3 分鐘延長至 15 分鐘時，其液體流失率達顯著差異。如同前述，流失率增加易造成所採集之細菌撞擊瓶底反彈，並隨採樣氣流離開收集液面，因此導致採樣效能下降。故本研究之流失率測試結果亦提供延長採樣時間時採樣效能下降之合理解釋。



過往研究亦顯示延長採樣時間造成採樣細菌濃度的下降。1991 年 Buttner 與 Stetzenbach 以 AGI-30 搭配 PBS 針對 *Pseudomonas syringae* 與 *Bacillus subtilis* spore 進行 5-20 分鐘之空氣採樣，結果顯示採樣時間由 5 分鐘延長至 20 分鐘時，*P. syringae* 之空氣採樣濃度由 $3.4 \pm 0.01 \log \text{CFU/m}^3$ 降至 $2.66 \pm 0.06 \log \text{CFU/m}^3$ ，而 *B. subtilis* 之採樣濃度亦由 $4.36 \pm 0.04 \log \text{CFU/m}^3$ 降至 $4.12 \pm 0.54 \log \text{CFU/m}^3$ (Buttner and Stetzenbach 1991)。另，1999 年 Li 等人以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 針對 *E. coli* 與 *B. subtilis* spore 進行 1-60 分鐘之空氣採樣，其採樣效能指標計算方式與本研究相同。其結果顯示，採樣 1、2.5、5、15、30、45 與 60 分鐘時 *E. coli* 之採樣效能分別為 0.053、0.039、0.041、0.047、0.041、0.045 與 0.04，顯示相對於採樣時間 1 分鐘而言，2.5、5、15、30、45 與 60 分鐘時之採樣效能分別為其 0.74、0.77、0.88、0.77、0.85 與 0.74 倍，整體而言其採樣效能亦呈下降趨勢。然值得注意的是，若相對於採樣時間 2.5 分鐘而言，5、15、30、45 與 60 分鐘時之採樣效能分別為其 1.05、1.21、1.05、1.15 與 1.03 倍，亦即 *E. coli* 之採樣效能於 2.5-60 分鐘之採樣時間下，與本研究同樣出現以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 採樣時，其採樣效能隨採樣時間延長不降反升之現象，但較不明顯（本研究：採樣 6 與 15 分鐘時之 R 值皆顯著高於採樣 3 分鐘時之 R 值）。另，該研究中之 *B. subtilis* 部分，其採樣效能於採樣時間 1、2.5、5、15、30、45 與 60 分鐘時分別為 0.144、0.134、0.124、0.117、0.095、0.101 與 0.104，顯示相對於採樣時間 1 分鐘而言，2.5、5、15、30、45 與 60 分鐘時之採樣效能分別為其 0.93、0.86、0.81、0.66、0.7 與 0.72 倍，整體而言其採樣效能呈下降趨勢，唯於 45 與 60 分鐘時其採樣效能相較於 30 分鐘時呈現微幅上升。然 Li 等人指出，*E. coli* 與 *B. subtilis* 於 1-60 分鐘採樣時間下不同採樣時間之採樣效能彼此間未達統計上顯著 (Li et al. 1999)，因此本研究認為其變化可能與該實驗變異性有關，而與細菌於 Tween 80 mixture 中增生之現象較無關聯。

此外，2010 年 Chang 等人以 AGI-30 與 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 針對 *Legionella pneumophila* 與 *E. coli* 進行 3、30 與 60 分鐘之空氣採樣，*L. pneumophila* 之結果顯示，若以 3 分鐘之採樣效能為 1，AGI-30 於採樣時間 30 與 60 分鐘時之採樣效能為其 0.15 與 0.11 倍，而 BioSampler 於採樣 30 與 60 分鐘時之採樣效能則為 3 分鐘時之 0.15 與 0.05 倍；至於 *E. coli*，相對於採樣 3 分鐘時之採樣效能，AGI-30 於採樣時間 30 與 60 分鐘時之採樣效能為其 0.61 與 0.32 倍，而 BioSampler 於採樣

30 與 60 分鐘時之採樣效能則為 3 分鐘時之 0.34 與 0.29 倍，上述結果顯示 *L. pneumophila* 與 *E. coli* 之採樣效能皆隨採樣時間延長而下降 (Chang et al. 2010)。對照本研究以 AGI-30 與 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 針對 *S. aureus* 進行採樣之結果 (由於採樣效能指標計算方式相異，因此以 R 值倍數關係進行比較)，相對於採樣 3 分鐘時之 R 值，AGI-30 與 BioSampler 於採樣 30 與 60 分鐘時之 R 值分別為其 1.41 倍、0.24 倍與 0.9 倍、0.54 倍，可發現 Gram-positive 之 *S. aureus* 相較於 Gram-negative 之 *L. pneumophila* 與 *E. coli*，採樣效能自 3 分鐘採樣時間延長至 60 分鐘時其下降幅度較小。上述不同菌種之差異可能與前述 Tween 80 對 Gram-negative 具抑菌作用有關 (Kane and Plaut 1996)，此外，亦可能受到 Tween 80 可維持並促進 *S. aureus* 活性所致 (Gould et al. 2009)。

7.3.2.2 AGI-30 與 BioSampler 之採樣效能差異

本研究統計結果顯示以液體為介質之採樣方法中，以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能最佳。過往研究顯示 AGI-30 與 BioSampler 之 50% 截取氣動粒徑 (d_{50}) 分別為 $0.31\mu\text{m}$ (Macher and Burge 2001) 與 $0.3\mu\text{m}$ (Deloge-Abarkan et al. 2007)，其 d_{50} 相似之特性應使兩種採樣器有相似的物理性回收效率，然 BioSampler 之採樣效能較高，可能與其利用衝擊及離心原理使含生物氣膠之空氣氣流衝擊至收集液表面，降低了生物氣膠反彈與再氣膠化現象，因此使較多生物氣膠被保留於 BioSampler 收集液當中所致 (Lin et al. 1999)。2009 年 Rule 等人於暴露艙中以 BioSampler 與 AGI-30 搭配 PBS 與 DW 進行 5 分鐘之 *Pantoea agglomerans* 空氣採樣，結果顯示 BioSampler 採樣所得採樣效能 (CE, 表 25) 高於 AGI-30 20% (Rule et al. 2009)。此外，2010 年 Chang 等人於暴露艙中以 BioSampler 與 AGI-30 搭配 DW 針對 *L. pneumophila* 進行 3 分鐘空氣採樣時，AGI-30 之採樣效能 (R, 表 25) 為 BioSampler 之 0.57 倍 (Chang et al. 2010)。上述他人之研究皆顯示 BioSampler 之採樣效能高於 AGI-30，與本研究之結果一致。

總結上述研究，延長採樣時間對採集空氣中具可培養性之 *S. aureus* 整體而言確實具負面影響，然其中又受到收集液種類的影響甚鉅；此外，不同採樣器的採樣效能亦有差異。當所欲監測之環境其空氣中 *S. aureus* 濃度偏低時，恐需延長空氣採樣時間以增加採樣總體積，避免偽陰性結果；然該如何選擇適當採樣器、收

集液與採樣時間以兼顧採樣效能，降低繁殖增生影響，亦能有效增加空氣採樣體積以提高偵測下限，是一重要現場採樣之議題。



7.3.2.3 菌種之採樣效能差異

延續上述 Li 等人 (1999) 之研究，其實驗方法係以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 針對 *E. coli* 與 *B. subtilis* spore 進行 1-60 分鐘之空氣採樣，並以與本研究 R 相同定義之 Colony survival (CS) (採樣器採樣所得之空氣中細菌濃度與 Nebulizer 中細菌濃度之比值) 作為評估指標 (詳如表 25 所示)，進行採樣時間影響之評估，結果顯示，採樣 1、2.5、5、15、30、45 與 60 分鐘時 *E. coli* 之採樣效能 CS 分別為 0.053、0.039、0.041、0.047、0.041、0.045 與 0.04；*B. subtilis* 之採樣效能則分別為 0.144、0.134、0.124、0.117、0.095、0.101 與 0.104。相較於 *S. aureus*，於採樣時間 15 分鐘時，*E. coli* 與 *B. subtilis* 之採樣效能分別為 *S. aureus* 之 0.23 與 0.56 倍 (表 26, Relative performance (1))；當採樣時間延長至 30 分鐘時，*E. coli* 與 *B. subtilis* 之採樣效能分別為 *S. aureus* 之 0.23 與 0.54 倍 (表 26, Relative performance (1))。上述比較結果顯示，於 15 與 30 分鐘時，*E. coli* 與 *B. subtilis* 採樣效能皆低於 *S. aureus*。文獻指出 Gram-positive 細菌因其細胞壁較堅實，相對於無堅實細胞壁之 Gram-negative 細菌，較能抵抗採樣過程中之撞擊或乾燥影響 (Stewart et al. 1995)，此或可為 *S. aureus* 採樣效能優於 *E. coli* 之原因之一。至於 *S. aureus* 採樣效能亦優於 *B. subtilis* spores 部分，雖過往研究指出 spores 外層結構複雜且內含 dipicolic acid，對外環境變化抗性很高 (Paidhungat et al. 2000)，但 spores 屬於休眠狀態，恐無法如 *S. aureus* 般可有效代謝 Tween 80 mixture (Gould et al. 2009)。

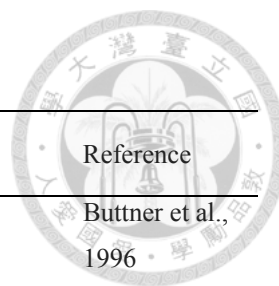


表 25 採樣效能評估指標

Test bioaerosols	Sampler	Collection liquid	Sampling time (min)	Performance indicator	Reference
<i>Pseudomonas syringae</i> and <i>B. subtilis</i> spore	AGI-30	PBS	5, 10, 20 min	CFU/m ³	Buttner et al., 1996
<i>Escherichia coli</i> and <i>B. subtilis</i> spore	AGI-30	Tween 80 mixture	1, 2.5, 5, 15, 30, 45, 60 min	Colony survival (CS) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/ml) _{nebulizer}	Li et al. 1999
<i>Legionella pneumophila</i> and <i>Escherichia coli</i>	AGI-30 and BioSampler	Tween 80 mixture	3, 30, 60 min	R= (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/m ³) _{APS}	Chang et al., 2010
<i>Pantoea agglomerans</i>	AGI-30 and BioSampler	PBS & DW	5 min	Culturability efficiency (CE) = (CFU/L) _{sampler} / (Counts/L) _{APS} (L : per liter of air)	Rule et al., 2009
<i>Bacteria</i> and <i>Fungi</i>	Andersen 1-STG and AGI-30	TSA MEA Tween 80 mixture	Agar : 15-90 s Tween mix : 5 min	CFU/m ³	Thorne et al., 1992
<i>Legionella pneumophila</i>	Andersen 1-STG and AGI-30	BCYE α plates Tween 80 mixture	5 min	Colony survival (CS) = (CFU/m ³) _{sampler} / (CFU/ml) _{nebulizer}	Li et al., 2003

當比較採樣 60 分鐘時之三種菌種的採樣效能發現，*S. aureus*、*E. coli* 與 *B. subtilis* spores 之採樣效能分別為 0.03、0.04 與 0.104 (表 26·Sampling performance)，其中 *S. aureus* 與 *E. coli* 之採樣效能相近。本研究實驗結果顯示，*S. aureus* 於採樣 60 分鐘時其採樣效能顯著低於 3-30 分鐘之採樣效能，亦即於 60 分鐘採樣過程中，Tween 80 mixture 對 *S. aureus* 可培養性之支持或細菌活性之促進，很可能小於採樣

過程中 *S. aureus* 因反覆衝擊至收集液面造成菌體損傷與液體持續流失造成之再氣膠化對採樣效能之負面影響。此外，*S. aureus* 於 Tween 80 mixture 中複製增生可能產生代謝廢物，其亦可能影響 *S. aureus* 之採樣結束後之活性與可培養性，上述這些因素可能導致 *S. aureus* 之採樣效能與 *E. coli* 接近之結果。

另，比較不同菌種隨採樣時間增加其各自採樣效能下降程度（表 26，Relative performance (2)）。結果顯示，*S. aureus*、*E. coli* 與 *B. subtilis* spore 採樣 30 分鐘時之採樣效能與各自採樣 15 分鐘時之效能相比，彼此下降程度差異不大，分別為 0.84、0.87 與 0.81。然值得注意的是，延長採樣至 60 分鐘時其採樣效能，相對於採樣 15 分鐘時之效能，*S. aureus* 顯著下降至 0.14 倍，而 *E. coli* 與 *B. subtilis* spore 則為 0.85 與 0.89 倍。本研究推論，Tween 80 mixture 於採樣 30 至 60 分鐘之間對 *S. aureus* 之支持有限（也許係養分用盡或是代謝廢物影響），而 *S. aureus* 於採樣過程中累積之菌體損傷與再氣膠化現象可能在此段時間內顯著影響其可培養性，造成採樣效能顯著下降之結果。


表 26 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於 15-60 分鐘採樣時間下之不同菌種採樣效能

Test bioaerosols	Gram stain	Sampling time (min)	Sampling performance	Relative performance		Reference
				(1)	(2)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	15	0.208	1	1	This study
		30	0.175	1	0.84	
		60	0.03	1	0.14	
<i>Escherichia coli</i>	-	15	0.047	0.23	1	Li et al. 1999
		30	0.041	0.23	0.87	
		60	0.04	1.33	0.85	
<i>Bacillus subtilis</i> spores	+	15	0.117	0.56	1	Li et al. 1999
		30	0.101	0.54	0.81	
		60	0.104	3.47	0.89	

(1)：以 *S. aureus* 採樣 15、30 與 60 分鐘時之採樣效能為 1；(2)：不同菌種皆以各自採樣 15 分鐘時之採樣效能為 1

7.4 Andersen 1-STG、AGI-30 與 BioSampler

進一步將培養基為介質之採樣方法（Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA）與上述四種液體採樣方法（BioSampler 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 及 PBS）進行



統計檢定，結果顯示 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著高於其他五種採樣方法；而 BioSampler 搭配 PBS 以及 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 次之；AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之 R 值略高於 Andersen 1-STG 搭配 TSA 之 R 值，但彼此未達統計顯著差異，然兩者顯著高於 Andersen 1-STG 搭配 MSA 之結果；而 AGI-30 搭配 PBS 之採樣效能則最差。參考過往文獻發現，1992 年 Thorne 等人以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 進行 15 至 90 秒之細菌與真菌空氣採樣，此外，亦以 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 進行 5 分鐘之細菌與真菌空氣採樣，以評估兩種採樣器的效能。結果顯示，Andersen 1-STG 採樣所得之細菌與真菌平均濃度分別是 73200 與 1970 CFU/m³，而 AGI-30 採樣所得之細菌與真菌平均濃度分別是 96400 與 5380 CFU/m³；經統計檢定後，AGI-30 與 Andersen 1-STG 對於細菌之採樣濃度無顯著差異，然 AGI-30 採集真菌之濃度則顯著優於 Andersen 1-STG (Thorne et al. 1992)。上述研究於細菌部分的結果與本實驗結論相近，亦即 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能與 Andersen 1-STG 搭配 TSA 之結果彼此間無顯著差異。

另，2003 年 Li 等人以 Andersen 1-STG 搭配 BCYE agar 與 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 於暴露艙進行 5 分鐘之 *L. pneumophila* 空氣採樣，結果顯示 Andersen 1-STG 之採樣效能(CS, 表 25)為 0.016±0.002，而 AGI-30 之 CS 則為 0.132±0.0387，該研究認為此結果係可能與 *L. pneumophila* 於 Andersen 1-STG 採樣過程中之衝擊與乾燥之影響大於其於 AGI-30 採樣過程中之損傷程度 (Li et al. 2003a)。上述研究發現亦與本研究結果相似，亦即 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能顯著高於 Andersen 1-STG 搭配選擇性培養基之結果。



7.5 採樣策略

過往文獻指出影響生物氣膠採樣器之採樣效能因素包含：生物氣膠濃度、組成、採樣方向、氣膠帶電情形、氣膠乾燥狀況、採樣時間與流量等，其中在設計採樣策略時較為重要之考量因素包括採樣器能夠偵測之氣膠濃度範圍、其偵測濃度之準確性、採樣時間與採樣流量等 (Macher and Willeke 1992)。2007 年 Albrecht 等人提出完整採樣策略包含需瞭解欲進行暴露評估之環境資訊，包含職場活動性質、可能暴露源與暴露量、暴露時間長短與環境氣候。對照本研究欲偵測之病原菌，亦即需先參考相關文獻或暴露評估資料，以了解不同作業環境空氣中之 *S. aureus* 可能暴露量，必要時進行前測以確認其濃度範圍，藉以挑選適當之採樣器、採樣介質與設計採樣時間等，並記錄採樣現場之風向與溫濕度等環境因子。另，因氣膠濃度於採樣環境可能隨溫濕度或風速變化，欲取得具代表性樣本，除考量採樣位置外，應在不影響採樣效能與生物活性之前提下，進行足夠時間之空氣採樣 (Albrecht et al. 2007)。就偵測方法而言，Albrecht 等人指出衝擊式採樣器，如 Andersen impactor 較適用於空氣中細菌濃度較低之環境，然大於 10 分鐘之空氣採樣即可能使收集於培養基上細菌受到乾燥影響而導致可培養性下降，因此普遍建議採樣時間介於 1-10 分鐘較為適當 (Albrecht et al. 2007)。而液體採樣器相較於 Andersen impactor，其適用採樣時間較長，然以 AGI-30 為例，研究指出由於微生物於採樣過程中之再氣膠化現象 (Grinshpun et al. 1997) 及細菌反覆撞擊收集液面與瓶壁導致其活性下降等情形 (Terzieva et al. 1996)，一般而言，其採樣時間建議宜於 30 分鐘內 (Thorne et al. 1992)。


本研究以過往文獻所得空氣中 *S. aureus* 或 MRSA 濃度為參考暴露值，推估本研究評估具較佳採樣效能且無促進 *S. aureus* 複製增生之虞的採樣方法 (BioSampler 搭配 PBS) 之適當性及所需採樣時間。本研究將各文獻空氣中 *S. aureus* 或 MRSA 濃度分為三類：(1) 有進行消毒控制之低濃度環境 (A，如醫院候診區、一般病房與加護病房)、(2) 無進行消毒控制然亦未有顯著且特定 *S. aureus* 污染源之環境 (B，如一般住家) 與 (3) 農畜養殖場所高濃度之環境 (C，如雞舍、豬舍與火雞舍)。本研究再以三類環境中之最大濃度值進行以 BioSampler 在不同空氣採樣時間下菌落數初估，各文獻之最大與最小濃度詳見表 27，A、B 與 C 三類地點之最大濃度值分別為 116.0 ± 43.7 CFU/m³ (Shiomori et al. 2002)、430 CFU/m³ (Perez et al.



2011) 與 2.3×10^4 CFU/m³ (Friese et al. 2013)。由於 BioSampler 於不同採樣時間下可得不同採樣空氣體積(表 28, m³)，其與三類地點文獻已知之 *S. aureus* 或 MRSA 最大濃度值 (CFU/m³) 的乘積，即為不同採樣時間採樣下收集液所得菌落數 (CFU/sample)；若將收集液經後續離心步驟使細菌集中濃縮至 0.2 mL、0.5mL 與 1mL 收集液中，再取其中 0.2mL 塗抹於 TSA 上(亦即取所有細菌、2/5 以及 1/5 倍之細菌)，並以培養法分析。結果如表 29 所示，以醫療院所等經過消毒控制之 A 地點而言，BioSampler 採樣 60 分鐘後，其收集液經離心濃縮至 0.5 與 0.2mL 時之預估推盤結果分別為 34.9 與 87.0 CFU/TSA plate，而採樣 30 分鐘後將收集液濃縮至 0.2mL 時，其預估推盤結果為 43.5 CFU/TSA plate，上述菌落數皆介於 30-300 CFU/TSA plate，為適當之菌落數範圍，而 3-15 分鐘之採樣時間下其收集液經離心濃縮 0.2 mL、0.5mL 與 1mL 時之預估推盤結果則皆小於 30 CFU/TSA plate(表 30)。因此本研究建議，若於醫院環境進行空氣採樣時，可先以 BioSampler 搭配 PBS 進行採樣時間為 30 與 60 分鐘之前測，再將收集液濃縮至上述之適當體積，並以推盤法塗抹至 TSA 或 MSA 進行培養法分析。

以 B 地點，亦即一般住家環境而言，BioSampler 採樣 6 分鐘後，其收集液濃縮至 0.2mL 時之預估菌落數為 32.3 CFU/TSA plate，若採樣時間為 15 分鐘時，其收集液濃縮至 0.5 與 0.2mL 時之預估菌落數分別為 32.3 與 80.6 CFU/TSA plate，進一步延長採樣時間至 30 與 60 分鐘時，其收集液濃縮至 0.2 mL、0.5mL 與 1mL 時之預估菌落數則大多介於 30-300 CFU/TSA plate (表 31)，唯採樣 60 分鐘後，將收集液濃縮至 0.2 mL 之培養結果會超過 300 CFU/TSA plate，然其可經適當稀釋過程，使推盤結果介於 30-300 CFU/TSA plate。故本研究建議，於一般住家環境進行 *S. aureus* 空氣濃度前測時，可先以 6-60 分鐘不等之採樣時間，搭配適當的收集液濃縮體積，進行培養法分析。

此外，C 地點，亦即家禽舍部分，BioSampler 搭配五種不同採樣時間進行採樣後，其收集液經離心濃縮至不同體積之預估推盤結果皆大於 30 CFU/TSA plate (表 32)，至於其他大於 300 CFU/TSA plate 之結果亦可經適度檢討濃縮之必要性及程度，使推盤結果介於 30-300 CFU/TSA plate。故本研究建議於近似家禽舍類型之作業環境進行空氣中 *S. aureus* 濃度前測時，可以 BioSampler 進行 3-60 分鐘不等之空氣採樣，並進行培養法分析。



本研究根據過往文獻於三類地點所得最大 *S. aureus* 濃度值 (Shiomori et al. 2002, Perez et al. 2011, Friese et al. 2013) 進行菌落數計算及前測採樣時間之推估，然因這些文獻使用之採樣器分別為 Andersen 6-STG (Shiomori et al. 2002)、Andersen 1-STG (Perez et al. 2011) 與 AGI-30 (Friese et al. 2013)，其採樣效能皆低於本研究評估具最佳採樣效能之 BioSampler，故本研究認為這些文獻很可能低估了空氣中 *S. aureus* 濃度值。以 BioSampler 搭配 PBS 進行上述不同時間之空氣採樣，後續將收集液濃縮至上述說明之適量體積與適當稀釋過程，應可初步瞭解該環境中之 *S. aureus* 空氣濃度與適當採樣時間範圍。

然本研究顯示，BioSampler 搭配 PBS 採樣 3、6、15、30 與 60 分鐘時，其 R 平均值逐步下降，分別為 0.341、0.266、0.238、0.136 與 0.09 (表 16)，且經統計檢定顯示 R 值彼此間皆具顯著差異，因此需考量 BioSampler 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能下降之影響。進一步分析此數據可發現，採樣 30 分鐘時其 R 值為 15 分鐘之 R 值的 0.57 倍，60 分鐘時其 R 值為 15 分鐘之 R 值的 0.38 倍，相較於採樣 3、6 與 15 分鐘時其 R 值彼此間 (0.7-0.9 倍) 差異較大，亦即採樣 3-15 分鐘時相較於 30-60 分鐘之採樣效能較高且較為集中，故在滿足 30-300 CFU/sample 之條件下，優先建議以小於或等於 15 分鐘之採樣時間進行濃度監測。但若前測結果需於 30 或 60 分鐘採樣時間才可收集足夠 ≥ 30 CFU 之菌落數，則考量採樣效能隨採樣時間延長而下降之現象，建議優先考慮進行 30 分鐘之空氣採樣。此外，由於環境中 *S. aureus* 濃度亦很可能變動，故宜視實場環境特性進行多次採樣測試。

上述採樣目的係進行空氣中 *S. aureus* 濃度監測，然若採樣目的為欲進行 *S. aureus* 定性而非定量分析，本研究認為以具最佳採樣效能之採樣方法，亦即 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 進行採樣較為適當，主因 *S. aureus* 即使於 Tween 80 mixture 中出現複製增生，也不致影響定性分析之結果。至於定性分析之適當採樣時間部分，本研究結果顯示，BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 採樣 30 分鐘之採樣效能略低於 3 分鐘之結果 (未達統計顯著差異)，而採樣 60 分鐘之採樣效能則顯著低於 3 分鐘之結果。故本研究認為欲進行環境空氣中 *S. aureus* 之定性分析時，可進行 30 與 60 分鐘之空氣採樣前測，若前測結果顯示採樣 30 分鐘時即可偵測空氣中 *S. aureus*，則無需延長採樣時間至 60 分鐘。

表 33 *S. aureus* 或 MRSA 於不同環境空氣中之濃度

採樣地點	採樣器	採樣時間 (min)	菌種	最大濃度值 (CFU/m ³)	最小濃度值 (CFU/m ³)	Reference	
A. 有進行消毒控制之低濃度環境	1. 醫院候診區	Andersen 1-STG	7	<i>S. aureus</i>	8.0	2.5	Hsiao et al. 2011
				MRSA	7.4	1.7	
	2. 一般病房	Andersen 6-STG	10	MRSA	116.0±43.7*	0.7	Shiomori et al. 2002
	3. 加護病房	Andersen 1-STG	2	<i>S. aureus</i>	4.42±11.84	0.88±3.9	Huang et al. 2013
		Andersen 1-STG	10	<i>S. aureus</i>	13.47±9.42	5.86±4.09	Mirzaii et al. 2012
B. 無進行消毒控制然亦未有特定污染源之環境	一般住家	Andersen 1-STG	3	<i>S. aureus</i>	430.0**	29.0	Perez et al. 2011
				MRSA	5.0	1.0	
		Andersen 2-STG	10、15	<i>S. aureus</i>	74.8	0.6	Gandara et al. 2006
C. 農畜場所之高濃度環境	雞舍、豬舍 與火雞舍	AGI-30	30	MRSA	23000.0	19.0	Friese et al. 2013
			30	MRSA	257.0	-	Friese et al. 2012
			-	<i>S. aureus</i>	3619.0	2.0	Schulz et al. 2012
		Andersen 6-STG	1-5	<i>S. aureus</i>	137.0	3.0	Zhong et al. 2009

*文獻中所呈現最大平均濃度值

**文獻中所呈現最大濃度值

表 34 BioSampler 於不同採樣時間下所得菌落數之推估

採樣地點	空氣中細菌濃度最大值 (CFU/m ³) *	採樣流量 (L/min)	採樣時間 (min)	採樣空氣體積 (m ³)	採樣所得菌落數 (CFU/sample)**	收集液濃縮後推盤菌落數 (CFU/TSA plate)***		
						濃縮至 1mL	濃縮至 0.5mL	濃縮至 0.2mL
A. 有進行消毒控制之低濃度環境 (如醫院)	116.0±43.7	12.5	3	0.0375	4.4	****	-	4.4
			6	0.075	8.7	1.7	3.5	8.7
			15	0.1875	21.8	4.4	8.7	21.8
			30	0.375	43.5	8.7	17.4	43.5
			60	0.75	87.0	17.4	34.9	87.0
B. 無進行消毒控制然亦未有特定污染源之環境 (如一般住家)	430	12.5	3	0.0375	16.1	3.2	6.4	16.1
			6	0.075	32.3	6.5	12.9	32.3
			15	0.1875	80.6	16.1	32.2	80.6
			30	0.375	161.3	32.3	64.5	161.3
			60	0.75	322.5	64.5	129.0	322.5
C. 農畜場所之高濃度環境 (如雞舍、豬舍與火雞舍)	2.3×10 ⁴	12.5	3	0.0375	862.5	172.5	345.0	862.5
			6	0.075	1725.0	345.0	690.0	1725.0
			15	0.1875	4312.5	862.5	1725.0	4312.5
			30	0.375	8625.0	1725.0	3450.0	8625.0
			60	0.75	17250.0	3450.0	6900.0	17250.0

*表 35 所列三類採樣地點之空氣中 *S. aureus* 或 MRSA 濃度最大值

**A、B 或 C 地點之濃度最大值 (CFU/m³) 與採樣空氣體積 (m³) 的乘積，即為採樣所得菌落數之最大值 (CFU/sample)

***收集液經離心後可將細菌濃縮至 1mL、0.5mL 與 0.2mL 中，再取其中 0.2mL 塗抹於 TSA plate 上，並以培養法分析

****-：CFU < 1

7.6 研究限制

本研究建置之生物氣膠產生系統在控制溫濕度條件下，以單一 *S. aureus* 為對象進行評估，得以清楚呈現不同採樣方法對 *S. aureus* 之採樣效能，且因本研究以單一菌種進行採樣效能評估，因此採樣完成後無需進行菌種分離與鑑定。然於實際現場採樣後勢必須經過適當分離與鑑定流程以確認 *S. aureus* 存在與否與其濃度值。而不同的 *S. aureus* 鑑定方法之鑑定準確度會影響其檢出率(Luteijn et al. 2011) 甚至其濃度值，因此於實場環境進行 *S. aureus* 空氣採樣時，亦需搭配適當之鑑定流程，綜合考量各採樣方法之現場效能。

此外，過往文獻曾指出，實際環境空氣中存在之混和菌種可能干擾 *S. aureus* 生物活性，而抑制其於選擇性培養基 CSA 上之生長 (Hsiao et al. 2011)。環境中其他混和菌種對 *S. aureus* 生物活性之干擾程度，與不同 *S. aureus* 鑑定流程之鑑定準確度對採樣結果之影響，均非本研究所探討範圍，建議未來可於不同實場環境進行空氣採樣，以瞭解不同環境菌種對 *S. aureus* 採樣效能之影響，此外，需評估/建立針對空氣中 *S. aureus* 之鑑定流程，以避免因鑑定準確度不足而低估環境空氣中之 *S. aureus* 濃度之結果。



7.7 結論與建議

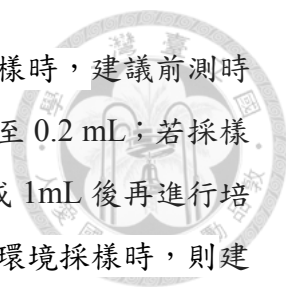
採集空氣中 *S. aureus* 之最佳培養基為非選擇性 TSA，在搭配 Andersen 1-STG 下，其採樣效能顯著優於其他四類選擇性 MSA、BPA、CSA 與 CSM 培養基，而四類選擇性培養基之採樣效能彼此間無統計上顯著差異。考量未來實場空氣採樣或後續樣本分析時，可能須使用選擇性培養基以避免過多雜菌於培養基上生長而干擾採樣或分析結果，故本研究參考四類選擇性培養基之鑑定能力相關文獻、成份研究與本實驗採樣效能評估結果，認為選擇性培養基中採樣效能相對最高之 MSA 相當適用於進行實場環境之 *S. aureus* 空氣採樣。採樣時間方面，Andersen 1-STG 搭配 TSA 與 MSA 於採樣時間 3 分鐘時具 *S. aureus* 最佳空氣採樣效能，其採樣效能顯著優於採樣 6、15、30 與 60 分鐘之結果，而採樣時間介於 6-60 分鐘時其採樣效能彼此間則無顯著差異。

若以收集液為介質採集空氣中 *S. aureus*，其最佳空氣採樣效能之收集液為 Tween 80 mixture，顯著優於 PBS 與 DW 之結果；而 PBS 之採樣效能亦顯著高於 DW。然有鑑於 Tween 80 mixture 於採樣時間延長時採樣效能不降反升，很可能係因 Tween 80 mixture 促進 *S. aureus* 活性甚至增生所致，故本研究認為以 Tween 80 mixture 採集空氣中 *S. aureus* 恐有濃度失真之虞。反之，具適當採樣效能且不含提供細菌增生之養分的 PBS，應較能反應環境空氣中 *S. aureus* 之真實濃度值。採樣時間方面，以搭配 PBS 採樣之前提下，BioSampler 與 AGI-30 之採樣效能皆隨採樣時間延長而下降。

將所有採樣方法進行統計檢定，結果顯示，BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 之採樣效能最佳；BioSampler 搭配 PBS 以及 AGI-30 搭配 Tween 80 mixture 次之；值得注意的是，AGI-30 搭配 PBS 之採樣效能最差，其 R 值顯著低於 Andersen 1-STG 搭配 TSA，並略遜於 Andersen 1-STG 搭配 MSA 之 R 值。

進一步應用現有文獻偵測所得之 *S. aureus* 空氣濃度數據檢視實場採樣方法，並考量本研究以 BioSampler 搭配 PBS 於不同採樣時間下之採樣效能結果，本研究對 *S. aureus* 實場空氣採樣策略之建議，依採樣目的分為兩項：

1. 若採樣目的係進行環境空氣中 *S. aureus* 濃度監測，本研究建議使用 BioSampler 搭配 PBS 進行前測。於環境空氣中 *S. aureus* 濃度較低之環境，如醫療院所採樣時，建議前測時間為 30 與 60 分鐘，後續將收集液濃縮至 0.2mL 進行培養法分析。於



無特定 *S. aureus* 污染源或未經消毒控制之環境，如一般住家採樣時，建議前測時間為 6-60 分鐘，其中採樣時間為 6-15 分鐘時，可將收集液濃縮至 0.2 mL；若採樣時間延長為 30-60 分鐘時，可將收集液濃縮至 0.2 mL、0.5mL 或 1mL 後再進行培養法分析。另，於畜產養殖場所等空氣中 *S. aureus* 濃度較高之環境採樣時，則建議前測時間為 3-60 分鐘，收集液可濃縮至 1mL 或直接經適當稀釋以培養法分析。若採樣時間較短，考量樣本代表性可視環境特性增加樣本數。

2. 若採樣目的係以定性而非定量為目的，欲透過空氣採樣確認空氣中是否存在具可培養性之 *S. aureus*，此時建議可以 BioSampler 搭配 Tween 80 mixture 進行 30-60 分鐘之空氣採樣，採樣中並定時補充收集液。



附錄



1. *S. aureus* 氣膠產生系統之穩定性測試

附表 1 濕空氣流量值 (n = 3)

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

附表 2 乾空氣流量值 (n = 3)

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

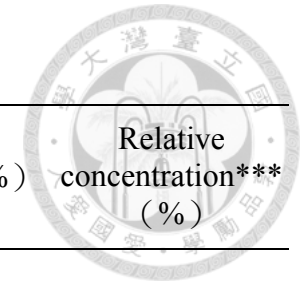
附表 3 Nebulizer 流量值 (n = 3)

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

附表 4 暴露艙中相對濕度測量值 (n = 3)

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

附表 5 Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度 (n=3)

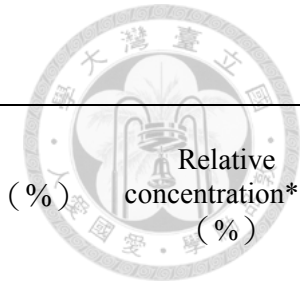


系統運作時間 (Ti) (min) *	Nebulizer 中菌液濃度 (C _{susp} (Ti)) (cfu/mL) **			Mean	SD	CV (%)	Relative concentration*** (%)
	Test 1	Test 2	Test 3				
0-20	待暴露艙中相對濕度穩定						
20	1.20E+04	8.80E+03	1.01E+04	1.03E+04	1.62E+03	15.71	100.00
50	8.35E+03	5.82E+03	6.90E+03	7.02E+03	1.27E+03	18.11	68.06
80	6.20E+03	4.48E+03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

*Ti：開啟系統壓縮空氣使其產生生物氣膠之運作時間

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

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



附表 6 暴露艙空氣中 *S. aureus* 濃度 (n=3)

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

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

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

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

附表 7 採樣效能指標 (R) (n=3)

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

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

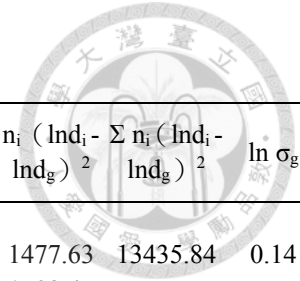
**以 Andersen 1-STG 於系統運作 30-50 分鐘時採樣所得之採樣效能為基準，其他運作時間採樣所得之採樣效能與其中相除之百分比

附表 8 暴露艙中高濃度 *S. aureus* 之粒徑分佈 (n = 3) *

Aerodynamic Diameter (μm)	Test 1 _ Conc. ($\Delta\text{C}/\Delta\log\text{Da}$) (n=30) *	Test 2 _ Conc. ($\Delta\text{C}/\Delta\log\text{Da}$) (n=30)	Test 3 _ Conc. ($\Delta\text{C}/\Delta\log\text{Da}$) (n=30)	Concentration ($\#/\text{cm}^3$)		
				Mean	SD	CV (%)
<0.523	85.62	125.49	91.87	100.99	21.45	21.23
0.542	123.35	168.43	155.93	149.23	23.27	15.60
0.583	218.35	312.49	278.99	269.94	47.72	17.68
0.626	368.35	538.34	586.64	497.77	114.66	23.03
0.673	639.45	932.99	1102.83	891.76	234.42	26.29
0.723	1176.45	1432.07	1612.83	1407.12	219.25	15.58
0.777	1821.45	1930.10	1987.49	1913.01	84.32	4.41
0.835	1597.36	1620.04	1842.25	1686.55	135.32	8.02
0.898	980.45	1120.03	1321.30	1140.59	171.35	15.02
0.965	573.25	698.96	782.26	684.82	105.22	15.36
1.037	243.25	322.31	298.30	287.95	40.53	14.07
1.114	113.25	98.99	138.24	116.83	19.87	17.01
1.197	52.25	39.98	67.24	53.16	13.65	25.68
1.286	15.54	21.04	31.24	22.61	7.96	35.23
1.382	5.25	9.93	15.24	10.14	5.00	49.31
1.486	9.25	5.08	11.30	8.54	3.17	37.10
1.596	2.53	3.09	7.24	4.29	2.57	59.97
1.715	2.35	2.98	4.30	3.21	0.99	30.96
1.843	0.35	1.07	2.23	1.22	0.95	77.62
1.981	1.35	0.07	1.24	0.89	0.70	79.55
2.129	0.34	0.05	0.24	0.21	0.15	72.20
2.288	0.05	0.05	0.04	0.05	0.01	20.13
2.458	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	81.80
2.642	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	81.32
2.839	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	62.08

*Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度為 10^8 CFU/mL

附表 9 暴露艙中高濃度 *S. aureus* 之粒徑 (n = 3) *



Aerodynamic Diameter (μm)	Test 1_ Mean of raw counts(n=30)	Test 2_ Mean of raw counts(n=30)	Test 3_ Mean of raw counts (n=30)	Mean	SD	CV(%)	d_i	$n_i \ln d_i$	$\ln d_g$	d_g	$n_i (\ln d_i - \ln d_g)^2$	$\sum n_i (\ln d_i - \ln d_g)^2$	$\ln \sigma_g$	σ_g
<0.523	12834.94	11044.26	12739.84	12206.35	1007.52	8.25								
0.542	13533.23	11280.25	11740.23	12184.57	1190.40	9.77	0.55	-7218.11	-0.24	0.78	1477.63	13435.84	0.14	1.15
0.583	26282.23	23340.38	9832.04	19818.22	8772.48	44.26	0.58	-10659.31			1709.47			
0.626	43278.80	32870.32	12790.24	29646.45	15497.84	52.28	0.63	-13791.98			1448.71			
0.673	67690.33	65928.24	36365.34	56661.30	17598.89	31.06	0.67	-22312.29			1268.52			
0.723	119230.93	123860.44	152390.33	131827.23	17957.97	13.62	0.73	-42393.48			790.27			
0.777	168350.03	183650.24	203970.29	185323.52	17868.99	9.64	0.78	-46283.48			5.78			
0.835	135180.83	115520.24	153740.34	134813.81	19112.69	14.18	0.84	-23907.07			602.00			
0.898	117540.00	71340.83	95290.22	94723.69	23104.79	24.39	0.90	-9980.14			1824.83			
0.965	43460.03	28367.35	23294.94	31707.44	10489.27	33.08	0.97	-1047.61			1413.23			
1.037	13760.63	9830.35	7730.29	10440.42	3061.11	29.32	1.04	404.46			835.56			
1.114	4720.47	2750.27	3832.56	3767.76	986.69	26.19	1.12	416.89			474.31			
1.197	6300.77	1480.43	3210.22	3663.81	2441.97	66.65	1.20	667.99			666.39			
1.286	1490.93	2720.24	1830.29	2013.82	634.87	31.53	1.29	512.02			500.26			
1.382	780.87	353.18	428.82	520.96	228.25	43.81	1.39	170.05			169.60			
1.486	257.27	116.23	350.16	241.22	117.78	48.83	1.49	96.03			99.50			
1.596	84.25	92.24	89.26	88.58	4.04	4.56	1.60	41.66			45.22			
1.715	26.27	18.62	22.38	22.42	3.82	17.05	1.72	12.15			13.86			
1.843	86.73	22.62	45.28	51.54	32.51	63.08	1.85	31.65			37.97			
1.981	31.03	42.42	9.35	27.60	16.80	60.87	1.99	18.94			23.89			
2.129	6.47	21.27	17.11	14.95	7.64	51.08	2.13	11.34			15.02			
2.288	0.32	13.10	3.73	5.72	6.62	115.71	2.29	4.75			6.60			
2.458	2.33	7.13	0.39	3.29	3.47	105.68	2.47	2.96			4.32			
2.642	0.93	2.90	1.73	1.86	0.99	53.30	2.65	1.81			2.75			
2.839	0.33	0.57	0.60	0.50	0.15	29.09	1.32	0.14			0.14			

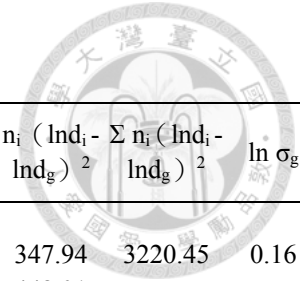
* Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度為 10^8 CFU/mL

附表 10 暴露艙中中濃度 *S. aureus* 之粒徑分佈 (n = 3) *

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

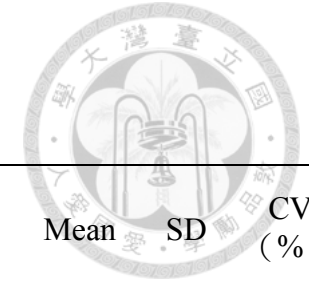
* Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度為 10^7 CFU/mL

附表 11 暴露艙中中濃度 *S. aureus* 之粒徑 (n = 3) *



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

* Nebulizer 中 *S. aureus* 菌液濃度為 10^7 CFU/mL



2. 空氣採樣原始數據

附表 12 Andersen 1-STG 空氣採樣原始數據

採樣器	設計懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	培養基	採樣時間 (min)	實際懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	原始菌落數 (CFU)	校正後菌落數 (CFU)	空氣中細菌濃度 (CFU/m ³)	R	Mean	SD	CV (%)
Andersen 1-STG	5 × 10 ⁴	TSA	3	3.92 × 10 ⁴	311	601.2	7.08 × 10 ³	0.181	0.179	0.02	12.22
				3.24 × 10 ⁴	290	516.4	6.08 × 10 ³	0.188			
				1.83 × 10 ⁴	216	310.6	3.66 × 10 ³	0.200			
				9.28 × 10 ³	101	116.4	1.37 × 10 ³	0.148			
		MSA		6.13 × 10 ⁴	318	633.9	7.46 × 10 ³	0.122			
				2.38 × 10 ⁴	201	279.3	3.29 × 10 ³	0.138			
				1.58 × 10 ⁴	127	155.8	1.83 × 10 ³	0.116			
				1.4 × 10 ⁴	104	120.4	1.42 × 10 ³	0.101			
	5 × 10 ⁴ ~ 1 × 10 ⁵	TSA	6	9.71 × 10 ³	170	221.4	1.30 × 10 ³	0.134	0.139	0.02	16.30
				7.76 × 10 ³	131	158.7	9.36 × 10 ²	0.121			
				3.79 × 10 ³	75	83	4.89 × 10 ²	0.129			
				3.46 × 10 ²	10	10.1	5.95 × 10 ¹	0.172			
		MSA		1.12 × 10 ⁴	141	173.8	1.02 × 10 ³	0.091			
				7.36 × 10 ³	82	91.8	5.42 × 10 ²	0.074			
				3.43 × 10 ³	53	56.8	3.35 × 10 ²	0.098			
				8.43 × 10 ²	11	11.1	6.54 × 10 ¹	0.078			

附表 12 Andersen 1-STG 空氣採樣原始數據 (續)

採樣器	設計懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	培養基	採樣時間 (min)	實際懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	原始菌落數 (CFU)	校正後菌落數 (CFU)	空氣中細菌濃度 (CFU/m ³)	R	Mean	SD	CV (%)	
Andersen 1-STG	1 × 10 ⁴	TSA	15	4.19 × 10 ³	145	180.1	4.24 × 10 ²	0.101	0.111	0.01	6.70	
				2.77 × 10 ³	118	139.8	3.29 × 10 ²	0.119				
				2.35 × 10 ³	97	111.1	2.62 × 10 ²	0.111				
				1.18 × 10 ³	53	56.8	1.34 × 10 ²	0.114				
		MSA			4.73 × 10 ³	140	172.3	4.06 × 10 ²	0.086	0.084	0.00	4.29
					3.08 × 10 ³	100	115	2.71 × 10 ²	0.088			
					2.29 × 10 ³	70	77	1.81 × 10 ²	0.079			
					1.89 × 10 ³	62	67.4	1.59 × 10 ²	0.084			
	1 × 10 ⁴	TSA		30	4.12 × 10 ³	279	478.2	5.64 × 10 ²	0.137	0.130	0.01	5.93
					2.94 × 10 ³	227	335.2	3.95 × 10 ²	0.134			
					1.98 × 10 ³	158	201	2.37 × 10 ²	0.120			
					8.04 × 10 ²	78	86.8	1.02 × 10 ²	0.127			
	MSA			5.23 × 10 ³	265	434.5	5.11 × 10 ²	0.098	0.088	0.01	10.74	
				2.51 × 10 ³	154	194.4	2.29 × 10 ²	0.091				
				1.70 × 10 ³	96	109.8	1.29 × 10 ²	0.076				
				1.26 × 10 ³	83	93	1.09 × 10 ²	0.087				

附表 12 Andersen 1-STG 空氣採樣原始數據 (續)

採樣器	設計懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	培養基	採樣時間 (min)	實際懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	原始菌落數 (CFU)	校正後菌落數 (CFU)	空氣中細菌濃度 (CFU/m ³)	R	Mean	SD	CV (%)
Andersen 1-STG	5 × 10 ³	TSA	60	3.87 × 10 ³	353	856.6	5.05 × 10 ²	0.130	0.132	0.01	7.60
				3.54 × 10 ³	348	816.1	4.81 × 10 ²	0.136			
				2.62 × 10 ³	317	629	3.71 × 10 ²	0.142			
				1.65 × 10 ³	225	330.6	1.95 × 10 ²	0.118			
		MSA		3.67 × 10 ³	288	509.2	3.00 × 10 ²	0.082			
				3.24 × 10 ³	273	458.9	2.70 × 10 ²	0.083			
				2.55 × 10 ³	259	417.1	2.46 × 10 ²	0.096			
				1.61 × 10 ³	154	194.4	1.14 × 10 ²	0.071			

附表 13 AGI-30 空氣採樣原始數據

採樣器	設計懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	收集液	採樣時間 (min)	實際懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	空氣中細菌濃度 (CFU/m ³)	R	Mean	SD	CV (%)	
AGI-30	1 × 10 ⁸	PBS	3	6.90 × 10 ⁷	6.96 × 10 ⁶	0.101	0.114	0.01	11.70	
				5.28 × 10 ⁷	5.84 × 10 ⁶	0.111				
				5.50 × 10 ⁷	7.30 × 10 ⁶	0.133				
				7.18 × 10 ⁷	8.06 × 10 ⁶	0.112				
		Tween 80 mixture	3	8.86 × 10 ⁷	1.16 × 10 ⁷	0.131	0.124	0.02	14.44	
				6.56 × 10 ⁷	9.62 × 10 ⁶	0.147				
				7.30 × 10 ⁷	8.25 × 10 ⁶	0.113				
				6.30 × 10 ⁷	6.74 × 10 ⁶	0.107				
		PBS	6	6	6.23 × 10 ⁷	2.09 × 10 ⁶	0.034	0.042	0.01	14.72
					4.55 × 10 ⁷	1.89 × 10 ⁶	0.042			
					4.94 × 10 ⁷	2.39 × 10 ⁶	0.048			
					6.28 × 10 ⁷	2.75 × 10 ⁶	0.044			
		Tween 80 mixture	6	6	7.83 × 10 ⁷	3.16 × 10 ⁷	0.404	0.342	0.05	14.22
					6.10 × 10 ⁷	2.16 × 10 ⁷	0.354			
					6.05 × 10 ⁷	1.76 × 10 ⁷	0.291			
					5.61 × 10 ⁷	1.79 × 10 ⁷	0.319			
		PBS	15	15	6.08 × 10 ⁷	2.56 × 10 ⁶	0.042	0.035	0.01	16.07
					4.19 × 10 ⁷	1.20 × 10 ⁶	0.029			
					4.60 × 10 ⁷	1.53 × 10 ⁶	0.033			
					5.51 × 10 ⁷	1.93 × 10 ⁶	0.035			
Tween 80 mixture	15	15	7.38 × 10 ⁷	1.51 × 10 ⁷	0.205	0.208	0.03	14.13		
			5.88 × 10 ⁷	1.46 × 10 ⁷	0.248					
			5.23 × 10 ⁷	1.06 × 10 ⁷	0.203					
			4.76 × 10 ⁷	8.42 × 10 ⁶	0.177					

附表 13 AGI-30 空氣採樣原始數據 (續)

採樣器	設計懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	收集液	採樣時間 (min)	實際懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	空氣中細菌濃度 (CFU/m ³)	R	Mean	SD	CV (%)			
AGI-30	1 × 10 ⁸	PBS	30	5.96 × 10 ⁷	7.18 × 10 ⁵	0.012	0.012	0.00	11.38			
				4.05 × 10 ⁷	5.86 × 10 ⁵	0.014						
				4.29 × 10 ⁷	4.90 × 10 ⁵	0.011						
				5.01 × 10 ⁷	5.84 × 10 ⁵	0.012						
		Tween 80 mixture	30	7.17 × 10 ⁷	1.20 × 10 ⁷	0.167				0.175	0.01	6.19
				5.38 × 10 ⁷	9.74 × 10 ⁶	0.181						
				5.86 × 10 ⁷	1.10 × 10 ⁷	0.188						
				4.20 × 10 ⁷	6.96 × 10 ⁶	0.166						
		PBS	60	5.55 × 10 ⁷	4.64 × 10 ⁵	0.008				0.009	0.00	7.16
				3.90 × 10 ⁷	3.79 × 10 ⁵	0.010						
				4.01 × 10 ⁷	3.39 × 10 ⁵	0.008						
				4.61 × 10 ⁷	4.01 × 10 ⁵	0.009						
		Tween 80 mixture	60	7.00 × 10 ⁷	1.88 × 10 ⁶	0.027				0.030	0.00	8.93
				4.88 × 10 ⁷	1.43 × 10 ⁶	0.029						
				6.18 × 10 ⁷	1.87 × 10 ⁶	0.030						
				4.05 × 10 ⁷	1.35 × 10 ⁶	0.033						

附表 14 BioSampler 空氣採樣原始數據

採樣器	設計懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	收集液	採樣時間 (min)	實際懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	空氣中細菌濃度 (CFU/m ³)	R	Mean	SD	CV (%)				
BioSampler	1 × 10 ⁸	PBS	3	7.20 × 10 ⁷	2.39 × 10 ⁷	0.332	0.341	0.01	2.49				
				6.96 × 10 ⁷	2.45 × 10 ⁷	0.352							
				6.54 × 10 ⁷	2.24 × 10 ⁷	0.343							
				8.02 × 10 ⁷	2.71 × 10 ⁷	0.338							
		Tween 80 mixture	3	5.21 × 10 ⁷	1.69 × 10 ⁷	0.324				0.326	0.01	4.52	
				6.88 × 10 ⁷	2.25 × 10 ⁷	0.327							
				6.16 × 10 ⁷	1.90 × 10 ⁷	0.308							
				6.28 × 10 ⁷	2.16 × 10 ⁷	0.344							
		PBS	6	6	6.12 × 10 ⁷	1.61 × 10 ⁷				0.263	0.266	0.01	3.59
					6.28 × 10 ⁷	1.74 × 10 ⁷				0.277			
					6.07 × 10 ⁷	1.55 × 10 ⁷				0.255			
					6.53 × 10 ⁷	1.76 × 10 ⁷				0.270			
		Tween 80 mixture	6	6	6.86 × 10 ⁷	2.45 × 10 ⁷				0.357	0.376	0.03	8.16
					6.06 × 10 ⁷	2.26 × 10 ⁷				0.373			
					5.96 × 10 ⁷	2.51 × 10 ⁷				0.421			
					6.01 × 10 ⁷	2.13 × 10 ⁷				0.354			
		PBS	15	15	6.00 × 10 ⁷	1.38 × 10 ⁷				0.230	0.238	0.01	2.87
					5.71 × 10 ⁷	1.38 × 10 ⁷				0.242			
					7.27 × 10 ⁷	1.71 × 10 ⁷				0.235			
					6.03 × 10 ⁷	1.48 × 10 ⁷				0.245			
Tween 80 mixture	15	15	4.62 × 10 ⁷	1.63 × 10 ⁷	0.353	0.369	0.02	4.76					
			6.25 × 10 ⁷	2.25 × 10 ⁷	0.360								
			5.57 × 10 ⁷	2.19 × 10 ⁷	0.393								
			5.63 × 10 ⁷	2.09 × 10 ⁷	0.371								

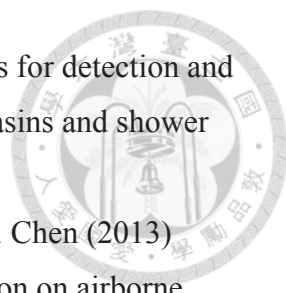
附表 14 BioSampler 空氣採樣原始數據 (續)

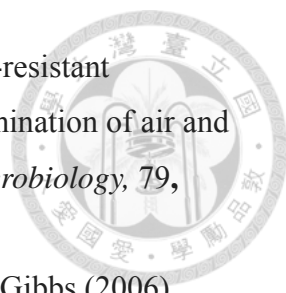
採樣器	設計懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	收集液	採樣時間 (min)	實際懸浮菌液濃度 (CFU/mL)	空氣中細菌濃度 (CFU/m ³)	R	Mean	SD	CV (%)
BioSampler	1 × 10 ⁸	PBS	30	5.83 × 10 ⁷	7.62 × 10 ⁶	0.131	0.136	0.01	7.61
				5.73 × 10 ⁷	8.57 × 10 ⁶	0.150			
				6.79 × 10 ⁷	8.55 × 10 ⁶	0.126			
				6.03 × 10 ⁷	8.36 × 10 ⁶	0.139			
		Tween 80 mixture	30	4.36 × 10 ⁷	1.16 × 10 ⁷	0.266			
				5.81 × 10 ⁷	1.83 × 10 ⁷	0.315			
				5.49 × 10 ⁷	1.58 × 10 ⁷	0.288			
				5.39 × 10 ⁷	1.66 × 10 ⁷	0.308			
		PBS	60	5.51 × 10 ⁷	4.92 × 10 ⁶	0.089			
				5.61 × 10 ⁷	5.10 × 10 ⁶	0.091			
				7.61 × 10 ⁷	6.72 × 10 ⁶	0.088			
				6.90 × 10 ⁷	6.27 × 10 ⁶	0.091			
		Tween 80 mixture	60	4.49 × 10 ⁷	8.40 × 10 ⁶	0.187			
				5.66 × 10 ⁷	1.01 × 10 ⁷	0.178			
				5.64 × 10 ⁷	9.68 × 10 ⁶	0.172			
				5.50 × 10 ⁷	8.89 × 10 ⁶	0.162			

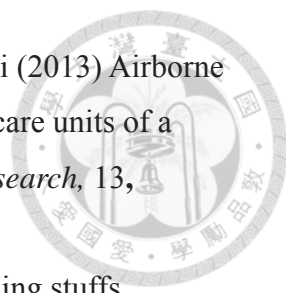
參考文獻

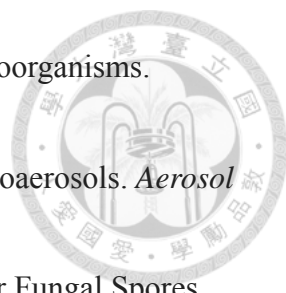



- Albrecht, A., K. Kiel & A. Kolk (2007) Strategies and methods for investigation of airborne biological agents from work environments in Germany. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*, 13, 201.
- Awad, A., T. Elmorsy, P. Tarwater, C. Green & S. Gibbs (2010) Air biocontamination in a variety of agricultural industry environments in Egypt: a pilot study. *Aerobiologia*, 26, 223-232.
- Baird-Parker, A. C. & E. Davenport (1965) The Effect of Recovery Medium on the Isolation of *Staphylococcus aureus* after Heat Treatment and after the Storage of Frozen or Dried Cells. *Journal of Applied Microbiology*, 28, 390-402.
- Bautista-Trujillo, G. U., J. L. Solorio-Rivera, I. Rentería-Solórzano, S. I. Carranza-Germán, J. A. Bustos-Martínez, R. I. Arteaga-Garibay, V. M. Baizabal-Aguirre, M. Cajero-Juárez, A. Bravo-Patiño & J. J. Valdez-Alarcón (2013) Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 369-376.
- Beggs, C. B. (2003) The Airborne Transmission of Infection in Hospital Buildings: Fact or Fiction? *Indoor and Built Environment*, 12, 9-18.
- Buttner, M. P. & L. D. Stetzenbach (1991) Evaluation of four aerobiological sampling methods for the retrieval of aerosolized *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1268-1270.
- Carricajo, A., A. Treny, N. Fonsale, M. Bes, M. E. Reverdy, Y. Gille, G. Aubert & A. M. Freydiere (2001) Performance of the chromogenic medium CHROMagar Staph aureus and the Staphychrom coagulase test in the detection and identification of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2581-2583.
- Chang, C. W. & F. C. Chou (2011) Assessment of bioaerosol sampling techniques for viable *Legionella pneumophila* by ethidium monoazide quantitative PCR. *Aerosol Science and Technology*, 45, 343-351.
- Chang, C. W., F. C. Chou & P. Y. Hung (2010) Evaluation of bioaerosol sampling techniques for *Legionella pneumophila* coupled with culture assay and quantitative PCR. *Journal of Aerosol Science*, 41, 1055-1065.

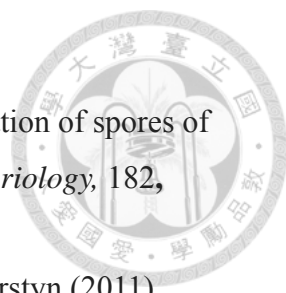
- 
- Chang, C. W. & P. Y. Hung (2012) Evaluation of sampling techniques for detection and quantification of airborne legionellae at biological aeration basins and shower rooms. *Journal of Aerosol Science*, 48, 63-74.
- Chang C. W., S. Y. Li, S. H. Huang, C. K. Huang, Y. Y. Chen & C. C. Chen (2013) Effects of ultraviolet germicidal irradiation and swirling motion on airborne *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* under various relative humidities. *Indoor Air*, 23, 74-84
- Chapin, A., A. Rule, K. Gibson, T. Buckley & K. Schwab (2005) Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives*, 113, 137.
- Chapman, G. H. (1945) The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*, 50, 201.
- De Buyser, M. L., N. Audinet, M. O. Delbart, M. Maire & F. Françoise (1998) Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiology*, 15, 339-346.
- Deloge-Abarkan, M., T. L. Ha, E. Robine, D. Zmirou-Navier & L. Mathieu (2007) Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH). *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 9, 91-97.
- Emanuilova, E., M. Kambourova, M. Dekovska & R. Manolov (1993) Thermoalkalophilic lipase-producing *Bacillus* selected by continuous cultivation. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 247-250.
- Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann & B. G. Spratt (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 7687-7692.
- Ferroni, A., A. Werkhauser-Bertrand, M. Le Bourgeois, R. Beauvais, S. Vrielynck, C. Durand, G. Lenoir, P. Berche & I. Sermet-Gaudelus (2008) Bacterial contamination in the environment of hospitalised children with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7, 477-482.
- Friese, A., J. Schulz, L. Hoehle, A. Fetsch, B. A. Tenhagen, J. Hartung & U. Roesler (2012) Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns. *Veterinary Microbiology*, 158, 129-135.
- Friese, A., J. Schulz, K. Zimmermann, B.-A. Tenhagen, A. Fetsch, J. Hartung & U.

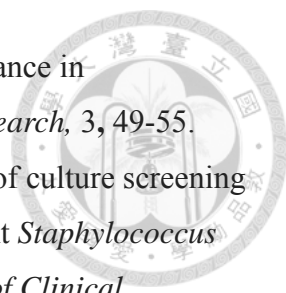
- 
- Rösler (2013) Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2759-2766.
- Gandara, A., L. C. Mota, C. Flores, H. R. Perez, C. F. Green & S. G. Gibbs (2006) Isolation of *Staphylococcus aureus* and Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* from Residential Indoor Bioaerosols. *Environmental Health Perspectives*, 114.
- Gehanno, J. F., A. Louvel, M. Nouvellon, J. F. Caillard & M. Pestel-Caron (2009) Aerial dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital rooms by infected or colonised patients. *Journal of Hospital Infection*, 71, 256-262.
- Gould, S. W., M. Chadwick, P. Cuschieri, S. Easmon, A. C. Richardson, R. G. Price & M. D. Fielder (2009) The evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of lipolytic activity in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and MRSA from two European study groups. *FEMS Microbiology Letters*, 297, 10-16.
- Gray, V., C. Müller, I. Watkins & D. Lloyd (2008) Peptones from diverse sources: pivotal determinants of bacterial growth dynamics. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 554-565.
- Grinshpun, S. A., K. Willeke, V. Ulevicius, A. Juozaitis, S. Terzieva, J. Donnelly, G. N. Stelma & K. P. Brenner (1997) Effect of impaction, bounce and reaerosolization on the collection efficiency of impingers. *Aerosol Science and Technology*, 26, 326-342.
- Han, T. & G. Mainelis (2012) Investigation of inherent and latent internal losses in liquid-based bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science*, 45, 58-68.
- Han, Z., E. Lautenbach, N. Fishman & I. Nachamkin (2007) Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swab specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 43-46.
- Hsiao, P. K., W. T. Chen, K. C. Chang, Y. J. Ke, C. L. Kuo & C. C. Tseng (2011) Performance of CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for Detection of Airborne Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*. *Aerosol Science and Technology*, 46, 297-308.


- 
- Huang, P. Y., Z. Y. Shi, C. H. Chen, W. Den, H. M. Huang & J. J. Tsai (2013) Airborne and surface-bound microbial contamination in two intensive care units of a medical center in central Taiwan. *Aerosol and Air Quality Research*, 13, 1060-1069.
- ISO, S. (1999) 6888-1 (1999): Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. *International Organization for Standardization, Geneva*.
- Jérôme, V., M. Hermann, F. Hilbrig & R. Freitag (2007) Development of a fed-batch process for the production of a dye-linked formaldehyde dehydrogenase in *Hyphomicrobium zavarzini* ZV 580. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 779-788.
- Kane, A. V. & A. G. Plaut (1996) Unique susceptibility of *Helicobacter pylori* to simethicone emulsifiers in alimentary therapeutic agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 500-502.
- Kateete, D., C. Kimani, F. Katabazi, A. Okeng, M. Okee, A. Nanteza, M. Joloba & F. Najjuka (2010) Identification of *Staphylococcus aureus* : DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9, 1-7.
- Kavanaugh, N. L. & K. Ribbeck (2012) Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4057-4061.
- Kim, H. J. & S. W. Oh (2010) Performance comparison of 5 selective media used to detect *Staphylococcus aureus* in foods. *Food Science and Biotechnology*, 19, 1097-1101.
- Kim, S., M. A. Ramakrishnan, P. Raynor & S. Goyal (2007) Effects of humidity and other factors on the generation and sampling of a coronavirus aerosol. *Aerobiologia*, 23, 239-248.
- Lai, M., D. Moschandreas & K. Pagilla (2003) Airborne Bacteria Control Under Chamber and Test-Home Conditions. *Journal of Environmental Engineering*, 129, 202-208.
- Le Loir, Y., F. Baron & M. Gautier (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2, 63-76.

- 
- Li, C. S. (1999a) Evaluation of microbial samplers for bacterial microorganisms. *Aerosol Science & Technology*, 30, 100-108.
- Li, C. S. (1999b) Sampling performance of impactors for bacterial bioaerosols. *Aerosol Science & Technology*, 30, 280-287.
- Li, C. S. & Y. C. Lin (1999a) Sampling Performance of Impactors for Fungal Spores and Yeast Cells. *Aerosol Science and Technology*, 31, 226-230.
- Li, C. S. & Y. C. Lin (2001) Storage effects on bacterial concentration: determination of impinger and filter samples. *Science of the Total Environment*, 278, 231-237.
- Li, C. S., C. C. Tseng, H. H. Lai & C. W. Chang (2003a) Ultraviolet Germicidal Irradiation and Titanium Dioxide Photocatalyst for Controlling *Legionella pneumophila*. *Aerosol Science and Technology*, 37, 961-966.
- Li, C. S., M. L. Hao, W. H. Lin, C. W. Chang & C. S. Wang (1999) Evaluation of Microbial Samplers for Bacterial Microorganisms. *Aerosol Science and Technology*, 30, 100-108.
- Li, C. S. & Y. C. Lin (1999b) Sampling Performance of Impactors for Bacterial Bioaerosols. *Aerosol Science and Technology*, 30, 280-287.
- Li, C. S., C. C. Tseng, H. H. Lai & C. W. Chang (2003b) Ultraviolet germicidal irradiation and titanium dioxide photocatalyst for controlling *Legionella pneumophila*. *Aerosol Science & Technology*, 37, 961-966.
- Li, Y. & Z. Nan (2009) Nutritional study on *Embellisia astragali*, a fungal pathogen of milk vetch (*Astragalus adsurgens*). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95, 275-284.
- Liao, C. H. & L. Shollenberger (2003) Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline*. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 45-50.
- Lin, X., T. A. Reponen, K. Willeke, S. A. Grinshpun, K. K. Foarde & D. S. Ensor (1999) Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid. *Atmospheric Environment*, 33, 4291-4298.
- Lin, X., T. Reponen, K. Willeke, Z. Wang, S. A. Grinshpun & M. Trunov (2000) Survival of airborne microorganisms during swirling aerosol collection. *Aerosol Science & Technology*, 32, 184-196.
- Luteijn, J., G. Hubben, P. Pechlivanoglou, M. Bonten & M. Postma (2011) Diagnostic accuracy of culture-based and PCR-based detection tests for

- 
- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 146-154.
- Macher, J. & H. Burge. 2001. Sampling biological aerosols. In *Air Sampling Instruments* (Cohen BS, McGammon CS, eds). 9th ed. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 661-701.
- Macher, J. & K. Willeke (1992) Performance criteria for bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science*, 23, 647-650.
- Mainelis, G. & M. Tabayoyong (2010) The effect of sampling time on the overall performance of portable microbial impactors. *Aerosol Science and Technology*, 44, 75-82.
- Merlino, J., R. Gill & G. Robertson (1996) Application of lipovitellin-salt-mannitol agar for screening, isolation, and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 3012-3015.
- Mirzaii, M., M. Emaneini, P. Maleknejad, N. Jonaidi, A. A. I. Fooladi, M. Aligholi, F. Jabalameli, S. Halimi, M. Taherikalani & A. Kasaeian (2012) Distribution of bacterial contamination in a teaching hospital in Tehran—A special focus on *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59, 1-11.
- Mondello, F., A. Girolamo, M. Scaturro & M. L. Ricci (2009) Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *Journal of microbiological methods*, 77, 243-248.
- Moodley, A., E. C. Nightingale, M. Stegger, S. S. Nielsen, R. L. Skov & L. Guardabassi (2008) High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Danish veterinary practitioners. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 34, 151-7.
- Moore, G. & C. Griffith (2007) Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1090-1103.
- Noble, W. C. (1975) Dispersal of skin microorganisms*. *British Journal of Dermatology*, 93, 477-485.
- Ogunbanwo, S., A. Sanni & A. Onilude (2003) Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of*

- 
- Biotechnology*, 2, 179-184.
- Paidhungat, M., B. Setlow, A. Driks & P. Setlow (2000) Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, 182, 5505-5512.
- Perez, H. R., R. Johnson, P. L. Gurian, S. G. Gibbs, J. Taylor & I. Burstyn (2011) Isolation of Airborne Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Culturable Air Samples of Urban Residences. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 8, 80-85.
- Perez, J. M., P. Cavalli, C. Roure, R. Renac, Y. Gille & A. M. Freydiere (2003) Comparison of Four Chromogenic Media and Hektoen Agar for Detection and Presumptive Identification of *Salmonella* Strains in Human Stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1130-1134.
- Plou, F., M. Ferrer, O. Nuero, M. Calvo, M. Alcalde, F. Reyes & A. Ballesteros (1998) Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology Techniques*, 12, 183-186.
- Prema, P., S. Bharathy, A. Palavesam, M. Sivasubramanian & G. Immanuel (2006) Detection, purification and efficacy of warnerin produced by *Staphylococcus warneri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 865-872.
- Ray, B. & M. L. Speck (1973) Freeze-injury in bacteria. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 4, 161-213.
- Reanprayoon, P. & W. Yoonaiwong (2012) Airborne concentrations of bacteria and fungi in Thailand border market. *Aerobiologia*, 28, 49-60.
- Rule, A. M., J. Kesavan, K. J. Schwab & T. J. Buckley (2007) Application of Flow Cytometry for the Assessment of Preservation and Recovery Efficiency of Bioaerosol Samplers Spiked with *Pantoea agglomerans*. *Environmental Science & Technology*, 41, 2467-2472.
- Rule, A. M., K. J. Schwab, J. Kesavan & T. J. Buckley (2009) Assessment of Bioaerosol Generation and Sampling Efficiency Based on *Pantoea agglomerans*. *Aerosol Science and Technology*, 43, 620-628.
- Rutala, W. A., E. B. Katz, R. J. Sherertz & F. A. Sarubbi (1983) Environmental study of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic in a burn unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 18, 683-688.
- Sadaka, S., E. El-Ghazzawy, R. Harfoush & M. Meheissen (2009) Evaluation of

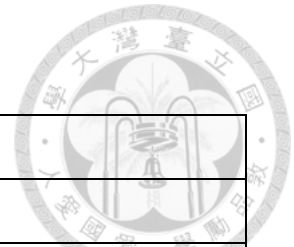
- 
- different methods for the rapid diagnosis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 49-55.
- Safdar, N., L. Narans, B. Gordon & D. G. Maki (2003) Comparison of culture screening methods for detection of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a prospective study comparing 32 methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3163-3166.
- Saito, E., N. Yoshida, J. Kawano, A. Shimizu & S. Igimi (2011) Isolation of *Staphylococcus aureus* from Raw Fish in Relation to Culture Methods. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73, 287-292.
- Sato, M. I. Z., P. S. Sanchez, M. N. Alves, N. C. Stoppe & M. T. Martins (1995) Evaluation of culture media for *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* recovery in swimming pools. *Water Research*, 29, 2412-2416.
- Schulz, J., L. Formosa, J. Seedorf & J. Hartung (2011) Measurement of culturable airborne staphylococci downwind from a naturally ventilated broiler house. *Aerobiologia*, 27, 311-318.
- Schulz, J., A. Friese, S. Klees, B. A. Tenhagen, A. Fetsch, U. Rösler & J. Hartung (2012) Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5666-5671.
- Sharp, S. E. & C. Searcy (2006) Comparison of mannitol salt agar and blood agar plates for identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* in specimens from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 4545-4546.
- Shiomori, T., H. Miyamoto, K. Makishima, M. Yoshida, T. Fujiyoshi, T. Udaka, T. Inaba & N. Hiraki (2002) Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. *Journal of Hospital Infection*, 50, 30-35.
- Shittu, A., J. Lin, D. Morrison & D. Kolawole (2006) Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 317-324.
- Sirigul, C., W. Wongwit, W. Phanprasit, W. Paveenkittiporn, S. D. Blacksell & P. Ramasoota (2006) Development of a combined air sampling and quantitative

- 
- real-time PCR method for detection of *Legionella* spp. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 37, 503-7.
- Stewart, S. L., S. A. Grinshpun, K. Willeke, S. Terzieva, V. Ulevicius & J. Donnelly (1995) Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1232-9.
- Terzieva, S., J. Donnelly, V. Ulevicius, S. A. Grinshpun, K. Willeke, G. N. Stelma & K. P. Brenner (1996) Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2264-2272.
- Thompson, M. W., J. Donnelly, S. A. Grinshpun, A. Juozaitis & K. Willeke (1994) Method and test system for evaluation of bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science*, 25, 1579-1593.
- Thorne, P. S., M. S. Kiekhäfer, P. Whitten & K. J. Donham (1992) Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2543-2551.
- Tseng, C. C. & C. S. Li (2005) Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *Journal of Aerosol Science*, 36, 593-607.
- Tseng, C. H., H. C. Wang, N. Y. Xiao & Y. M. Chang (2011) Examining the feasibility of prediction models by monitoring data and management data for bioaerosols inside office buildings. *Building and Environment*, 46, 2578-2589.
- Van Enk, R. A. & K. Thompson (1992) Use of a primary isolation medium for recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 504-505.
- Wang, Z., T. Reponen, S. A. Grinshpun, R. L. Górny & K. Willeke (2001) Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. *Journal of Aerosol Science*, 32, 661-674.
- Willeke, K., X. Lin & S. A. Grinshpun (1998) Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion. *Aerosol Science and Technology*, 28, 439-456.
- Zetola N., J. S. Francis, E. L. Nuernberger & W. R. Bishai (2005) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infectious Diseases*, 5, 275-86.
- Zhong, Z., T. Chai, H. Duan, Z. Miao, X. Li, M. Yao, W. Yuan, W. Wang, Q. Li, B. A. Zucker & G. Schlenker (2009) REP-PCR tracking of the origin and spread of

airborne *Staphylococcus aureus* in and around chicken house. *Indoor Air*, 19, 511-516.

李聰明, 蘇秋霞, 周偉惠, 王立信, 王復德, 王振泰, 呂學重, 周明淵, 莊銀清, 黃高彬, 陳垚生, 方啟泰, 吳肖琪, 郭英調, 簡麗蓉, 顏哲傑, 曾淑慧 & 張上淳 (2011) 2009 年台灣院內感染監視系統分析報告. 感染控制雜誌, 21, 195-201.

口試委員問題與回覆



余國賓老師	
問題	回覆
實驗系統未裝電荷中和設備，宜考量靜電荷對採樣之影響。	本實驗系統雖未加裝電荷中和設備，然就系統穩定性測試結果可知（圖 13 與圖 14），高濃度（ 10^8 CFU/mL）與中濃度（ 10^7 CFU/mL）時 <i>S. aureus</i> 粒徑氣動粒徑之 GM 分別為為 0.78 與 0.77 μm ，GSD 分別為 1.15 與 1.17，顯示暴露艙空氣中之 <i>S. aureus</i> 為單一粒徑分佈。
圖 16 與圖 17 之實驗包含兩變因：Operation time 與空氣採樣時間，宜分別釐清各變因之影響。	本實驗僅探討空氣採樣時間對採樣效能之影響，Operation time 為系統開啟壓縮空氣後之運作時間。
附表 7 之 Relative concentration (%) 意義為何？	以 Andersen 1-STG 於系統運作 30-50 分鐘時於暴露艙採樣所得之採樣效能為基準，其他運作時間採樣所得之採樣效能與其相除之百分比（已補說明於附表 7）。
濃度表示方法應統一。	已修正。
測粒徑分佈時使用之細菌濃度和以 Andersen 1-STG 或液體採樣器採樣時使用濃度不同，不同濃度時粒徑分佈是否不同？採樣效能是否有影響？	1. 如圖 13 與圖 14 所示，高濃度（ 10^8 CFU/mL）與中濃度（ 10^7 CFU/mL）時 <i>S. aureus</i> 粒徑氣動粒徑之 GM 分別為為 0.78 與 0.77 μm ，GSD 分別為 1.15 與 1.17，顯示變異性不大，而低濃度（ 10^5 CFU/mL）部分，由於菌液經氣懸後進入暴露艙中微粒數較少，以 APS 偵測時無法清楚呈現暴露艙空氣中微粒濃度

	<p>與其粒徑分佈，故無顯示數據。</p> <p>2. 比較附表 12 附表 13 可發現 R 值大小並未隨菌液高低而變動，舉例而言，以 Andersen 1-STG 搭配 TSA 進行 3 分鐘採樣時，實際懸浮菌液濃度介於 9.28×10^3-3.92×10^4 CFU/mL，而 R 值介於 0.148-0.200，然 AGI-30 搭配 PBS 進行 3 分鐘採樣時，實際懸浮菌液濃度介於 5.28×10^7-7.18×10^7 CFU/mL，而 R 值則介於 0.101-0.133，因此可知 R 值高低應與懸浮菌液濃度無直接相關。</p>
參考文獻期刊名需大寫	已修正於 P137-146。
採樣效能實驗需有實驗室空白樣本	已補空白試驗（P33），結果顯示以 Andersen 1-STG、AGI-30 與 BioSampler 採樣時皆無其他細菌汙染情形（菌落數皆為 0）。
Nebulizer 每分鐘損失之液體體積應可量化，進入暴露艙中之細菌數量即可經換算得知，再計算採樣器採樣所得細菌濃度，應可計算回收率。	謝謝老師的建議。然本研究於每次進行效能評估實驗時，Nebulizer 中菌液濃度皆不盡相同，其中細菌經氣懸後，進入暴露艙之過程中於管線之殘留程度未知，故目前僅以採樣前後 Nebulizer 中菌液濃度之平均值校正採樣器採樣所得空氣中細菌濃度，以作為評比不同採樣方法之採樣效能的指標。
吳佩芝老師	
問題	回覆
在實場採樣時，最適當採樣時間之判斷基準為何？	相關說明呈現於 P110-112。

摘要應該是簡單的背景描述、目的、重要結果與結論，可精簡呈現。	已修正於 PII-V。
系統穩定性資料可放附錄。	已將附表補充於 P119-136。
粒徑分佈若為三重覆應作圖於一張圖上以證明粒徑分佈無差異。	已修正如圖 13 與圖 14 所示。
Relative R 的意義要附註說明。	已附註說明於表 6-8、10、14-17
Andersen 1-STG 可半定量空氣中生物氣膠濃度。若以 Andersen 1-STG 採樣 60 分鐘，應該會有 overloading 的現象，以此數據呈現採樣效能是否適當？	由附表 12 之原始菌落數 (CFU) 可知，於適當懸浮菌液濃度下 (5×10^3 CFU/mL)，Andersen 1-STG 搭配 TSA 採樣 60 分鐘時，培養菌落數介於 225-353 CFU，而搭配 MSA 採樣 60 分鐘時，菌落數則介於 154-288 CFU，由上述結果顯示 Andersen 1-STG 採樣 60 分鐘時，菌落數介於合理計數範圍 (< 400 CFU)，應無 overloading 之疑慮。

黃耀輝老師	
問題	回覆
此研究結果對於實場採樣時之具體建議為何？	相關說明呈現於 P110-112。
作圖 X 軸之 Operation time 應表示清楚。	已修正於圖 16 與圖 17。

張靜文老師	
問題	回覆
需查閱文獻以瞭解監測空氣中總細菌 (真菌) 或特定病原菌時其規劃採樣策略之考量因素。	相關說明呈現於 P110。
建議可將金黃色葡萄球菌存在環境空氣中之濃度分類，評估具最佳採樣效能之 BioSampler 所搭配之採樣時間，是否	相關說明呈現於 P110-112。

<p>可採集足夠之細菌濃度，再由此結果建議採樣策略應較具體可行。</p>	
<p>需補充研究限制</p>	<p>相關說明呈現於 P115。</p>
<p>需製表以了解 Andersen 1-STG 採樣結果是否出現 overloading 之情形(包含懸浮菌液濃度、採樣時間、未校正前之菌落數、校正後之菌落數與空氣中細菌濃度等)</p>	<p>已補充於附表 12</p>

