

計畫編號：DOH95-DC-1022

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

以空氣微生物採樣及檢驗機制建立生物恐怖攻擊早期
預警系統之可行性評估

研究報告

執行機構：國立成功大學環境醫學研究所

計畫主持人：蘇 慧 貞 教授

研究人員：莊啟佑、謝在鈞、范耀元、蘇育民、吳佩芝

執行期間： 95 年 1 月 1 日至 95 年 11 月 15 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

中文摘要.....	1
Abstract.....	2
一 前 言.....	3
1.1. 生物武器之背景.....	3
1.2. 生物武器之運用與性質.....	5
1.3. 氣膠施放生物武器之預警與偵測.....	7
1.4. 生物恐怖攻擊預警系統實例現況評估.....	8
1.5. 生物恐怖攻擊預警系統未來發展之目的及方向.....	15
二 材料與方法.....	17
2.1 可能成為攻擊目標之選取.....	17
2.2 環境監測之採樣策略與規劃原則.....	18
2.3 採樣點數目與選取.....	19
2.4 生物氣膠微粒環境採樣技術.....	20
2-4-1 非活性微生物微粒收集.....	21
2-4-2 活性微生物捕集培養.....	22
2.5 其他採樣監測技術.....	24
2-5-1 溫濕度.二氧化碳量測.....	24
2-5-2 通風換氣效率量測與感染風險模式.....	24
2-5-3 計算流體力學(Computational Fluid Dynamics)氣流電腦模擬.....	27
2.6 快速多重致病原篩檢技術 Multi-plex PCR.....	28
2-6-1 DNA 萃取與專一性引子設計.....	29
2-6-2 PCR 偵測極限測試.....	33
三、 結果與討論.....	34
3.1 辦公建築空間結果.....	34
3-1-1 目標建築資料概述.....	34
3-1-2 辦公空間-溫濕度.二氧化碳監測結果.....	35
3-1-3 辦公空間-活性微生物捕集培養.....	36
3-1-4 辦公空間-通風換氣效率與感染風險推估.....	40
3.2 國內航站監測結果.....	45
3-2-1 目標建築資料概述.....	45
3-2-2 國內航站-溫濕度.二氧化碳監測結果.....	46
3-2-3 國內航站-活性微生物捕集培養.....	48

3-2-3 國內航站-CFD 電腦程式氣流模擬.....	50
3.3 國際航站結果.....	56
3-3-1 目標建築資料概述.....	56
3-3-2 國際航站-溫濕度.二氧化碳監測結果.....	57
3-3-3 國際航站-活性微生物捕集培養.....	59
3-3-4 國際航站-入境大廳通風換氣效率與感染風險推估.....	61
3.4 非活性微生物微粒收集.....	64
3-4-1 PCR 偵測極限	64
3-4-2 實場樣本偵測.....	67
四 結論與建議	75
五 計畫重要研究成果及具體建議	77
參考文獻.....	78

圖目錄

圖一 Biowatch 串連式濾紙採樣器.....	9
圖二 Biohazard Detection System, US Postal Office	11
圖三 Autonomous Pathogen Detection System, APDS	13
圖四 靜電集塵式採樣器與串連式採樣器	22
圖五 Burkard 單階式活性微生物空氣採樣器	23
圖六 各辦公室及室外之二氧化碳濃度分佈圖	36
圖七 辦公空間 8 小時感染風險推估	42
圖九 不同換氣量風險推估	45
圖十 國內航站二氧化碳濃度分佈圖	46
圖十一 國內航站溫度分佈圖	47
圖十二 國內航站濕度分佈圖	48
圖十三 國內航站 CFD-1	51
圖十四 國內航站 CFD-2	52
圖十五 國內航站 CFD-3	53
圖十六 國內航站 CFD-4	55
圖十七 國內航站 CFD-5	56
圖十八 國際航站二氧化碳分佈圖	57
圖十九 國際航站溫度分佈圖	58
圖二十 國際航站濕度分佈圖	58
圖二十一 Burkard 採樣器進行微生物量測	61
圖二十二 入境大廳 SF6 風機灌注施行與換氣效率量測	62
圖二十三 國際航站大廳感染風險推估	63
圖二十四 <i>B.cereus</i> 之 G1pf primer set 偵測極限結果	65
圖二十五 <i>Y. enterocolitica</i> 之 YRF-YRB 偵測極限結果	66
圖二十六 Universal primer 之 PEU7-PEU8 primer set 偵測極限結果	67
圖二十七 PC filter sample universal primer test	68
圖二十八 PC filter sample 2 nd universal primer test.....	69
圖二十九 PC filter G1pf primer test.....	70
圖三十 PC filter and ESP sample YRF-YRB primer test	72
圖三十一 辦公空間 PC filter YRF-YRB primer test	73

表 目 錄

表一 常見之具生物武器潛力之微生物種類及分類	5
表二 香港室內空氣品質管理規範所訂定之樣本數目原則	19
表三 炭疽郵件事件感染機率風險	27
表四 PCR program	33
表五 各辦公空間室內八小時平均溫濕度變化	35
表六 辦公空間-微生物濃度 (CFU/m ³).....	38
表七 各辦公空間之通風量測結果	41
表八 辦公空間不同呼吸率及換氣量之風險推估/8 小時暴露/每萬人風險.....	43
表九 國內航站-微生物濃度 (CFU/m ³).....	49
表十 國際航站-微生物濃度 (CFU/m ³).....	60
表十一 國際航站不同呼吸量之風險推估	63
表十二 國際航站入境大廳 4ACH 通風換氣量風險推估.....	64

中文摘要

生物恐怖攻擊因其造成之嚴重人員傷害與相關心理、社會、經濟衝擊，近來已成為公共衛生及國防安全之重要議題，最佳防範乃為於攻擊發起之初即行早期偵測並預警。本研究著眼於生物恐怖攻擊，架構一以空氣中微生物監測為基礎之早期預警系統。其依照室內環境採樣監測原則選取採樣點進行活性微生物培養與非生物性微粒收集，俾能取得具代表性之樣本。同時本系統配合 CFD 電腦程式模擬瞭解現場可視化氣流，並驗證微生物之分佈動向，使採樣規劃更臻完備，此外藉由通風換氣效率量測以及感染風險模式評估等工具，瞭解遭受生物戰劑感染之風險。結果顯示，本研究之採樣點選取設置之原則能有效反應生物戰劑施放時環境間濃度之差異。而根據推算，小樓地板面積且低通風量之環境，受生物戰劑攻擊時之感染風險較高，提高空間之通風量則能有效降低感染風險。本研究於國內航空站試行使用 CFD 電腦程式模擬流場之結果，與活性微生物濃度分佈大致相符。未來於正式系統建置時，將可採用此一工具協助建構。以 PCR 為基礎之偵測技術，實有偵測極限與環境干擾等問題，目前尚未完全發展成熟，亟待更多實場測試技術盲點與突破限制。

關鍵字：生物恐怖攻擊、生物戰、生物氣膠、感染模式

Abstract

Bioterrorism attacking has raise public concerns in psychological, social, and economic impacts around the world. It is therefore needed to establishing early warning system by conducting environmental monitoring system in different potential candidate environments for bioterrorism attacking. The aim of this study is to design an early warning system against bioterrorism attacking. The indoor air sampling strategy had ensured viable bioaerosols and non-viable particle collection in our study gaining representative samples with consistent concentration distribution pattern between computational fluid dynamics (CFD) model and microbial concentrations. The estimated infection risk, which was established based on ventilation measurement, has shown that higher ventilation decreases the risk of infection. The PCR technology in detecting specific environmental bioterrorism bacteria has shown the limitation in detection limit and specificity that is need for further modifying in the following year.

Keywords: Bioterroism, bioaerosols, infection risk, computational fluid dynamics, PCR

一 前言

1.1. 生物武器之背景

環境中之各類型微生物無所不在，且隨各種自然現象與人類遷移於世上移動，歷史上因軍隊遠征所夾帶之微生物造成疾病爆發之狀況時有所見。而將致病性微生物應用為武器攻擊敵人之手段，見諸史載亦屢見不鮮，最遠可溯及古羅馬時代以屍體污染水源使敵軍陷入無安全飲水之窘境。十八世紀北美開拓時期，亦有記載將天花患者使用過之毛毯贈與原住民意欲使其染病之記載。近代之一次大戰德軍以實驗動物測試炭疽生物試劑、二次大戰日軍 731 部隊進行利用飛機散佈帶有鼠疫之跳蚤及以人體進行炭疽生物試劑測試等各類生物攻擊之實驗。冷戰時期蘇聯於施佛洛夫司克 (Sverdlovsk)、美國於戴翠克堡 (Detrik Fort) 均設置有相關研究機構，以進行攻擊性或防禦性生物武器研究開發之傳聞更是甚囂塵上。(Karwa *et al.*, 2005)

自 1972 年自聯合國〈禁止生物武器公約〉公布簽訂之後，各締約國間漸次確有收斂，轉而將此類研究轉向防禦與預防層面。然而，生物武器原料可取自天然，不似化學武器或核子武器製備困難、造價高昂，且以基因工程為本之改進純化技術普遍，使其被稱為“窮人的核彈”，如此性質使其為恐怖組織與第三世界國家趨之若鶩。1984 年美

國一激進教派以 *salmonella* 桿菌污染當地飯店之生菜沙拉，致使 750 名民眾感染臥病不起。無獨有偶，日本奧姆真理教派，亦曾嘗試於散佈炭疽桿菌與肉毒菌素，幸而失敗而未造成死傷。(Karwa *et al.*, 2005)

真正使生物武器廣為世人所知之事件當推 2001 年 9 月 11 日發生之美國炭疽郵件攻擊事件。發動該事件之組織將炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*)之乾燥孢子包夾於信封中，透過郵件系統，寄往美國參議院議員辦公廳、NBC 國家廣播公司等政府機關及傳媒機構，產生十一起吸入性感染病例，並且造成五名犧牲者。(Stratis-Cullum *et al.*, 2003)。其中有七名患者於郵局工作時遭受感染，推測其可能由於炭疽孢子通過信封紙張孔隙間散佈因而受襲。兩名患者則於廣播公司開啟信封時遭受感染。另外並未直接接觸該封郵件之兩名患者，則因無法直接追蹤感染途徑，被推測其因接觸炭疽孢子擴散之其他郵件而遭感染。(Fennelly *et al.*, 2004)

一般咸認可作為生物武器之微生物種類繁多，舉凡真菌、細菌、病毒及其毒素等均可經由精製濃縮後使用，然而其攻擊與威脅效果與下列因素相關：致病力、製作過程、施放方式、針對目標。

以殺傷人員效率而言，具有高致病力之微生物，自然較具有作為武器之良好潛力。然生物武器不同於傳統火藥或化學武器，過高之致病力與致死率可能使得人員短時間內大量死亡，影響後續之軍事佔領

與復舊工作，且其亦可能反之傷及我方人員或鄰近盟軍。良好之生物武器應可精準定量施放劑量與控制傷害效果。

1.2. 生物武器之運用與性質

生物武器所用之微生物雖可取自於自然界，然而原始種株之取得難度以及精製成為可作武器之過程，及其運送保存所需之訓練亦影響其可做為生物武器之潛力。可能常見具有改製為武器潛力之微生物如下表一所示(Karwa *et al.*, 2005; Gottschalk *et al.*, 2005, Hilleman, 2002)：

表一 常見之具生物武器潛力之微生物種類及分類

Biological Agent	Disease
A 類	
<i>Variola major</i>	Smallpox
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax
<i>Yersinia pestis</i>	Plague
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulism
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia
Filovirus and arena viruses (e.g., Ebola virus, Lassavirus)	Viral hemorrhagic fevers
B 類	
<i>Coxiella burnetii</i>	Q fever
<i>Brucella species</i>	Brucellosis
<i>Burkholderia mallei</i>	Glanders
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidosis
Food safety threats (e.g., <i>Salmonella species</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7)	
Water Safety threats (e.g., <i>Vibrio cholera</i> , cryptosporidium)	
C 類	
Emerging threat agents	
Nipah virus	Encephalitis
Hantavirus	Hantapulmonary virus syndrome
Yellow fever	
Multi-drug resistance tuberculosis	

表一乃基於美國疾病管制局 CDC 對微生物可造成之疾病傷亡、施放效果、大量生產之可能性、人傳人之傳播特性等分類依據，粗分為三

類：

A 類為可能人傳人、具有造成大量傷亡潛力、容易施放擴散之最具有威脅性等級微生物。B 類為中度威脅等級微生物，其須公衛醫療系統之介入方能診斷與監測。C 類則為新興之致病原，該類微生物易於施放但目前因出現病例稀少故原始種株取得困難。

傳統之生物武器施放方式為透過水源或食物進入人體，如表一中之 B 類微生物均可污染飲水與食品後，造成迅速之嘔吐及下痢等症狀。然該方式因需克服環境中之稀釋作用以及淨水烹煮，需大量施放方能奏效，兼之以近來消毒殺菌劑及抗生素之開發卓成，此類方式已漸限於地區性擾亂敵方作戰而威脅漸低。

近來生物武器最佳之施放方式為氣膠(aerosol)施放，其乃將微生物釋放於空氣環境之中，形成 μm 等級大小之粒徑微粒。其中 1-5 μm 粒徑氣膠於空氣中之移動型態較似於氣體，可能經由呼吸進入人體支氣管與肺泡中而(Cox *et al.*, 1995)。而大於 5 μm 粒徑氣膠則可能沈降於地面或物體表面，造成另一途徑之感染。(Donaldson *et al.*, 2004)

較諸既往生物攻擊之形式，氣膠施放之優勢在於效果迅速且匿蹤無形，難以防範，以表一中之 A 類為例，其中之各類均可以氣膠方式施放。氣膠施放之方式除匿蹤外，其額外之優勢為殺傷效果卓著、所需劑量較低、維持效果長久。文獻指出之以既有病例配合數學模式

推估發現，僅只施放數千至數百萬個微生物即可造成殺傷效果。以炭疽桿菌為例，以飛行器於人口密度每平方公里 10,000 人之 300 平方公里地區平均施放 10Kg 乾燥孢子，即可造成三百萬人之死亡。另以肉毒桿菌素為例，氣膠化施放之肉毒桿菌素在空氣中衰減率約為 1~4%/min，施放後空氣中濃度若要降低至 10^{-13} 濃度以下之狀況，則需時兩日。(Karwa *et al.*, 2005)

氣膠施放生物武器，如 2001 之炭疽郵件攻擊事件致使生物武器提升至戰略層級，運用方式亦為之丕變，不再僅限於傷害軍務人員，全民不分前線後勤，均有可能成為目標。然而生產、儲存、施打足量多種大量疫苗於經濟上並非可行，故防制生物武器之對策，近年來漸次走向先期環境偵測與預警。

1.3. 氣膠施放生物武器之預警與偵測

傳統上對於生物氣膠之評估，可分為以活性微生物培養及非活性微生物微粒收集兩類。

活性微生物培養為目前針對生物戰劑分離、偵測、鑑定之 golden standard 技術(Lim *et al.*, 2005)。其優點在於可確定採樣瞬時具有活性之微生物種類及數量，得以確實進行暴露評估。然環境中微生物種類分佈極為複雜，而目前有限的培養基質類別未能完全提供所有種類微生物均等生長機會。且微生物採樣後至生長完成需時 2 至 7

天，又易受技術人員主觀之認定差異影響，容易造成數據解讀之誤差。此外，為配合菌落計數上的可行性及目前之採樣儀器，此技術僅適用於定點、短時間的樣本收集，難以長期監測微生物分佈及出現狀況。(ACGIH, 1999; Mainelis *et al.*, 1999)

而非活性微粒收集乃利用諸如 DNA 結合、抗體專一結合及免疫酵素結合等技術，針對微生物遺傳及生化物質進行分析與偵測，其可大幅縮短分析時間以獲取防疫措施開展之先機，然則其僅只適用於微生物環境濃度較高，以及環境中無其他物質干擾之狀況。(Lim *et al.*, 2005)。

非活性物質微粒收集為克服上述限制，泰半均於樣本收集後進行分析之前，進行濃縮及純化等處理，以減少干擾及提高分析敏銳度。例如以 PCR 針對特定危害性微生物進行 DNA 增幅，使其於數小時內將原本濃度較低之 DNA 增幅至 10^6 倍。(Radstrom *et al.*, 2004)。

此外此類採集方法雖可長時間收集微粒，但收集之微粒無法進行有效分離，且因受此收集裝置之長時間衝擊及乾燥化之影響，使得大多數微生物均已失去活性。因此此類方法無法確認環境中是否含有活性具致病力之微生物顆粒，僅適用於生物指標之定量分析。

1.4. 生物恐怖攻擊預警系統實例現況評估

以美國國土安全部針對氣膠施放之生物武器攻擊建構之

BioWatch 環境監測系統為例，其由美國 Lawrence Livermore and Los Alamos 實驗室所設計之 Biological Aerosol Sentry and Information System(BASIS)為骨架，採取非活性微生物顆粒收集機制，由原隸屬美國環保署之各地空氣品質監測站，於費城、紐約、華盛頓頓特區、舊金山、芝加哥等涵蓋美國都市人口之 21 個城市，加設串連式濾紙採樣器進行 24 小時連續採樣。其空氣採樣之機構裝置如下圖一所示：



圖一 Biowatch 串連式濾紙採樣器

採樣取得之濾紙樣本，則由人工交予美國 CDC 所屬之當地各實驗室，由檢驗人員以 PCR 分子生物方式針對 Anthrax samllpox plague 以及 tularemia 為目標致病原進行分析，屬於非活性微生物顆粒收集方式。取得之資料若認為需進一步採樣分析，則由 CDC 進行後續詳細之採樣檢驗工作。相關反恐及執法工作則交由聯邦調查局 FBI 進行。(Brown, 2004)

美國之 BioWatch 預警系統以樣本收集與分析之範疇而言，其本體之 BASIS 本體雖然已在 2002 年鹽湖城冬季奧運進行過室內與室外之實場使用驗證，其展現良好偵測專一性及以低至 0.005% 之偽陽性比率均顯示其效能卓著，然而其技術骨幹乃採用濾紙收集及 PCR 分析，樣本收集需依靠大量人工更換耗材及執行分析，不僅在實施長期監測上有所限制，對於收集之致病原無法於密閉分析處理，對於工作人員之安危亦無保障。

而以 PCR 技術進行分析，僅能給予決策當局該偵測環境中微生物遺傳物質 DNA 是否有無存在之粗略資訊，對於 Anthrax、Plague 以及 tularemia 等之自然界致病原，無法分別其為自然發生或是軍事武器攻擊，在防疫作戰資源運用上則可能有所誤導。而 BioWatch 系統因事涉國家安全，故如採樣地點、採樣流量、後送時間等操作參數條件均列為機密秘而不宣，故其最低偵測極限與排除背景、品保/品管等資訊亦付之闕如。

BioWatch 預警系統僅只倚賴 PCR 進行分析篩選之原因為其重視時效性與低操作成本，結合 CDC 既有分析技術與 USEPA 既存監測站址，迅速連結構成預警系統。以 PCR 技術分析之優勢在於專一性高，鑑定速度快，在微生物擴散初期即可初步篩選，提供後續初步資料予後續之偵檢人員參考，對於生物恐怖之先期偵測仍有不可抹滅之取代

性。(Shea *et al.*, 2003)

而在 911 炭疽郵件攻擊事件後，美國郵政當局自 2003 年起，針對此一攻擊方式，另行採用 Northrop Grumman 企業所設計之 Biohazard Detection System(BDS)偵測預警系統。其為結合市售之 Cepheid GeneXpert 技術模組化儀器與 Advanced Facer Cancellor System 郵件分選器。於分選器中加設高流量吸引器，設置於郵件分發中心，針對通過分選器之包裹信封進行微生物偵測。每小時吸引所得之空氣樣本則溶入內含無菌水之樣本槽中，而後進行針對炭疽桿菌孢子為主之全自動 real-time PCR 偵測，並以電腦連線方式全自動控制並回報偵測狀況，其運作方式與圖片如下圖二所示(Jaffer, 2004)：



圖二 Biohazard Detection System, US Postal Office

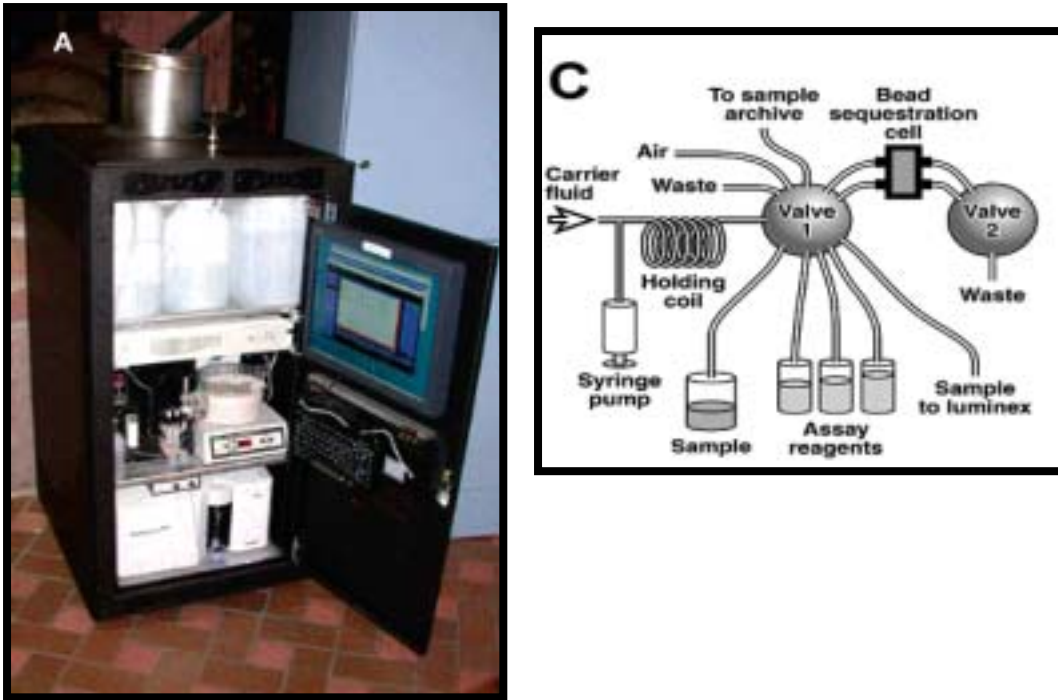
來源：<http://www.lunewsviews.com/usps/pcr.htm>

若受檢郵件中含有具危險性之微生物，該系統即立即停止郵件分選器，封存該批次郵件，通知檢驗防疫單位進行確認測試與開展防疫

措施。此一系統目前經由數單位測試完成，而 Northrop Grumman 企業已獲政府合約，於美國國內數個大型郵件中心安裝並實用此一系統。此一系統乃以高流量氣罩空氣吸引收集微粒，而後加以分析，然而此一使用氣罩之設計，實囿於單一小型物件或區域檢測，未能廣泛適用於大型公共空間

針對最具有生物恐怖攻擊造成衛生健康憂慮之公共空間監測，美國 Lawrence Livermore 實驗室業已著手開發可取代 BASIS 之次世代之監測設備-全自動致病原偵測系統 (Autonomous Pathogen Detection System, APDS) 該系統結合旋風式(cyclone)採樣器、液體注射裝置 (sequential injection analysis, SIA)、螢光免疫微粒組合 (streptavidin-phycoerythrin microspheres, SA-PE)、流式細胞儀(flow cytometry)、即時 PCR(real-time flow through PCR)等設備，成為一可同時收集、分析、傳送資料完整之獨立偵測系統。 (Hindson *et al.*, 2005)

其實體照片與工作示意圖如下圖三所示：



圖三 Autonomous Pathogen Detection System, APDS

APDS 系統之微粒捕集部分乃採用市售之 wetted-wall cyclone collector (SASS 2000 Research International, WA)，配合其自行設計之 LLNL vitural impactor 組成兩階段之微粒收集部分，以總流量 3000L/m 之流量捕集 1-10 μm 粒徑之微粒。此外，該生物微粒收集部分並配置粒子計數器與控制電腦，即時取得微粒收集之粒徑與捕集量等資料。(Hindson *et al.*, 2005)

以 wetted-wall 旋風式捕集亦屬於非活性生物微粒捕集之形式，其雖可突破粒子乾燥失活之限制，可進行長時間之自動監測，然而其限制為於將粒徑範圍內之所有微粒均收集至同一樣本中，未能進行粒子分離。此一限制在面對細菌、真菌、病毒等多重致病原時易造成後續分析處理上之繁雜。

其所使用之 SASS 2000 旋風採樣器，原始為室外採樣所設計開發，故採取較大流量之捕集(約為 275L/m)，如此大流量是否適用於長時間之室內監測，則其尚有疑義。此外，旋風分離器乃為一特定粒徑採樣器，針對可能為人體所吸入粒徑範圍之微粒進行採樣。然而此一採樣技術之限制在於若生物戰劑附著於其他媒介共同散佈，抑或混入其他物質改變其於空氣之黏滯度、或是因為凝結而改變氣動粒徑等物理性質，則其可能脫出旋風採樣器之可取樣微粒範圍。

APDS 系統所收集之微粒，經沖提移動與螢光微粒組合之抗體進行專一性免疫螢光反應後，再流入 Luminex LX-100 流式細胞儀，針對其螢光訊號進行定性與定量偵測。目前 APDS 系統測試結果，可同時監測八種不同致病原。該系統同時亦有配置 TaqMan real-time PCR 系統，以偵測 DNA 為技術，於現場進行專一致病原之偵測，同時亦有作為定量之螢光訊號以確認微生物採樣所得之量。

綜觀三者偵測預警系統而言，目前美國國土安全部與 EPA、CDC 合作而實際已於環境中應用之 Biowatch 系統於微粒收集機制與分析處理上尚有可改進之處，唯其優勢在於由於低建置與操作成本，故可廣布設置監測點，達到先期預防之制敵機先。美國郵政當局採用之 BDS 系統與新世代 APDS 系統於樣本分析處理環節較諸目前實用化之 Biowatch 系統於封閉操作、定量分析、自動操作等需求更為完備。

如此商品化之技術雖可補其缺，而然其同樣於微粒收集機制而言，仍有適用性與粒子分離需求之發展空間。

1.5. 生物恐怖攻擊預警系統未來發展之目的及方向

近來除生物恐怖攻擊以外，肇因於肺結核、SARS、Avian flu 等各類型可經空氣傳播疾病所引致之環境與健康憂慮甚囂塵上，各類型之微生物快速偵測檢驗系統亦如雨後春筍般實用上市。斟酌衡量此一趨勢，生物恐怖攻擊早期預警系統之設計建置，實已由後段之分析偵測之技術開發，轉移至前段之微粒樣本收集技術及系統採樣設點布建規劃。

本單位於各前期研究中，開發一新型生物微粒收集器，以靜電集塵之方式收集氣膠粒子，因綜觀目前各類生物氣膠粒子收集方式之中，乃以此方式對其活性影響最小。其乃是由於微生物本身因其細胞膜上之可離子化（ionizable）物質，而在液體中或空氣傳播狀態時其趨向呈現攜帶負電荷之狀態。故若對微生物粒子施加以與本身所帶有的負電荷相反電性相反之正電場，則可利用負電相斥之力量，將微生物粒子推動至捕集基質(collection medium)上進行採集。此外，採樣器亦可在進口處對微粒進行充電處理，使其帶有更多負電荷，則後端以電場捕集之效果越佳。

該收集器能對包括真菌、細菌、病毒在內等各類空氣中微生物氣

膠微粒進行公平採樣捕集、並且以電性相斥之方法推動微生物粒子，故其不致因高速撞擊捕集基質，而能維持捕集微粒之生物活性。此外，本收集器之基質以液態為主，故不似固體培養基會因為採樣菌數過多而造成 overloading 之情形，故能長時間進行半自動監測，並能配合分子生物檢測技術，快速鑑定採集樣本。

回顧歷史與實際案例，以生物戰劑發動攻擊，實非無稽之談或窒礙難行。運用手段也並非侷限於兩軍對陣之輔助進攻戰術，而是藉由其特性成為攻其不備及敵後擾亂之利器。因此，一具備高效捕集器，並搭配靈敏度高、準確性足之偵測技術，得進行半自動長期監測早期預警系統之開發勢為所趨

二 材料與方法

本研究之目的在於因應未來可能發生之生物恐怖攻擊，建立一以空氣中氣膠微生物監測檢驗為主體之生物恐怖攻擊早期偵測及預警系統，並透過實際之空氣中微生物採樣與檢驗測試其可行性。而綜觀此一系統，除前言所述之除微粒採樣設備與分析技術以外，另一重點為系統建立之採樣點設置原則、採樣時間擬定、採樣樣本後送保存等各類採樣規劃原則，如此方能取得具有環境代表性之樣本，不致掛一漏萬或有遺珠之憾。

2.1 可能成為攻擊目標之選取

揆諸既往發生之生物戰劑運用、急性傳染病以及生物恐怖攻擊事件歷史，實可發現人口密度高之都會區，市內之政商交通運輸中心等大量人潮流動之公共空間，由於其可使人羣與病原接觸率及人與人間之接觸率提高，故可輕易影響大量人口並癱瘓都市運作及醫療體系。此外，散佈戰劑之兇手可於得手後隨人潮迅速隱匿脫離，較易受恐怖份子青睞。另外一類型之生物恐怖攻擊，乃基於癱瘓政府機構、政商中心運作機能，故辦公室型態之空間亦可能成為攻擊目標。

基於上述，本研究選取國際航空站與國內航空站各一者，作為公共空間型態之系統建置測試代表。另外針對辦公空間之建築型態，則

選取一棟大型政府公務機關以為代表。

2.2 環境監測之採樣策略與規劃原則

選取完成可能成為攻擊目標之測試空間之後，即開始空間內採樣點之選擇與規劃。生物恐怖攻擊之散佈雖然屬於於空間內單一點狀污染源擴散之形式，較為接近大氣環境空氣污染之模式，然而針對生物恐怖攻擊監測之目的實並非追蹤污染源，而是由人體暴露評估和濃度偵測極限探知之考量，取得具有代表性之樣本，俾瞭解空間內居處人員暴露之相關大致程度。佐以邇來生物恐怖攻擊發生於室內之機率遠較室外為高，故本預警系統之採樣策略與規劃原則，乃參考採用本研究團隊於前期執行我國大量公共建築物室內空氣品質之標準方法而定[EPA-91-1610-02-07; EPA-90-FA11-03-163; EPA-89-FA11-03-069]。

此一方法乃以潛在受影響的人數最多為出發點，選取使用頻率較高或人數密度高之樓層。故建築採樣樓層之選取，乃是依據使用空間面積及使用人數多寡選取。若是該建築物各樓層之使用頻率相當，則採以隨機選取之方式。此外，考量對於生物戰劑微粒施放後隨空調系統污染整體建築。利用郵件傳遞等方式對於特定單位空間營運機能癱瘓攻擊(例如對機場中央控制室攻擊使航機起降衝突混亂)以及藉由於空調外氣引入口施放戰劑等可能援引之攻擊方式，同時亦以外氣引入位置、源頭區域，及重要營運機能區域定義為必需採樣空間。

2.3 採樣點數目與選取

一空間內採樣點數目之擬定，首需考量其數目是否足以代表該空間中污染物(亦即戰劑)之濃度，由統計學觀點來言，此一考量應視各污染物之空間濃度變化情況而定 (Standard Deviation, SD)，故本預警系統乃參考 2002 年 USEPA Guidance on choosing a sampling design for environmental data collection 及 Designing clinical research 的調查方法，並以本研究團隊既往進行室內空氣品質調查所收集之數據資料進行計算，推估所需最小樣本數為何。所使用之推算公式如下

$$N = 4Z_{\alpha}^2 S^2 \div W^2$$
，其中 S 為 SD、W 為濃度範圍。

本公式進一步配合香港室內空氣品質小組所建議之最小樣本數目之規定 (表二) 求得一線性方程式： $y = 0.0007x + 5$ ($R^2 = 0.9275$) 依各建築物之面積求得所需最小樣本數後，再依空調管線之分佈來分配採樣點。

表二 香港室內空氣品質管理規範所訂定之樣本數目原則

總樓層面積(m ²)	最低選樣數目
3,000~ < 5,000	8
5,000~ < 10,000	12
10,000~ < 15,000	15
15,000~ < 20,000	18
20,000~ < 30,000	21
30,000 以上	25

而一室內之採樣規劃除上述原則以外，如位於隔間或流場死域則

除去該點、若位於冷暖氣出口等可能影響採樣性能之位置亦須避免。而採樣之高度亦應位於距離地面 100~150cm 等人員採坐姿或站姿時呼吸道之高度。

2.4 生物氣膠微粒環境採樣技術

誠如文獻回顧所言，現階段已開發之生物氣膠微粒採樣分析技術可粗分為活性微生物捕集培養及非活性微生物微粒收集兩種。兩者實各有自身之限制與應用層面。如何能由兼顧目的與限制，因地制宜選擇針對生物微粒擴散監測之適當採樣技術及分析方法，為本預警系統構建之關鍵所在。

可資作為生物戰劑之微生物實包括真菌、細菌、病毒等各類微生物。然而從既往歷史與文獻搜尋可得知，細菌由於環境耐受力和可控制性較病毒佳，殺傷力則較真菌強，加上其粒徑範圍適於改染人體呼吸道，同時易以基因工程變更遺傳抵抗疫苗，更可搭配其他物質利於擴散等諸多特性，當為戰劑媒材首選。故本系統本年度之目標，當以監測包括炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*)，鼠疫桿菌(*Yersinia pestis*)等可能作為生物武器之細菌菌株作為目標，其二者均可藉由呼吸途徑感染，同時亦於過去曾真正被使用作為戰劑媒材，可謂受測首選。

2-4-1 非活性微生物微粒收集

本研究雖已導入本團隊所開發之靜電集塵式微粒捕集器 ESP，欲以分子生物技術迅速篩檢致病原，未來搭配諸如生物晶片或發展成熟之其他微生物偵測系統，然而考量目前本預警系統規劃草創之初，需同時於每一經統計理論公式推估所得之採樣點獨立進行測試，就其裝設成本與實場架設限制考量（如電源供配、人潮動線等），故本年度現階段先行採用類似於美國 Biowatch 之串連式濾紙採樣器進行大規模全場監測。

本系統使用裝載紫外線滅菌 Poly carbonate 材質 Nuclepore 濾紙 (Costar, Cambridge, MA)。其以 cellulose pad 支持後，盛裝密封於 37mm cassette 濾紙匣，全體以紫外線殺菌後，銜接個人型空氣採樣幫浦(Gillian Air, USA)以採樣流量為 2Liter/minute(LPM)監測 24 小時，其實體照片如下圖四所示。經 24 小時採樣所得之濾紙匣，則於密封後水平保存回到實驗室進行分析。

而 ESP 微粒捕集器則設置於目標建築環境中人潮最多區域，以資作為結果比對及測試試行之用。其以 40mL 1% peptone 作為捕集液，同以 2LPM 流量進行採樣，捕集電壓為 3,000V，其實體照片如下圖四所示：



圖四 靜電集塵式採樣器與串連式採樣器

ESP 採樣時間目前由於供電限制以及考量室內居處人員工作時間 8hr-TWA，故以八小時作為採樣時間。所得之液態樣本，盛裝入滅菌完成後之 50mL 離心管密封攜回實驗室分析。

2-4-2 活性微生物捕集培養

此外，由於串連式濾紙採樣僅能提供 PCR 檢驗之微生物遺傳物質全有/全無資訊，對於一空間內微生物之擴散動向定量資訊提供有所限制。故本研究同時採用單階式活性微生物空氣採集器 (Burkard, Model PASA/B, Burkard Mfg Co., Rickmansworth, UK)進行室內空氣採集，此採樣器具有 100 個採樣孔口，孔口直徑均為 1mm，使用之採樣介質為倒入 27mL 培養基之直徑 90mm 可拋棄式塑膠培養皿；當採樣流量為 10 Lpm 時，單階式活性微生物空氣採集器之生物氣膠捕

集粒徑範圍 D_{50} 約在 $4.1 \mu\text{m}$ 左右，針對各類型可能進入人體呼吸道之細菌微粒均能有效捕集，其實體照片如下圖五所示。



圖五 Burkard 單階式活性微生物空氣採樣器

本採樣器之採樣高度鮪魚人體採取站姿或坐姿之呼吸帶高度，為 100-150cm。採樣時間依據本研究團隊過去於國內各類型建築之室內空氣品質量測經驗，訂為 30sec。

本研究中針對細菌採用 Trypticase Soy Agar (TSA) 培養基。其為美國工業衛生師協會 (American Conference of Government Industrial Hygienists, ACGIH) 推薦之廣效性培養基。

每個採樣點進行每日早、中、午採樣並連續監測三天，除在每個採樣點均附以重複試驗外，並於每次採樣時附以空白試驗，以作為品管/品保之程序。採樣後將培養基放入恆溫培養箱中培養，TSA 於 30

下培養 48 小時以評估細菌濃度。培養後將所有培養基取出存放於 4 冰箱中並計數菌落生成數 (Colony Forming Unit, CFU)，再經由

positive hole 公式表(Anderson, 1958)推估空氣中總細菌之濃度。

2.5 其他採樣監測技術

2-5-1 溫濕度.二氧化碳量測

環境微生物監測除空氣中之微粒採樣外，尚須考慮當地之自然條件與現場人數等可能影響微生物繁殖與擴散之因素。本研究於環境微生物進行採樣時同時亦監測溫濕度，如此得以瞭解微生物於該空間是否得以生長繁殖，本研究所使用儀器為 TESTO 400 型精密溫濕度計。大型公共空間如航空站人潮移動迅速，實難以確實掌握人數，故本研究同時監測伴隨長時間監測 8hr 二氧化碳濃度，以作為人口數量之推估。使用儀器為 TSI Q-TRAK IAQ Monitor Model 8551。

2-5-2 通風換氣效率量測與感染風險模式

一空間內室內污染物之移除除使用空氣清靜機等裝置以外，端賴於利用外界新鮮未受污染空氣進入其中，以稀釋污染污染物濃度。而對於受生物戰劑攻擊之空間，則可依此推估居處其中人員受感染之風險機率。本研究採用示蹤氣體濃度衰減法量測空氣交換效率 (Air-Exchange Rate)。此法乃將於目標空間內，或於空調風機內先釋放定量之示蹤氣體，並利用風扇促使室內濃度快速均勻混和，待靜置一段時間後可開始欲探討目標物進行通風量測，由於室內氣體之流動

與稀釋帶出，室內示蹤氣體之濃度會隨時間而衰減，利用計算此衰減率便可得出室內換氣量 ACH 值。其計算方式如式 1 所示。

$$\text{Air-exchange rate, } N = \frac{\ln C(0) - \ln C(\tau_1)}{\tau_1} \text{ (h-1)} \quad . (1)$$

$C(0)$: 時間為 0 時的示蹤氣體初始濃度 , (m³/m³)

$C(t)$: 時間為 t 時的示蹤氣體濃度 , (m³/m³)

t_0 : 實測初始時間 , (hour)

t_1 : 實測結束時間 , (hour) t : 時間 (t)

而空間內人員受空氣中氣膠微生物感染之風險評估則利用 ACGIH 針對 Determinants of Airborne Infection 以及美國疾病管制局 CDC 針對炭疽郵件攻擊事件所發展之數學模式進行計算(ACGIH, 1995; Fennelly *et al.*, 2004)。其評估式為式 2 所示

$$P(\text{infect}) = C/S = 1 - \exp(-Iqt/Q) \quad . (2)$$

Where :

C = The number of cases

S = Persons susceptible to the infection

I = The number of sources of infection

q = The number of “quanta ” or unit of bacilli necessary to cause infection produced per source per unit of time

t = The time of exposure per unit of time

p = The minute ventilation rate of the exposed susceptible hosts
in volume per unit of time

Q = The volumetric rate of fresh air ventilation that remove the
infectious aerosol in volume per unit of time

此一模式乃利用暴露於微生物中，利用半感染劑量 ID_{50} ，考量人員呼吸量與通風換氣量而立論。此處之感染劑量 quanta “ q ”，為可以引起感染之吸入微生物劑量。以生物戰劑攻擊而言，若一人吸入足以引起感染之空氣中可具感染力之細菌孢子微粒數目，即為 $q=1$ 。

而此數目針對一固定濃度污染物為人員所吸入之機率而引起感染之機率依據過去研究文獻中依照 Poisson 分佈統計顯示，此一劑量為可感染 63% 實驗動物之孢子量，即為 1.25 倍之半感染劑量 ID_{50} (Wells, 1955)。而關於炭疽桿菌孢子之半感染劑量，既往之研究眾說紛紜，從臨床研究至空氣採樣所得之數字範圍差距甚鉅。本模式採用 Manchester Mill Outbreak, 1957 實場職業暴露量測(Dahlgreen *et al.*, 1960)以及以 1,236 隻猿猴作為實驗動物之研究(Glassman, 1966)推估 $q=1,750-8.625$ 個 $<5 \mu m$ 粒徑孢子，此一數據亦為其他專家所認可 (ACGIH, 1995; Inglesby *et al.*, 2002)。此外，此一模式針對事件情景同時做出如下參數假設。暴露時間(t)考量郵件中心人員開啟郵件之時間，設定為 1 小時，肺部呼吸速率(p)則參考工作人員量測值，分為 4LPM, 6LPM, 10LPM 等。而室內空間則設定參考事件實場之真實數

據為 12.2 m³, 61 m³, 以及 310 m³ 三參數。美國 CDC 依此計算所得之暴露於該情景條件下每一萬人受感染之機率如下(Fennelly *et al.*, 2004)：

表三 炭疽郵件事件感染機率風險

Quanta	Small room 0.5 ACH		Moderate-size room 0.5 ACH			Moderate-size room 2 ACH			House 2 ACH
	PV 10 L/min	PV 10 L/min	PV 6 L/min	PV 4 L/min	PV 10 L/min	PV 6 L/min	PV 4 L/min	PV 4 L/min	
0.001	1.0	0.2	0.1	0.1	0.05	0.03	0.02	0.006	
0.01	9.8	2.0	1.2	0.8	0.5	0.3	0.2	0.1	
0.1	97.8	19.6	11.8	7.9	4.9	3.0	2.0	0.6	
1	936	195	117	78	49	30	20	6	
10	6,256	1,784	1,113	756	479	291	195	61	
100	10,000	8,599	6,928	5,443	3,881	2,555	1,784	596	
1,000	10,000	10,000	9,999	9,996	9,926	9,477	8,598	4,588	

*ACH, air changes per hour; PV, pulmonary ventilation.

其中由於炭疽郵件攻擊事件時所使用之戰劑劑量已難以回溯，而實際發動攻擊時之劑量亦無資料可供推定，故劑量參數(q)設定由 0.001-1,000 以為上下可能劑量之推定參考。而本研究所使用之同樣模式推估時，除實際量測受測空間之空氣交換效率以及空間尺寸外，人員肺部呼吸速率(p)則分由針對機場之旅客以及機場與辦公機關均有之辦公人員呼吸速率重新設定。而暴露時間(t)亦重新設定計算風險。

2-5-3 計算流體力學(Computational Fluid Dynamics)氣流電腦模擬

環境中之氣膠微粒乃隨空氣中氣流移動擴散至整體空間。空氣中微生物活性培養之採樣監測，雖可提供大致之微生物數目及種類趨向，然其囿於瞬時採樣，未能針對戰劑施放時之微生物移動走向提供一完整資訊，如此則限制人員暴露評估以及隔離消毒等措施。本研究

針對此一問題，試行採用計算流體力學(Computational Fluid Dynamics, CFD)以電腦程式模擬公共空間之氣流走向。CFD 針對流體運動本身之三維性、時變性以及非線性等特質，以有限元素差分法與物理紊流模型計算流體移動方向。而應用於室內環境則為量測取得空調出風口之風速及溫度等參數後，輸入以空間尺寸及家具為基礎之模型，即可將空氣走向可視化，俾瞭解整體空間氣流之走向。

2.6 快速多重致病原篩檢技術 Multi-plex PCR

本預警系統針對生物戰劑所可能使用之致病原，為搶得散佈初期之探知防備先機。設計研發一利用 PCR 為原理之快速多重致病原篩檢技術。並於採樣監測實測中配合本單位研發之 ESP 靜電集塵式採樣器以及串連式濾紙採樣樣本於現場環境中進行測試。而此一篩檢技術以致病原之遺傳物質為目標設計引子，於同一反應中快速針對專一性之致病原進行偵測。目前此一技術已有其他學者之研究開發成果 (Tomioaka *et al.*, 2005)，然則其為應用於血液臨床樣本之檢測，其對於環境採樣之低濃度、高複雜性、多干擾物之樣本則尚未有所應用。

而本技術之目標既為致病原之專一性遺傳物質，應以真正之致病菌作為測試材料。然而受限於實驗室安全等級，故本年度先以同屬不同種，較低致病力之替代菌株作為測試材料。而替代菌株之選擇，其除了須能同時為專一於致病原之 PCR 引子所偵測以外，同時亦不能

常見於一般環境之中，以免造成偽陽性反應，誤判警報空穴來風。如前述所言，本年度之監測目標為炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*)以及鼠疫桿菌(*Yersinia pestis*)等。故選取之替代菌株為仙人掌桿菌 *Bacillus cereus*，以及葉爾辛氏腸炎桿菌 *Yersinia enterocolitica* 進行實驗。*Y. enterocolitica* 購買自食品工業研究所(編號 ATCC 23715)。而 *B.cereus* 亦購買自食品工業研究所(編號 ATCC 11778)。兩者均依照說明書進行活化與保存。使用之前則轉殖至 TSB medium，以 30℃ 培養 24 小時。

2-6-1 DNA 萃取與專一性引子設計

本研究對於活體菌株，採用市售之 Viogene Blood and Tissue Genomic DNA Extraction Miniprep System 萃取其 genomic DNA。其步驟如下

1. 將菌液 1 ml 由試管中抽至 Eppendorff-tube，然後以 7,500 rpm 離心 10 分鐘
2. 除去上清液，加入 buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0; 2 mM EDTA) 並震盪 20 秒，然後以 7,500 rpm 離心 10 分鐘，再除去上清液
3. 加入 200 μ l lysozyme reaction solution 在 37℃ 下 30 分鐘
4. 加入 20 μ l Proteinase K 以及 200 μ l EX Buffer 震盪 20 秒
5. 將樣本放置 60℃ 之培養箱 30 分鐘，每隔 5 分鐘必須搖晃一次
6. 再將樣本放置 70℃ 之培養箱 30 分鐘以終止反應
7. 預熱 70℃ 的 500 μ l TE buffer 或 MQ water
8. 將樣本中加入 210 μ l 的 98% 試藥級酒精，並且震盪 20 秒

9. 將 B/T Genomic DNA Mini Column 放入 Collection Tube 中，使用 pipette 吸
10. 取所有在 tube 中的混合液放入 B/T Genomic DNA Mini Colum 中，(切勿碰到
11. Column 的管壁)，以 8,000 rpm 離心 2 分鐘
12. 將 B/T Genomic DNA Mini Column 放入新的 Collection Tube 中
13. 以 WS buffer 沖洗 Column 再以 8,000 rpm 離心 2 分鐘，之後吸出 Collection
14. Tube 中的濾液，再將 Column 放回 Collection Tube
15. 重複步驟 11
16. 以最高速度離心 Column 2 分鐘 (將試藥級酒精的殘餘去除)
17. 再將 Column 放入新的 Collection Tube 中，以 200 μ l 已預熱 70 的 TE
18. buffer (步驟 7) 沖洗 Column (不可沖洗到管壁)
19. 靜置 Column 1-5 分鐘，並且離心 1-2 分鐘
20. 將所萃取的 DNA 放入 4 (經常使用) 或 -20 (長期儲存)

而採樣所得之 filter 及捕集液樣本樣本，亦採用同樣方式處理。

捕集液樣本為免累積採樣時間採段之微粒濃度不足，於 DNA 萃取過程中損失，故採取濃縮處理。將離心管以 1,4000 rpm 離心 10 分鐘，將管內所有微粒離心至底部，倒去上清液後，加入 1mL 無菌水，以 vortex 震盪，重新懸浮後進行 DNA 萃取。

為免因為實驗操作污染，所有之樣本處理操作均於無菌操作台中進行。

本研究以炭疽桿菌及鼠疫桿菌為目標，又以替代菌株為試驗材料，故引子設計上須能夠同時偵測兩者。故參考過去針對兩者間之研

究文獻，尋找可供使用之引子序列。(Priest *et al.*, 2004)。針對仙人掌桿菌所採取之引子序列為:

Glpf-1:5'-GCG TTT GTG CTG GTG TAA GT-3'

Glpf-2:5'-CTG CAA TCG GAA GGA AGA AG-3'

而針對葉爾辛氏腸道桿菌所採取之引子序列為:

YRF:5'-GTT CTT TGG TTC CAG CCA GT-3'

YRB:5'-TCG CCT TTG CTA CGA CAA GT-3'

此外，為確保致病原偵測陰性反應樣本並非肇因 PCR 反應失敗，故各此一試驗另外加入一組針對一般環境菌均能偵測之 Universal Primer。(Rothman *et al.*, 2002)

PEU7: 5' -GCA AAC ACG ATT AGA TAC C-3

PEU8 :5' -CGT CAT CCC CAC CTT CCT CC-3'

其在文獻中已確定可針對 *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella pertussis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Micrococcus caseolyticus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, and *S. pneumoniae* 等細菌能夠成功增幅 DNA。

而針對不同序列之引子，PCR 反應之方程式設定亦有差異，如下表四所示。

表四 PCR program

PCR program			
	<i>B.cereus</i> specific	<i>Y. enterocolitica</i> specific	Universal primer
	Glpf-1, Glpf-2	YRF, YRB	PEU7, PEU8
Denaturing	94 ,1min	94 ,1min	94 ,1min
Annealing	65 ,1min	60 ,1min	55 ,1min
Extension	72 , 35cycles	70 , 35cycles	72 , 25cycles

由上述 PCR 程式可以發現，三組 primer 之程式均有些許不同。而本研究希冀藉由嘗試多次測試，找出三者均可通用程式設定，以便迅速進行反應。

2-6-2 PCR 偵測極限測試

引子設計完成後，即是 PCR 反應之實際測試。此處之目的在於面對環境微生物濃度之變異波動，需瞭解本偵測技術之最低偵測極限為何。本項目所使用之實驗方法，乃是將培養所得之活菌菌液，經以細胞計數器計數定量後，再以連續稀釋法減少菌量數，再經 DNA 萃取與 PCR 反應，方以洋菜膠電泳進行分析。

三、結果與討論

本針對預警系統建置研究，以上述之採樣設置規劃原則與各類監測技術，於國內一大型辦公建築與國際航空站與國內航空站等三處地點試行監測實測，以瞭解是否此套系統之可行性評估。以下以監測項目為類別，探討所得數據對於生物戰劑攻擊之代表意義。而受限於現場環境主管機關對於本單位監測作業之配合程度與許可發給，三試行監測位址之採樣項目與評估立論則略有調整及修改，列於前三節。而三監測位址之非活性微生物微粒收集之結果部分，則於第四節討論

3.1 辦公建築空間結果

3-1-1 目標建築資料概述

本研究所針對之辦公空間位於北部，共有 25 層（地上二十二層、地下三層），所採用之空調系統為 AHU 全氣式空調系統，並用 FCU（風圈個機）設備。其樓層之劃分除了一樓大廳與開放式接待中心外，其餘樓層均規劃為獨立隔間之辦公空間、會議空間與電腦中心。而主要之辦公部門坐落於 17 樓至 22 樓，總員工數約 386 人。依據材料方法中之採樣點數目推定公式，選取 17-22 樓進行監測。17-21 樓設置六採樣點（編號 17-21,A-F）。22 樓則設置有五採樣點(編號

22A-22E)。而 17-22 樓之主要外氣供應處，為 19 樓之 AHU 風機外氣入口，以及頂樓之外氣入口，此處亦列入採樣點。

3-1-2 辦公空間-溫濕度.二氧化碳監測結果

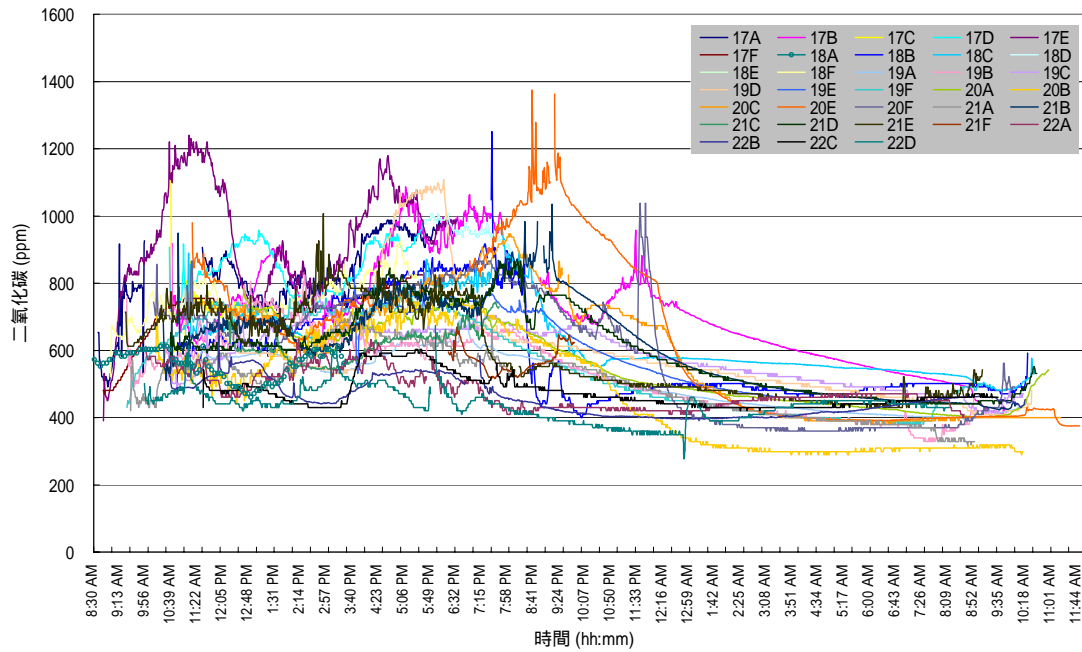
實測數據之溫度濕度如下表五所示：

表五 各辦公空間室內八小時平均溫濕度變化

樓層 \ 採樣點		採樣點					
		A	B	C	D	E	F
溫度(Temp.)	17 樓	27.5	26.2	26.4	25.1	26.4	30.1
	18 樓	26.4	27.0	22.8	27.0	26.2	26.7
	19 樓	22.8	27.6	27.1	25.1	25.1	24.0
	20 樓	-	25.9	26.3	-	24.6	26.1
	21 樓	25.8	26.5	-	26.2	27.0	-
	22 樓	25.6	24.0	25.0	30.2	24.6	
相對溼度 (RH)	17 樓	53.7	53.8	46.8	54.5	52.8	39.6
	18 樓	50.4	46.0	-	42.6	45.0	43.0
	19 樓	-	48.6	47.2	44.3	55.0	53.1
	20 樓	-	48.4	44.5	-	50.3	41.8
	21 樓	56.8	58.3	-	48.3	46.3	-
	22 樓	55.6	-	49.7	43.9	-	

由上述數據得以顯示，此一辦公空間之溫濕度約介於 25-30 之間，而濕度則於 45% 至 55% 之間。此一分佈為一般微生物適宜擴散、生長、繁殖之條件狀況。

而該辦公室之二氧化碳監測狀態如下圖六所示



圖六 各辦公室及室外之二氧化碳濃度分佈圖

整體而言之八小時平均 CO₂ 濃度均值 1000 ppm 基準之內。就逐時之二氧化碳濃度而言，在特定時段如上下班時間，可能因為人員走動較為頻繁，有高於 1000 ppm 之高峰值存在，若人員數較多的辦公空間，CO₂ 濃度也有偏高的情形，此一數據則顯示，辦公空間內之人潮流動之高密度空間，為不可忽略之採樣點。

3-1-3 辦公空間-活性微生物捕集培養

環境中之微生物存在廣泛，且可能由於其生物特性分別滋生於適合自身之環境當中。而以生物戰劑角度而論，其施放進入室內以後，除可能隨空調系統移動逸散以外，可能由於較諸於大型流通公共空間複雜之室內隔間型態，造成氣流型態較為複雜，故導致微生物於室內隔間與結構曲折處可能形成停留、渦流、死域之地區集聚，形成局部

區域濃度較高之情況。此外，既有老舊之建築物大多屬於密閉式中央空調系統，一旦本身系統設計不良、使用狀況不當或在管理出現疏失，則易透過空調系統本身之氣體輸送，形成造成微生物滋長及污染之溫床。尤其是針對進氣口位置、空氣濾網、空調系統冰水管線結露、集水盤積水、冷卻水塔清潔與消毒的程序以及風管清潔程度等因子，均可能形成微生物著落後繁殖躲藏，伺機而動之隱蔽處，於預警監測而言不可不慎。

尤其針對病發常需時數天之生物細菌戰劑，局部區域濃度變異之情形，更可能形成採樣監測上設點之盲點或偏誤。本研究有鑑於此，故採用活性微生物捕集方式採樣。藉由調查室內外濃度空氣中一般環境微生物之分佈狀況(I/O ratio)，以釐清室內各區域何處可能為生物氣膠滋生源所在。此等已是環境微生物滋生之污染源所在處，可能即為生物戰劑得以繁衍滋生，升高濃度之處。另外，因微生物受到室外、溫溼度、人為活動以及機械空調設備等影響甚大，即便於同一日進行量測，其間相異時段之微生物濃度亦隨之變動。故各空間之環境微生物量測，皆是透過每天的早上、中午、下午三次並連續三天量測平均求得。

該辦公空間之微生物量測結果如下表六所示：

表六 辦公空間-微生物濃度 (CFU/m³)

區域		17 樓						18 樓						外氣	
		17A	17B	17C	17D	17E	17F	18A	18B	18C	18D	18E	18F	19 樓機房	頂樓機房
菌種濃度	總平均濃度	1554	634	526	584	1534	1014	785	929	1685	2524	3289	2077	-	498
	中	883	373	393	376	764	541	1077	1043	1815	1417	1688	1584	1397	552
	午	688	797	697	257	1220	630	1496	1830	667	1962	1501	1925	2866	799
	總平均濃度	1042	601	540	405	1224	728	1120	1267	1389	1898	2092	1835	2132	616
	I/O ratio	0.76	0.44	0.39	0.30	0.89	0.53	0.81	0.92	1.01	1.38	1.52	1.34		

區域		19 樓						20 樓						外氣	
		19A	19B	19C	19D	19E	19F	20A	20B	20C	20D	20E	20F	19 樓機房	頂樓機房
菌種濃度	早	403	499	429	2449	1327	1030	584	821	930	1479	871	820	.	498
	中	469	1159	574	770	2383	1384	293	850	468	1327	997	936	1397	552
	午	422	800	420	636	1030	805	436	547	442	1034	623	1248	2866	799
	總平均濃度	431	819	475	953	1580	1073	461	691	613	1280	831	1001	2132	616
	I/O ratio	0.31	0.60	0.35	0.69	1.15	0.78	0.34	0.50	0.45	0.93	0.60	0.73		

菌種濃度	區域	21 樓						22 樓					外氣	
		21A	21B	21C	21D	21E	21F	22A	22B	22C	22D	22E	19 樓機房	頂樓機房
早		568	752	156	1701	536	195	575	497	112	446	578	.	498
中		640	369	307	737	1324	175	405	93	109	477	612	1397	552
午		436	725	239	939	776	369	800	206	123	704	566	2866	799
總平均濃度		548	615	234	1126	879	246	593	265	115	542	585	2132	616
I/O ratio		0.40	0.45	0.17	0.82	0.64	0.18	0.43	0.19	0.08	0.39	0.43		

整體而言，室內外細菌的問題較為嚴重，17 樓的 AE、18 樓的 ABCDEF、19 樓 EF、20 樓 DF、21 樓 D，以上空間皆超過美國 ACGIH 香港及我國環保署於室內空氣品質所建議之 1000 CFU/m³ 濃度標準值。而由以往相關研究調查顯示，空氣中高濃度的細菌濃度一般與潮濕、積水、寵物及人員密度有關，進行生物性樣本收集數日均屬於陰雨氣候，因此室外細菌濃度偏高，實屬正常。而進一步將於室內所測得之每天濃度與該次採樣於室外所監測得之濃度相除，以計算室內/室外微生物菌屬濃度比值 (I/O ratio)，以釐清室內本身是否存在可疑的滋生源，結果大多數的空間小於 1，表示室內細菌的濃度來自於室外濃度貢獻的可能性大，然而亦有某些特殊檢測點如 18 樓 CDEF、19 樓 E，其 I/O ratio 大於 1，表示可能有室內之細菌污染源存在之，導致室內濃度高於外氣之狀況。尤以 19 樓在 AHU 空調機房中發現有積水問題，恐成為生物戰劑擴散整層樓之汙染源；而 18 樓六個檢測點中有四個細菌濃度過高，可能也與整層樓的空調系統及管線清潔有關，上述數個濃度較高處均為預警系統架設監測點所需特別考量處，亦為建築物之防範攻擊之重點。

3-1-4 辦公空間-通風換氣效率與感染風險推估

而辦公空間中各樓面之通風換氣效率測量結果如下表七所示：

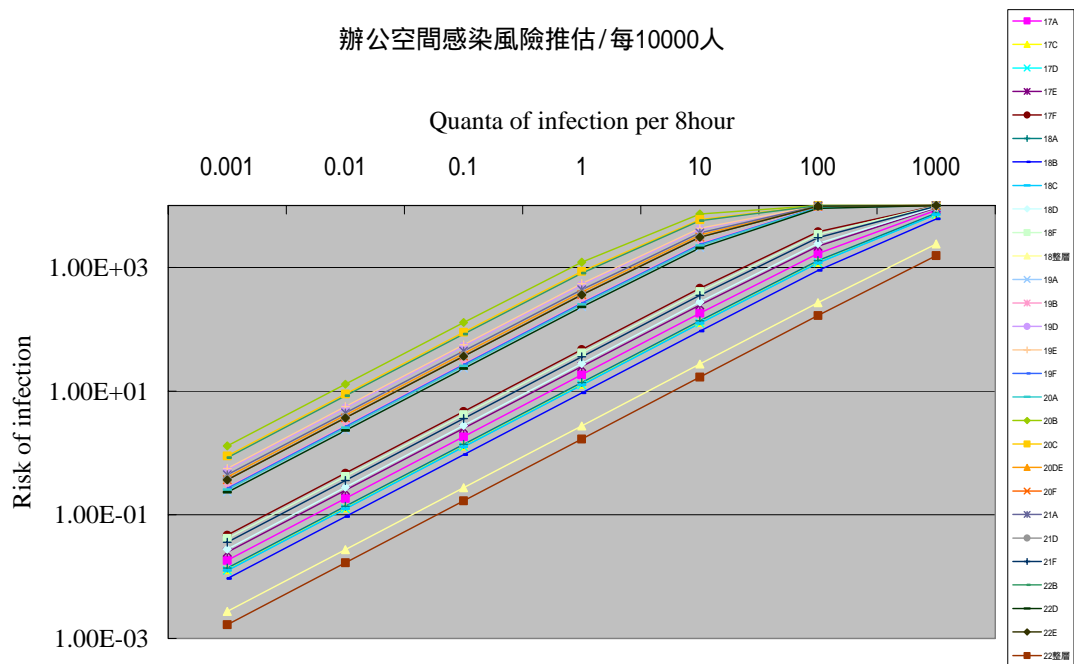
表七 各辦公空間之通風量測結果

地點	空間使用人數	量測日期	樓地板面積 (m ²)	通風換氣效率 (1/hour)	樓地板面積每平方公尺通風量 (m ³ /hr)
17A	10	4/9	108.6	1.61	3.75
17C	16	4/9	141.2	1.75	4.07
17D	11	4/15	108.1	2.35	5.40
17E	6	4/3	51.0	2.52	5.89
17F	5	4/10	24.9	2.74	6.45
18A	5	4/8	87.8	2.65	6.24
18B	26	4/6	199.3	1.72	4.03
18C	22	4/7	182.8	1.40	3.26
18D	3	4/15	45.7	2.51	5.76
18F	4	4/11	38.0	2.03	4.71
18 樓整層	71	4/12	1316.2	0.89	2.04
19A	2	4/11	82.6	2.44	5.61
19B	3	4/6	82.9	2.21	5.17
19D	不定	4/8	165.1	1.69	3.59
19E	5	4/7	52.2	1.56	3.66
19F	5	4/8	55.6	2.27	5.27
20A	6	4/3	53.5	2.32	5.42
20B	20	4/11	168.2	1.03	2.40
20C	26	4/10	205.0	1.24	2.88
20DE	36	4/15	384.0	1.85	4.26
20F	27	4/7	206.0	1.93	4.50
21A	14	4/9	154.0	1.75	4.11
21D	23	4/15	150.0	1.91	4.50
21F	不定	4/9	22.0	6.16	14.47
22B	6	4/16	114.6	1.28	2.99
22D	5	4/7	51.6	2.45	5.66
22E	-	4/16	106.5	1.94	4.50
22 樓整層	22	4/14	1316.2	1.45	3.34

此外，因 AHU 空調系統下各辦公空間的設計實為相通(天花板)，若使用釋放示蹤式氣體來量測，容易造成換氣效率高估。同時生物戰劑亦可能從此一管道逸散至全體建築中，因此本研究單位就整層樓面

之通風換氣效率進行探討，直接透過該樓層 AHU 風機釋放 SF₆ 示蹤式氣體直到整層樓的濃度達標準再自然衰減，然而考量 SF₆ 為高成本且屬列管之溫室氣體，僅隨機挑選了 18 及 22 樓作為代表性樓層進行量測。

暴露於受生物戰劑攻擊之辦公空間下，每一萬人人員遭受感染之風險機率，乃依照式(2)進行計算評估。而其中參數設定值考量辦公空間人員工作約為八小時，暴露時間(t) = 8hr。肺部呼吸速率(p)則依東方人之工作之最低呼吸速率為 2LPM 進行計算。其結果如下圖七所示：X 軸為 8 小時累積之 $q = 0.01 \sim 1000$ 倍之劑量，Y 軸感染風險之對數值。



圖七 辦公空間 8 小時感染風險推估

此一模式推估，可發現當 $q = 1$, 即為使用 1,750-8.625 個 $<5 \mu m$ 粒徑孢子為戰劑劑量攻擊時，針對通風換氣量較小之區域如辦公室 20B(通

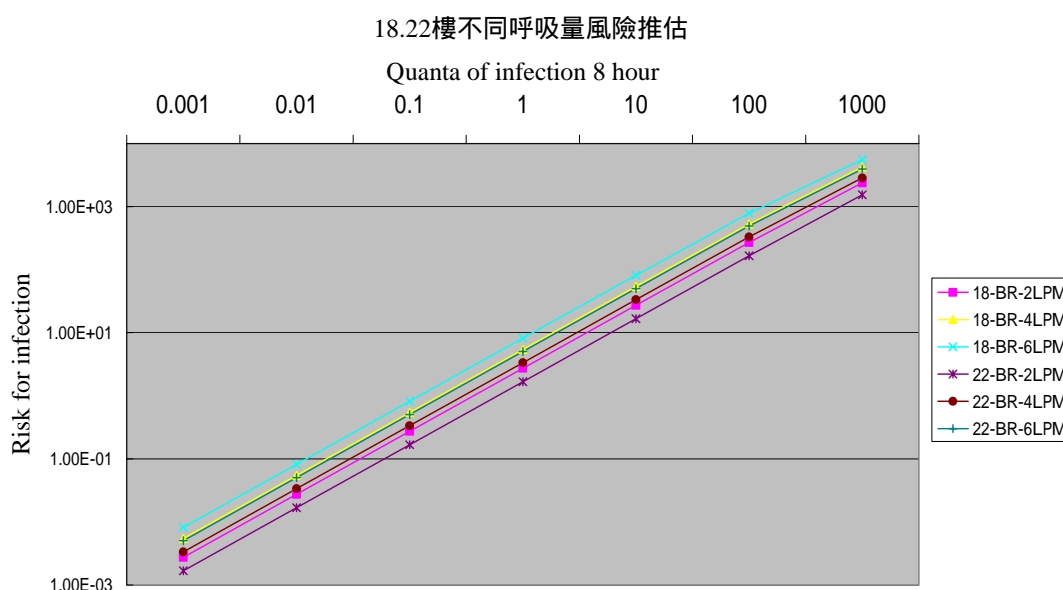
風換氣效率為 2.40)，其遭受感染之機率約為 0.12%。而若攻擊劑量增加至 $q=100$ 時，則感染機率幾乎為 100%。其他通風換氣效率較佳之辦公區域，雖然趨勢略有好轉，然而當劑量升高至 $q=100$ 時，感染率依然近 100%。此一數據可作為預警系統後續評估傷亡、開展醫療措施以及損害管制之參考。

而全層之 18，22 樓之通風換氣量測，於此一評估模式則代表於固定通風換氣效率條件以及攻擊劑量下，增加樓地板面積，確實能分散人員受感染之風險。其評估結果之數值如下表八所示。

表八 辦公空間不同呼吸率及換氣量之風險推估/8 小時暴露/每萬人風險

辦公空間 18 樓.22 樓(原始 ACH)						
Quanta	18 樓 -2LPM	18 樓 -4LPM	18 樓 -6LPM	22 樓 -2LPM	22 樓 -4LPM	22 樓 -6LPM
0.001	2.73E-03	5.46E-03	8.20E-03	1.68E-03	3.35E-03	5.03E-03
0.01	2.73E-02	5.46E-02	8.20E-02	1.68E-02	3.35E-02	5.03E-02
0.1	2.73E-01	5.46E-01	8.19E-01	1.68E-01	3.35E-01	5.03E-01
1	2.73E+00	5.46E+00	8.19E+00	1.68E+00	3.35E+00	5.03E+00
10	2.73E+01	5.45E+01	8.16E+01	1.68E+01	3.35E+01	5.02E+01
100	2.69E+02	5.32E+02	7.87E+02	1.66E+02	3.30E+02	4.91E+02
1000	2.39E+03	4.21E+03	5.59E+03	1.54E+03	2.85E+03	3.95E+03
辦公空間 18 樓.22 樓(4ACH)						
Quanta	18 樓 -2LPM	18 樓 -4LPM	18 樓 -6LPM	22 樓 -2LPM	22 樓 -4LPM	22 樓 -6LPM
0.001	6.08E-04	1.22E-03	1.82E-03	6.08E-04	1.22E-03	1.82E-03
0.01	6.08E-03	1.22E-02	1.82E-02	6.08E-03	1.22E-02	1.82E-02
0.1	6.08E-02	1.22E-01	1.82E-01	6.08E-02	1.22E-01	1.82E-01
1	6.08E-01	1.22E+00	1.82E+00	6.08E-01	1.22E+00	1.82E+00
10	6.08E+00	1.21E+01	1.82E+01	6.08E+00	1.22E+01	1.82E+01
100	6.06E+01	1.21E+02	1.81E+02	6.06E+01	1.21E+02	1.81E+02
1000	5.90E+02	1.14E+03	1.67E+03	5.90E+02	1.14E+03	1.67E+03

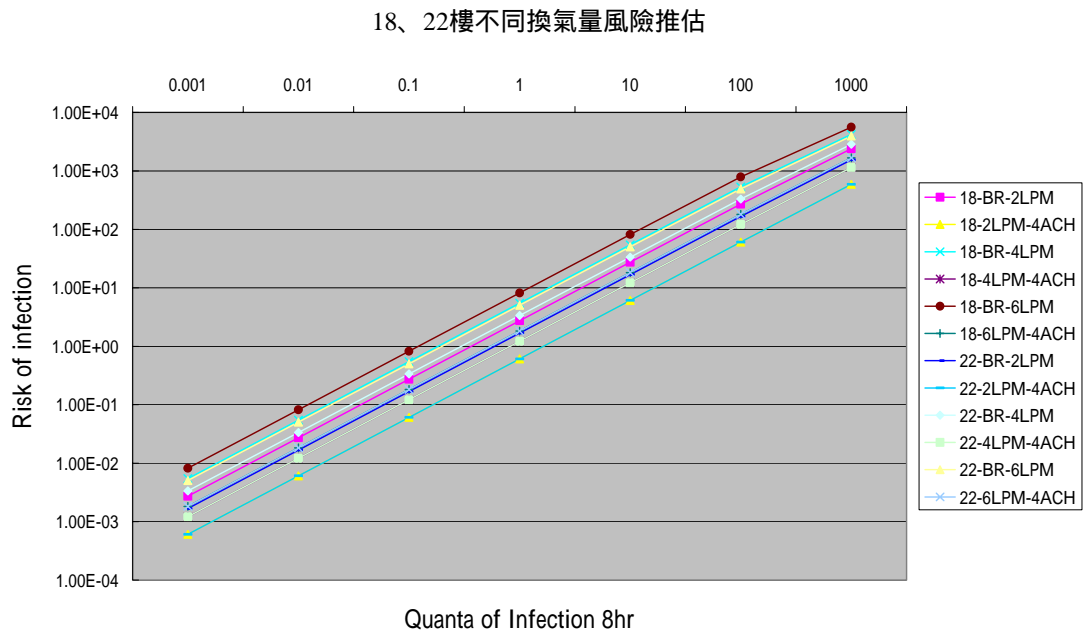
此外，由圖八數值趨勢可以發現，對於樓地板面積狹小，且通風換氣效率較少之空間，人員遭受感染之風險亦隨之增大，此點與美國炭疽事件之觀察一致。而其觀察亦指出，人員針對遭受生物戰劑感染之風險，提升室內通風換氣之稀釋效應影響感染風險之程度較人員個體之呼吸效率為高(Fennelly et al., 2004)。而針對此一理論，本研究挑選出進行整層樓面通風換氣量測之 18 樓(通風換氣效率 0.89 ACH)及 22 樓面(通風換氣效率 1.45 ACH)，改變肺部呼吸速率(p)至 4 及 6LPM 重新進行推估。對於高呼吸量者，遭受感染風險增加，實屬自然現象。



圖八 辦公空間人員不同呼吸量風險推估

而若將整體之通風換氣效率提升至符合美國 ICBO (International Conference of Building Officials)所制訂的 Uniform Building Code (UBC)法規針對辦公室所規定之通風量 4 ACH，則重新推估風險如下圖九所

示：



圖九 不同換氣量風險推估

由上述數據雖然未能觀察得到同樣之結論，然而在未能改變人體肺部呼吸量之前提下，改變建築環境之通風換氣效率，亦為防制生物戰劑攻擊之可行對策。而對於本預警系統之偵測極限而言，以目前之辦公空間整體通風狀況配合前述之 $q = 1,750-8.625$ 個 $<5 \mu m$ 粒徑孢子回推，此一數值已高於一般進行 PCR 偵測之最低偵測極限。

3.2 國內航站監測結果

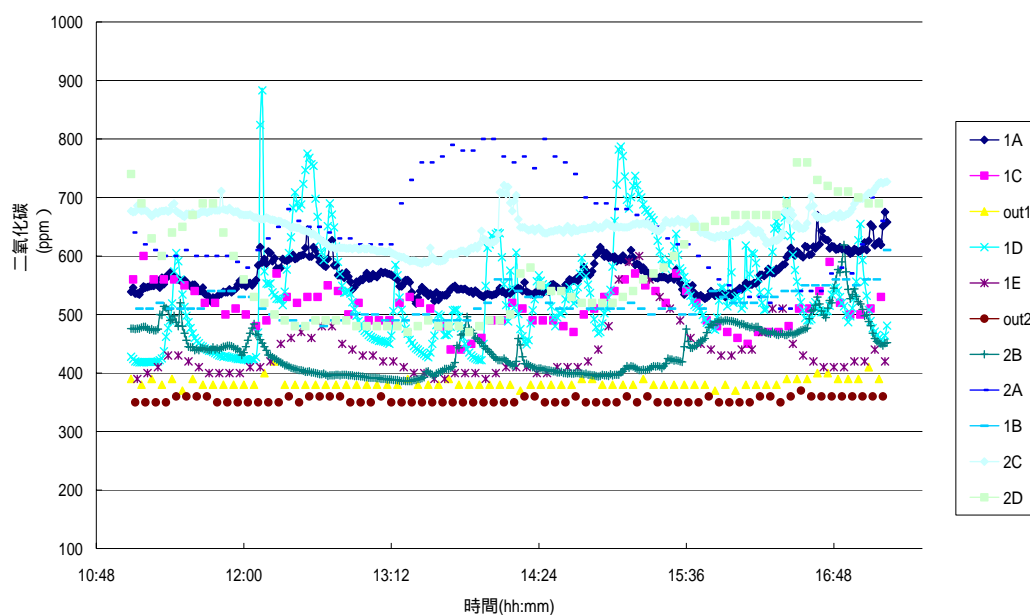
3-2-1 目標建築資料概述

此一目標國內航空站位於南部，屬於全平面結構。即主要公共空間之旅客離站出境大廳、內候機室、與入境到站口均位於一樓，總面積

約為 3,900 平方公尺。所採用之空調系統為 AHU 形式空調系統，且無外氣引入。公共空間之人員總數由於人潮移動之故，無法精準估計。由每小時維持兩班航機起降估計，進出人員約在 200-300 人/小時。而航空人員辦公室則為於 2 樓，其中包括辦公室以及儲藏室等區域。而二樓之空調系統除 AHU 主機以外，某些辦公及室內空間中分別加裝 FCU(風圈個機)及水冷式冰水機設備與冰水管線。同樣依照選點原則推定，一樓選取五採樣點(編號 1A-1E)，二樓選取四採樣點(編號 2A-2D)，其中包括人員最多之辦公室，以及監控室、主管辦公室等必須採樣區域。全體建築並同時選取外氣點二點(OUT-1、OUT-2)。

3-2-2 國內航站-溫濕度.二氧化碳監測結果

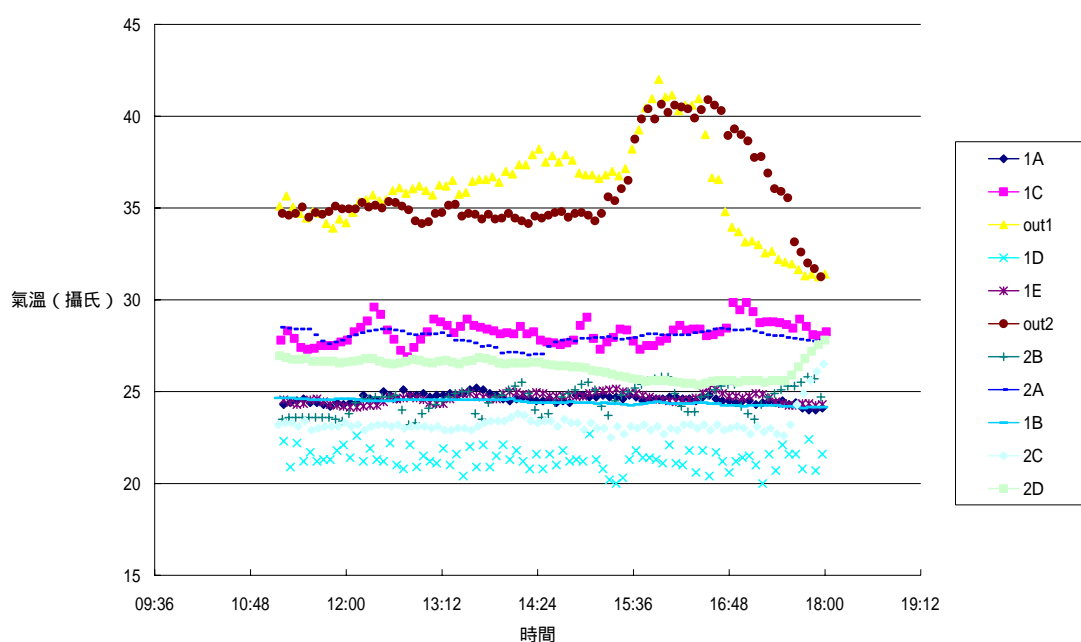
針對國內航站之二氧化碳監測數據，如下圖十所示：



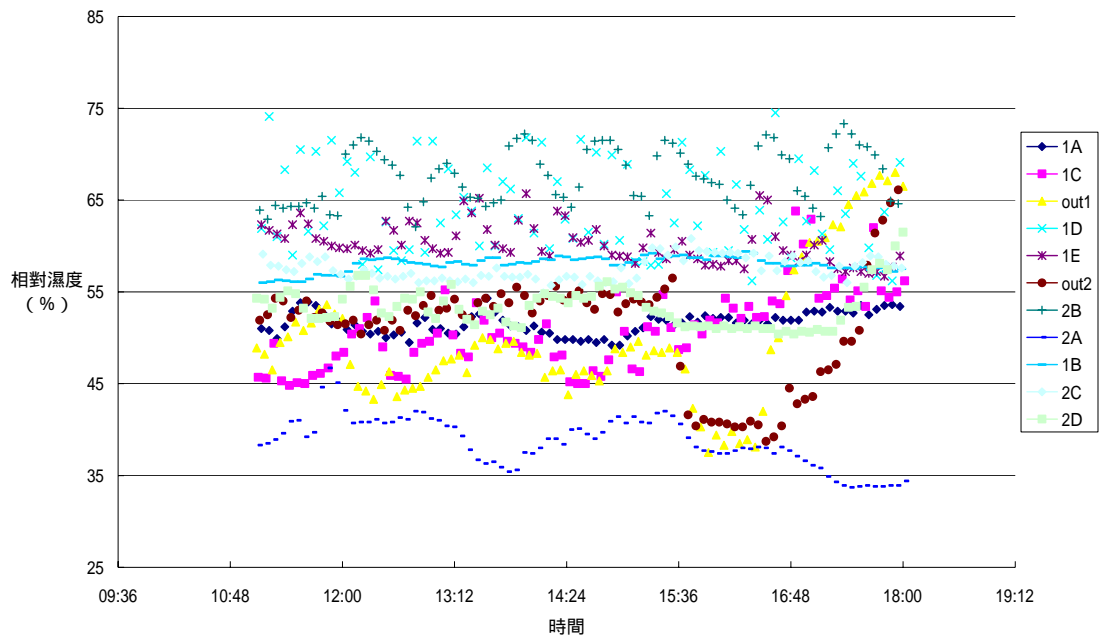
圖十 國內航站二氧化碳濃度分佈圖

此一監測數據顯示，旅客離站出境大廳(1A)以及內候機室(1E)，其濃度之上升趨勢以每小時增減 100ppm 為波動，兩者之數據趨勢類似。如此則顯示，航站之人潮移動乃隨班機起降而定，且位處同一平面，同一動線之出境大廳與內候機室應處於同一人員動線方向。旅客入境大廳(1C)，亦有同樣隨航班狀況波動之趨勢。而二樓辦公區域之狀況，二氧化碳濃度雖低於 1000ppm，但與辦公空間之狀況近似，亦有人員之高密度狀況空間。

國內航站之溫濕度實測結果如下圖十一、十二所示：



圖十一 國內航站溫度分佈圖



圖十二 國內航站濕度分佈圖

此一國內航站公共空間之室內溫濕度約介於 25-30 之間，而濕度則於 35%至 75%之間。此一分佈為一般微生物適宜擴散、生長、繁殖之條件狀況。而室外監測點出現氣溫高於 40 之狀況，可能受監測儀器受日光曝曬或是機場內車輛機械排氣噴流干擾所致。

3-2-3 國內航站-活性微生物捕集培養

國內航站使用 Burkard 單階生物氣膠採樣器進行空氣中活性微生物量測之結果如下表九所示。

表九 國內航站-微生物濃度 (CFU/m³)

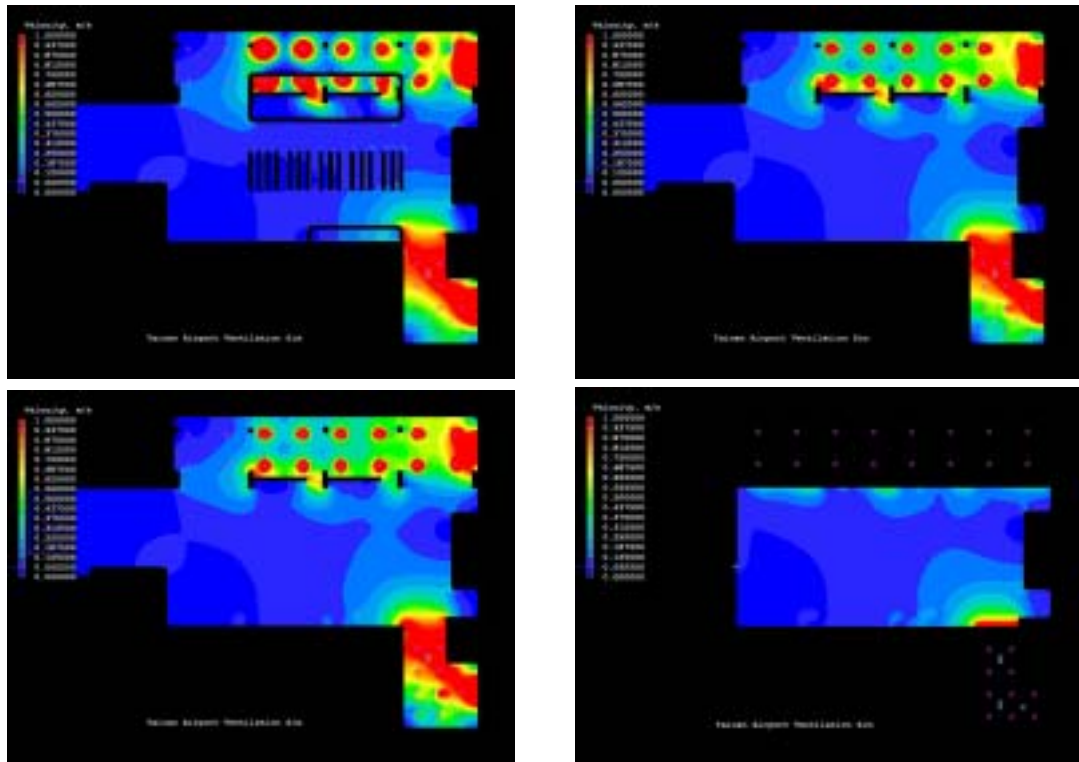
區域	1 樓					2 樓				外氣	
	1A	1B	1C	1D	1E	2A	2B	2C	2D	1 樓	2 樓
菌種濃度	366	238	422	127	277	227	277	350	216	255	308
活性細菌濃度											
中	477	44	605	322	216	238	188	311	161	244	155
午	388	88	488	433	116	388	194	144	211	316	141
總平均濃度	410	123	505	294	203	284	219	268	196	271	201
I/O ratio	1.5	0.45	1.86	1.08	0.74	1.41	1.08	1.33	0.97		

從數據而觀，航站一樓之旅客離站出境大廳(1A)及入境到站口(1C)區域之細菌濃度為最高，且 I/O ratio 均大於 1。顯示室內微生物污染源可能存在。然則該兩區域為機場人潮最多之區域，由於高密度人潮移動所夾帶之細菌進入此一區域影響大於室外流入室內數量實屬可預期之。故當生物戰劑隨人潮進入航站出境大廳內施放，或者隨到站班機抵達於到站出口處施放，此兩處將是首當其衝之點，故列為適當監測處。而 1D 處雖然 I/O ratio>1，且生物氣膠濃度亦高，然而其為吸煙室之獨立抽風空間，作為戰劑施放處之可能性不高。而中央監控室(2A)及航站大辦公室(2C)兩處之 I/O ratio>1。推測可能原因為中央監控室為密閉門鎖封閉空間，且無新鮮外氣稀釋之狀態下，微生物可能於其中產生繁殖狀況。而航站大辦公室則是人員密度較高，加上無外氣稀釋之通風狀況，均可能成為微生物濃度升高之緣由。故 2 樓此兩處應為監測必須之處。

3-2-3 國內航站-CFD 電腦程式氣流模擬

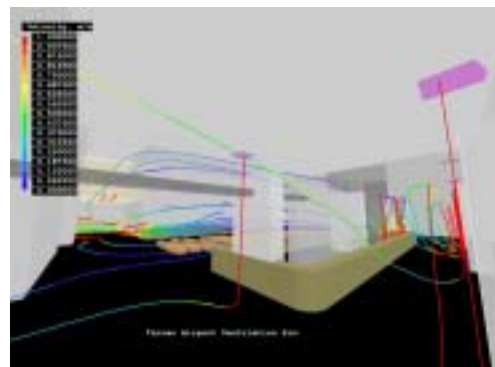
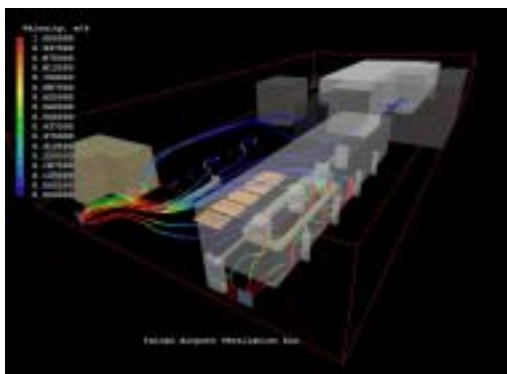
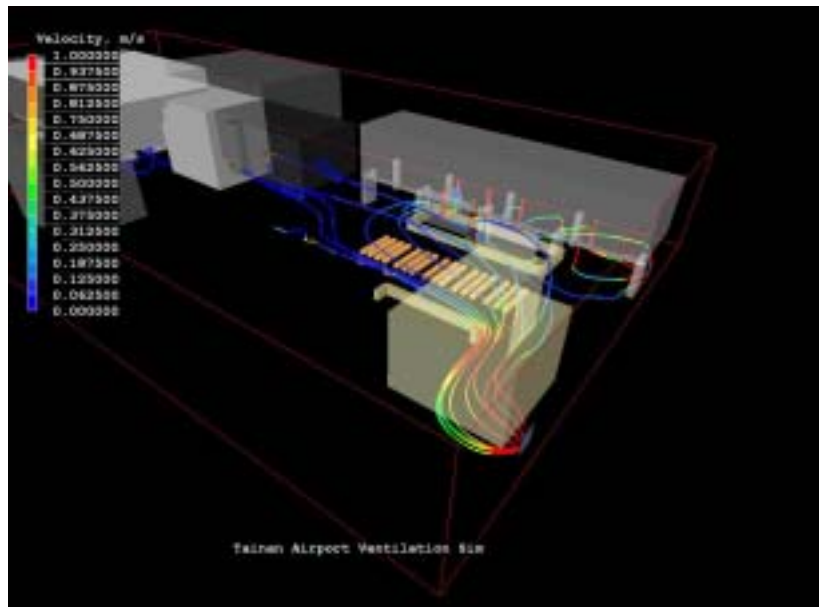
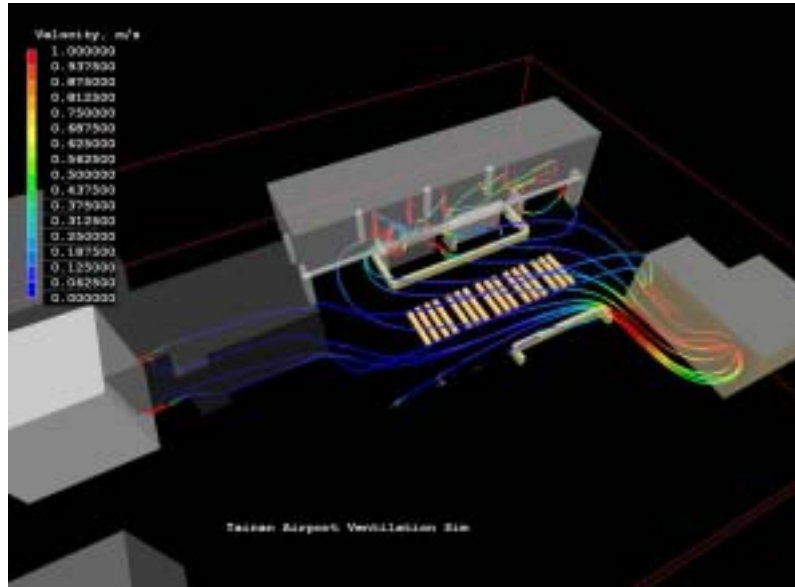
空氣中微生物活性捕集之量測雖可大致瞭解現場環境微生物之可能分佈狀況，然則對於整體環境氣流移動對於戰劑微生物施放擴散之效應實未能顯其全貌。故本研究團隊針對此一問題，利用近來於建築與通風實用之 CFD 電腦程式氣流模擬，針對此一國內航站試行計算，作為微生物擴散狀況與氣流流場間關係之佐證。

此一方法首先依據機場平面施工圖以及實場照片，將現場空間尺寸及櫃臺、座椅等設備尺寸、以及空調出風口尺寸等資訊輸入程式中建構空間模式。模式建構完成後，則於實場量測每一空調出風口之風速及溫度，得以瞭解其空氣移動之速度，以及由溫度差異引致之上升或沈降行為狀態。建築空間中之門窗，則依其尺寸平均分割為九格，各自量測後加以平均得一平均值以代表之。航站內各區域之 CFD 模擬結果如下各圖所示。線條代表由該空調出風口流出之氣流動線，而以顏色顯示其速度。紅色為最快(1.0m/s)，藍色為最慢(0.0m/s)。



圖十三 國內航站 CFD-1

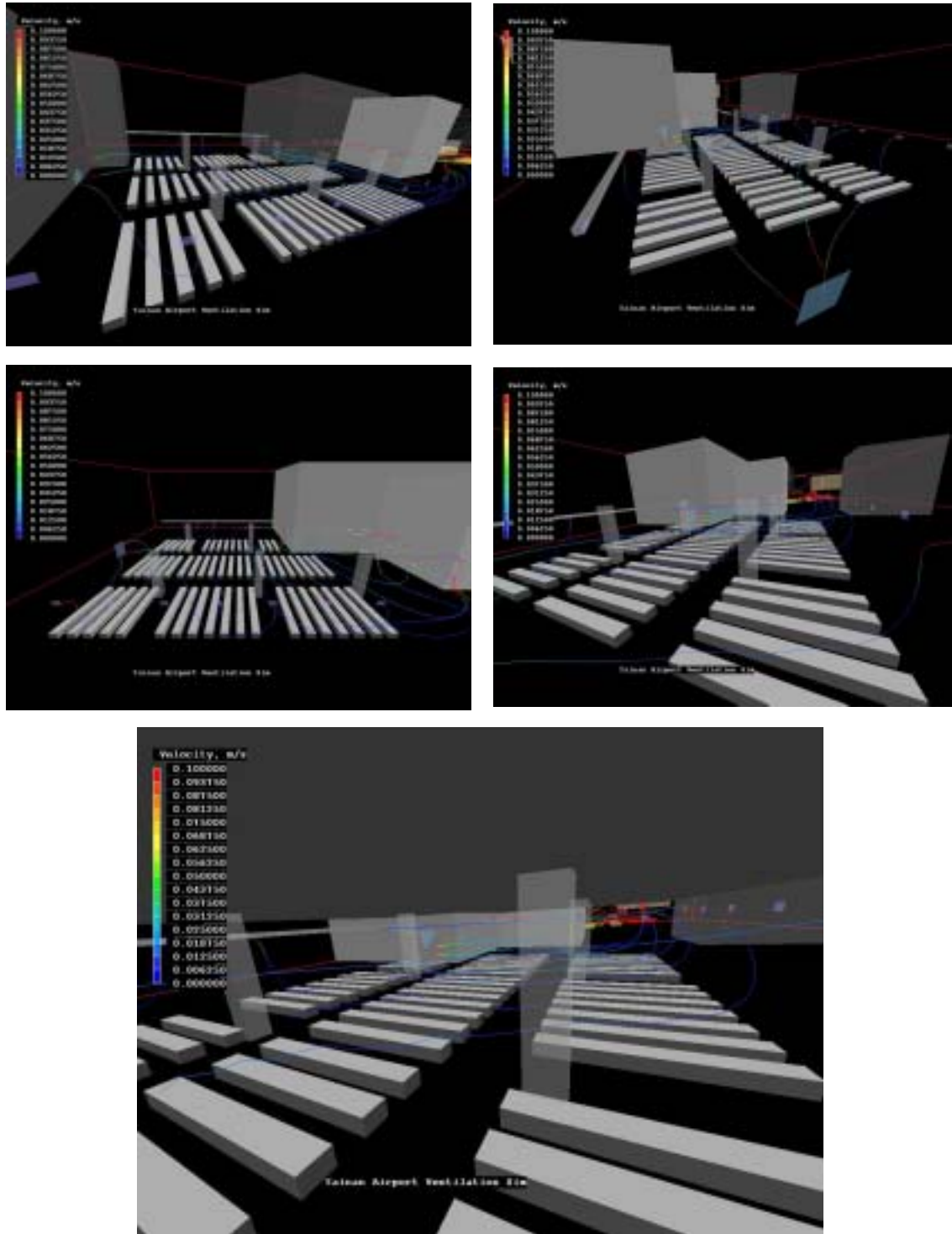
上圖十三為國內航站之旅客離站出境大廳(1A)之垂直氣流模擬。由上圖可以觀察瞭解，該區域之氣流由上而下往地面出風，並且朝向右下角方向擴散。該右下角方向為貨運站出口，有一向外之門戶。而位於該區域挑高之處為航警辦公室，若生物戰劑於大廳之處施放，應不至於污染航警辦公室。



圖十四 國內航站 CFD-2

上圖為旅客離站出境大廳(1A)之立體氣流程式模擬。圖十四中可觀

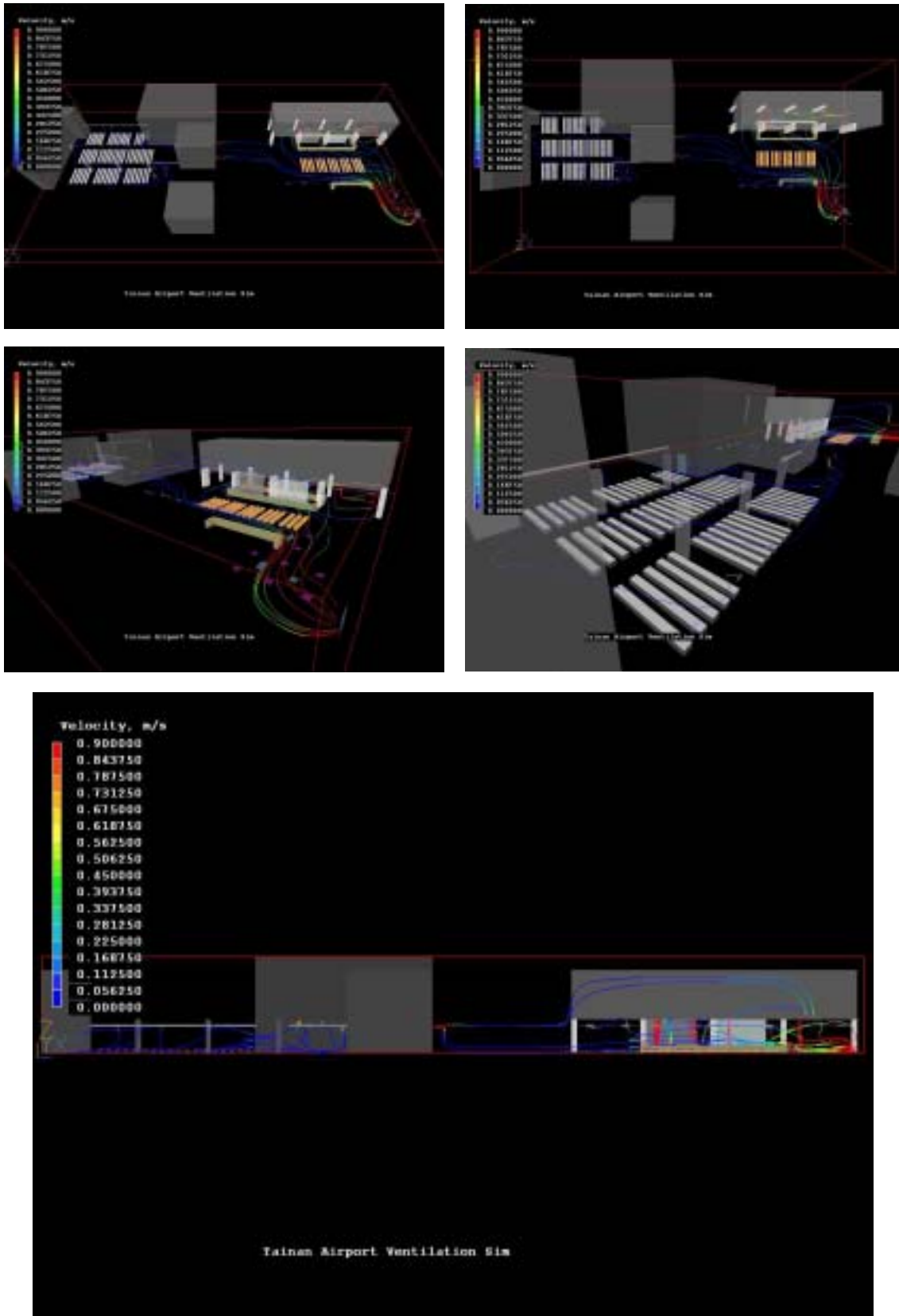
察瞭解，由於空調出口設置之關係，故大廳之氣流流入內候機室(1E)之機率較低，而停留於大廳。此一數據亦可解釋屬於同一人員動線之1A及1E生物氣膠濃度卻有所差異，而形成 $1A > 1E$ 之趨勢。



圖十五 國內航站 CFD-3

上圖十五為內候機室(1E)之模擬結果。數據結果顯示由於候機室通往停機坪之開口門影響，於候機室內形成氣流緩慢之狀況。但此一結果與監測結果之 $I/O < 1$ 之理論不盡相合，可能另有環境因素諸如人員停留時間等因素影響，須詳細調查方能闡明。

圖十六為觀察出境大廳及候機室之整體狀況模擬。由結果可以瞭解，大廳處之氣流可能先行揚升後再沈降至末端。而內候機室處則是直接沈降至低處。此一數據將可配合生物戰劑粒徑，試就其受重力沈降及氣流推送作用之微生物擴散評估所參考。一般而言，微粒於空氣中之移動行為是否能以氣體代表，視乎微粒粒徑與康寧漢滑溜係數 (Cunningham slip correction factor) 決定。而針對可能成為戰劑媒介之病毒，明年度將依此作為考量進行評估。



圖十六 國內航站 CFD-4



圖十七 國內航站 CFD-5

上圖十七為整體航站之氣流流場全立體程式模擬。大體而言，本研究依據採樣規劃原則規劃所得之採樣點所得之微生物監測結果，均與流場理論及模擬結果相合，唯內候機室處之狀況尚須詳細調查瞭解其原因。整體而言，此一計算流體力學之程式氣流模擬實為未來考量預警系統監測採樣位址及區段規劃之良好工具。

3.3 國際航站結果

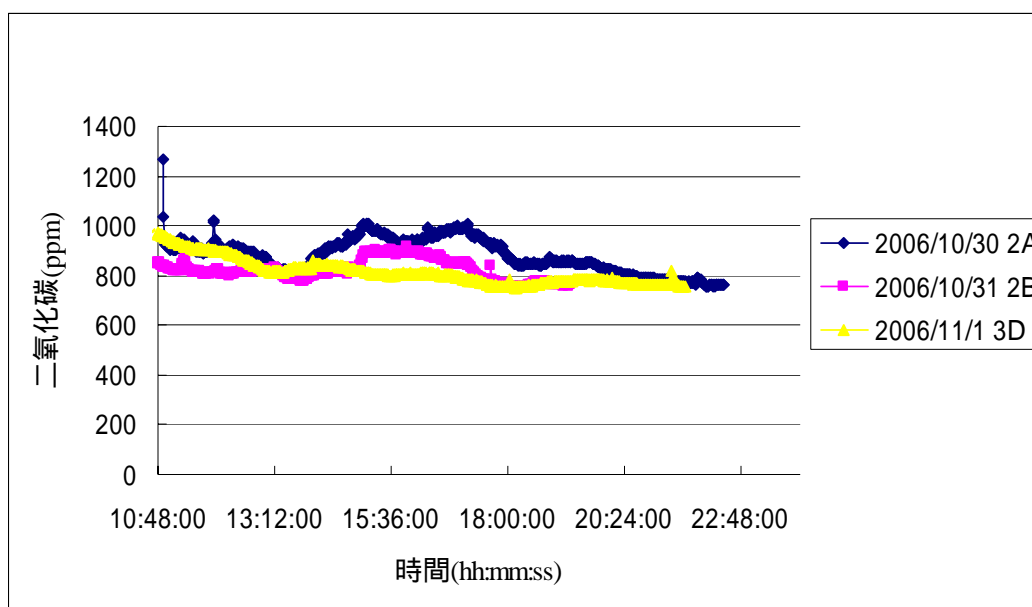
3-3-1 目標建築資料概述

國際航站同位於南部，分為三層，結構較為複雜且管制區域眾多。

旅客出境大廳位於三樓總面積為 4,100 平方公尺，推估得八採樣點(編號 3A-3G,外氣點一點 OUT-3)。入境大廳位於一樓，面積約為 2,700 平方公尺，推估得六採樣點(編號 1A-1E 外氣點一點 OUT-1)。國際航空站之空調系統為 AHU 形式，然而因考量節能因素，故並未開啟外氣，而以全內氣循環進行換氣。一樓及三樓唯一之外氣引入口，則為旅客進出之自動門，故外氣點即設置於此。而人員辦公室位於 2 樓，選取人員最多之兩辦公室(編號 2A、2B)作為代表。而二樓另有供應辦公室空調之 PAH 系統，由二樓機房處直接採取外氣進行換氣，故於該處設定一外氣採樣點。(編號 OUT-2)

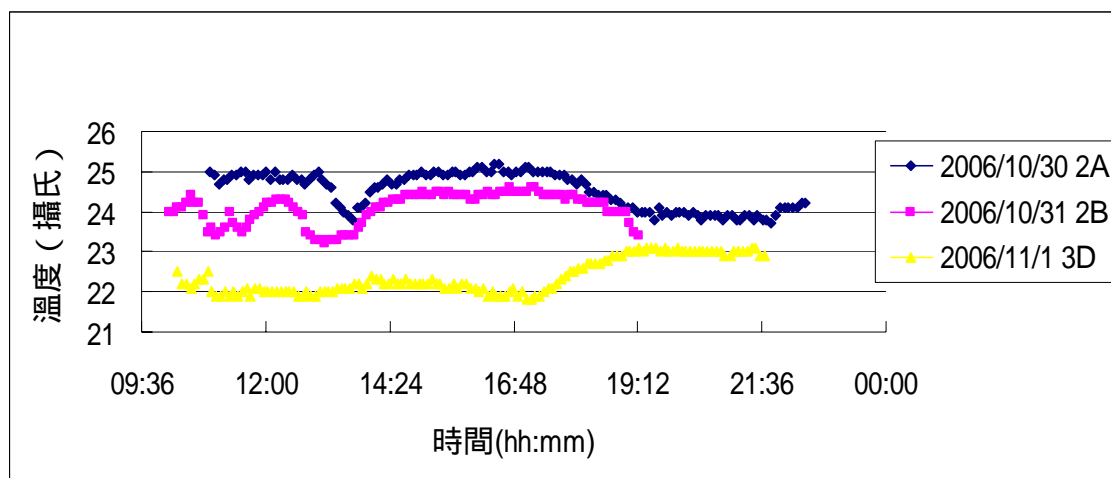
3-3-2 國際航空站-溫濕度.二氧化碳監測結果

國際航空站之二氧化碳監測結果如下圖十八所示：

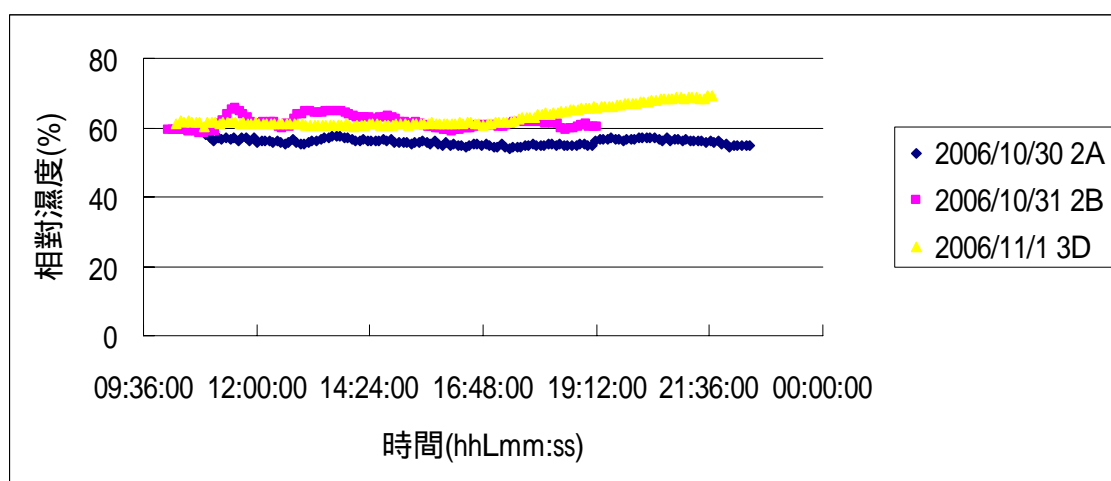


圖十八 國際航空站二氧化碳分佈圖

而國際航站監測之溫度及濕度分佈如下圖十九、二十所示：



圖十九 國際航站溫度分佈圖



圖二十 國際航站濕度分佈圖

國際航站之溫濕度及二氧化碳監測，由於考慮國際機場班機起降時間，故延長監測時間至 12 小時。此外，由於考量最大出入之人口影響，故監測機場出境大廳(3D)，以及二樓之辦公室(2A,2B)。由二氧化碳濃度逐時分佈而觀，該區域持續維持 800-1000ppm，顯示該區域受無外氣引入之空調影響，以及眾多旅客人數來往。而該三監測點之溫濕度，亦同樣適合一般環境微生物之生長繁殖。

3-3-3 國際航站-活性微生物捕集培養

國際航站使用 Burkard 單階生物氣膠採樣器進行空氣中活性微生物量測之結果如表十所示國際航空站由於出境大廳、入境大廳以及航站辦公室分屬不同樓層，且各有獨立之空調風機系統。故各樓層之生物氣膠濃度需分開討論。一樓入境大廳(1A-1E)之 I/O ratio 均接近或小於 1，其表示該區域並無污染源滋生，而以外界流入之微生物為主要來源。而 1D、1E 兩處之 I/O ratio 近於 0.5，推測可能該設點處近於空調出風口，致使微生物流動而未造成集聚之狀況，此處可能是低於同一區域平均濃度之處，若於此處設置採樣點，則需留意是否造成低估濃度之偏誤。而二樓之辦公室，相對之 I/O ratio 差異極大，可能由於該處之室內環境條件所影響。而三樓大廳(3A-3G)雖位處同一區域，然而確有濃度狀況差異出現，此一現象彰顯根據地坪面積推估採樣點數目之規劃原則，的確反映出同一區域內污染物分佈不均之狀況，而依此所得之採樣點數目，則為預警系統未來架設監測設備之最低數目。實際進行 Burkard 採樣器進行微生物採樣之情況如圖二十一所示。

表十 國際航站-微生物濃度 (CFU/m³)

區域		1樓					2樓		3樓							外氣		
		1A	1B	1C	1D	1E	2A	2B	3A	3B	3C	3D	3E	3F	3G	1樓	2樓	3樓
菌種 活性細菌 濃度	濃度	211	188	187	151	108	79	426	310	230	195	173	195	179	310	80	256	103
	中	416	472	442	186	158	95	211	293	242	190	144	253	150	184	138	204	198
	午	233	194	136	95	137	76	256	236	340	103	115	155	104	126	625	162	129
	總平均濃度	286	284	255	144	134	83	297	279	270	162	144	201	144	206	281	207	143
	I/O ratio	1.01	1.01	0.90	0.51	0.47	0.4	1.43	1.95	1.88	1.13	1.00	1.40	1.00	1.44			



圖二十一 Burkard 採樣器進行微生物量測

3-3-4 國際航站-入境大廳通風換氣效率與感染風險推估

生物恐怖攻擊於公共空間中施放,目的即為得以於短時間內感染最多人口,造成最大傷亡與效果。故針對人員行經大型空間時遭逢感染之風險評估勢所必須。現階段為眾多科學文獻與研究學者所採用之示蹤氣體通風換氣效率量測法,針對諸如家戶、辦公室之小型空間可謂效果良好,然而上如前述,由於 SF_6 其為溫室氣體且成本昂貴,且量測時須關閉出入口以達標準濃度以待衰減,如此原因均使其針對大型公共空間之量測實有未臻之處。針對此一問題,可行之方法為將 SF_6 直接灌注於風機之中,利用空調管線擴散路徑,使其於管線內部均勻混和達標準濃度,並且需要大量迅速灌注使 SF_6 濃度累積速度大於遭稀釋排出速度。本研究團隊則於此一國際航站內,針對入境大廳試行此一方法以量測其通風換氣效率。該風機之風速經實際量測後,其風

速約在 7 m/s 左右，風量應足以均勻混和空氣與 SF₆。SF₆ 灌注之實際情形如下圖二十二所示：



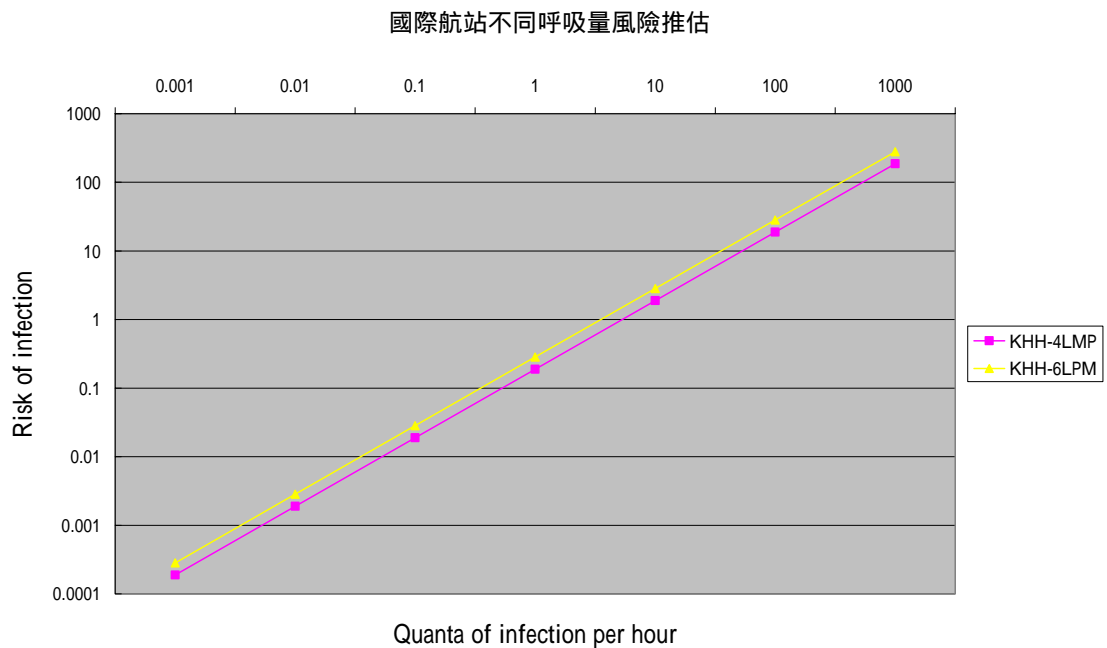
圖二十二 入境大廳 SF₆ 風機灌注施行與換氣效率量測

實際量測結果，該區域之通風換氣效率為 1.57ACH。樓地板面積為 2,700 平方公尺。設定移動中之肺部呼吸量為 4 與 6LPM，同樣以式 2 進行推估，考量接機與入境遊客停留時間假設為一小時。所得之數據及結果如下表十一所示：

表十一 國際航站不同呼吸量之風險推估

國際航站入境大廳 1.57ACH		
Quanta	呼吸量-4LPM	呼吸量-6LPM
0.001	1.89E-04	2.83E-04
0.01	1.89E-03	2.83E-03
0.1	1.89E-02	2.83E-02
1	1.89E-01	2.83E-01
10	1.89E+00	2.83E+00
100	1.89E+01	2.83E+01
1000	1.87E+02	2.79E+02

而以 2,700 平方公尺之如此大空間，若以 $q=1000$ 倍之劑量攻擊，則推估可能造成 186-279 人/每萬人之感染，視乎呼吸量而定。其風險值如下圖二十三所示。



圖二十三 國際航站大廳感染風險推估

而此處同樣考量若將通風換氣效率提高時，對於風險降低之影響。同樣採用美國 ICBO (International Conference of Building Officials)所制訂的 Uniform Building Code (UBC)法規針對集會堂之規定，採取 4ACH

進行推估計算。其可得之結果如下表十二所示：

表十二 國際航站入境大廳 4ACH 通風換氣量風險推估

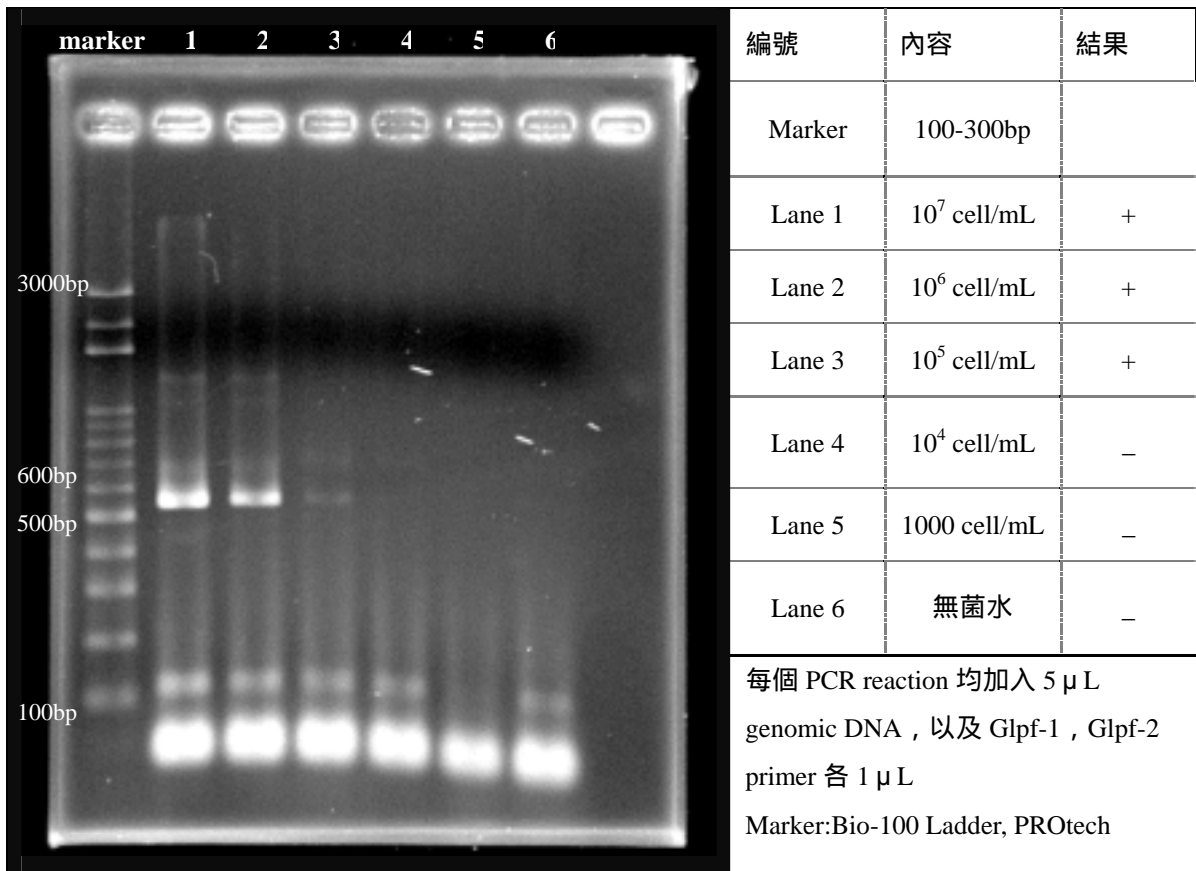
國際航站入境大廳 4ACH		
Quanta	呼吸量-4LPM	呼吸量-6LPM
0.001	7.41E-05	1.11E-04
0.01	7.41E-04	1.11E-03
0.1	7.41E-03	1.11E-02
1	7.41E-02	1.11E-01
10	7.41E-01	1.11E+00
100	7.40E+00	1.11E+01
1000	7.38E+01	1.10E+02

可觀察出改變通風量，即可大幅降低遭受感染之風險。此一趨勢與辦公大樓之結果相同。

3.4 非活性微生物微粒收集

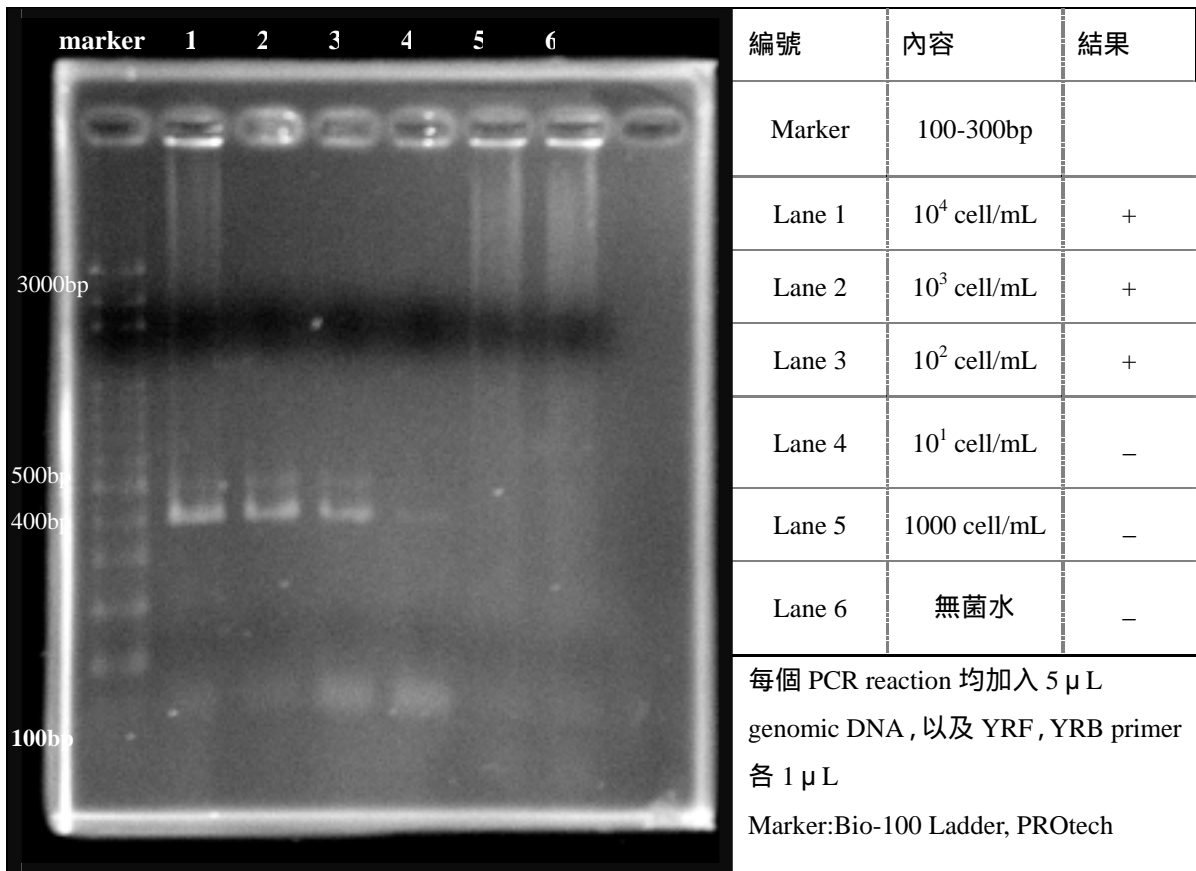
3-4-1 PCR 偵測極限

此一部份利用連續稀釋法，先針對活菌懸浮液之 *Y. enterocolitica* 以及 *B.cereus* 菌株以顯微鏡檢計數。鏡檢方法依照環保署所公告之環境微生物檢驗方法(NIEA E101.01C)進行。其結果顯示製備完成之懸浮液細菌濃度約為 *B.cereus* 2.1×10^7 個菌體/mL，*Y. enterocolitica* 1.6×10^4 個菌體/mL。而懸浮液進行 10X、100X、1000X、10000X 之稀釋後，抽取 genomic DNA 後，以 PCR 偵測反應。而 *B.cereus* 之 PCR 偵測結果其反應結果如下圖二十四所示：



圖二十四 *B.cereus* 之 Glpf primer set 偵測極限結果

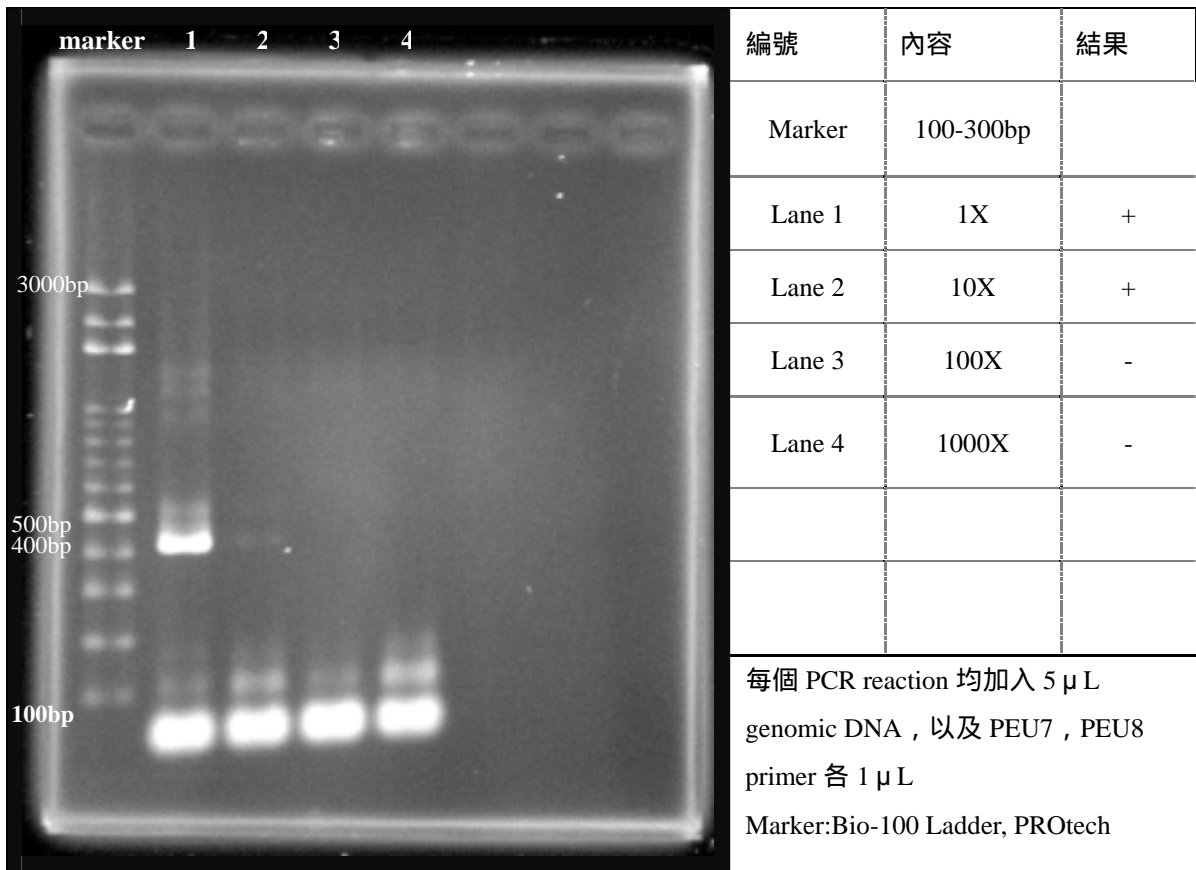
由電泳膠片可以觀察於 500-600bp 左右產生 PCR product。而此一方法之偵測極限約位於 10^5 - 10^6 cell/mL 之間。以同樣方法進行之 *Y. enterocolitica* 之 PCR 偵測結果，其結果如圖二十五所示。



圖二十五 *Y. enterocolitica* 之 YRF-YRB 偵測極限結果

由電泳膠片觀察產生約於 400-500bp 左右產生 PCR product。文獻記載之 PCR product 為 411bp，與其相合。而此一方法之偵測極限約位於 10^2 - 10^3 cell/mL 之間

而以同樣方法進行 Universal primer 之測試，並以 *E. Coli* 作為測試菌株懸浮液，其結果如圖二十六所示。此處由於 universal primer 可能反應偵測環境中諸多微生物品系，真實狀況下其在顯微鏡下實難以辨別每一細菌個體之品系，故進行顯微鏡檢以確定數目已無意義，茲僅以量測吸光值估計整體細菌數量作為偵測極限。



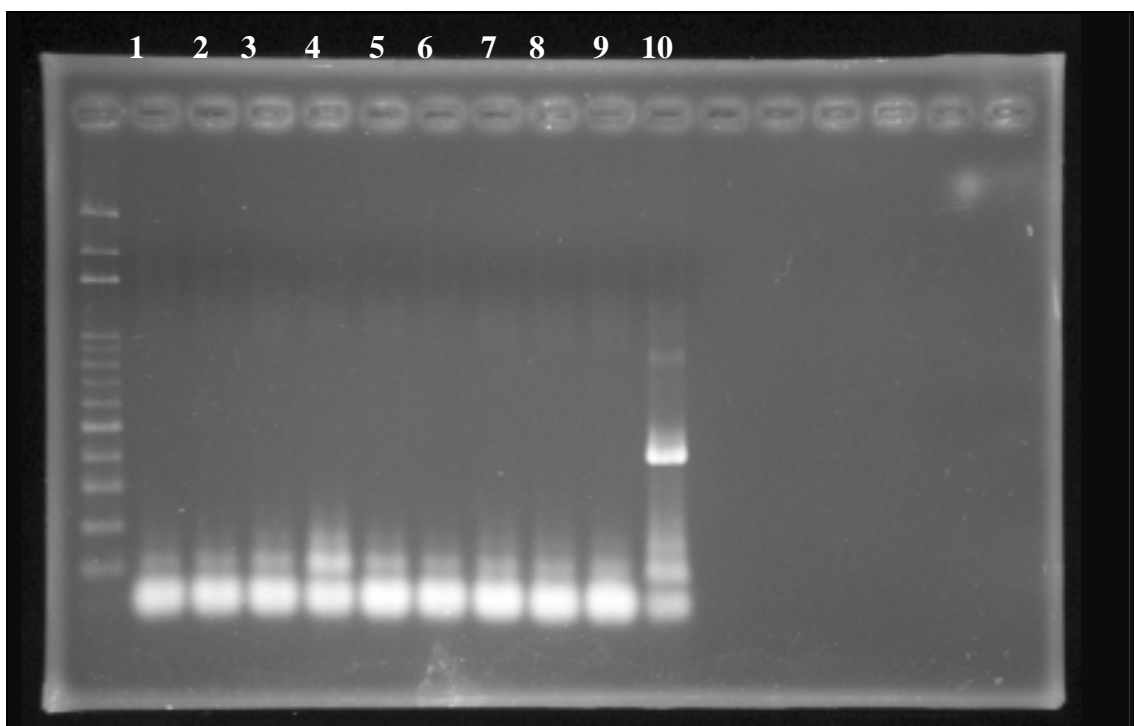
圖二十六 Universal primer 之 PEU7-PEU8 primer set 偵測極限結果

此一結果顯示以 PEU7-PEU8 primer 作為 universal primer set 之效果不佳，偵測極限過高。未來將考慮修改 universal primer 之序列，利用他種 primer set 作為確認 PCR 成功之 control。

3-4-2 實場樣本偵測

實場樣本偵測部分，針對 universal primer 及 Glpf primer set 偵測極限部分仍有疑慮與改進之處，慮及此一 PCR 監測技術尚未完全穩定成熟。故兩者部分隨機挑選三位址中樣本數個試行篩選鑑定。其餘樣本留待技術改進成熟後方再分析。

國際航空站挑選為 2A、2B、2OUT、1A、1C、1E。國內航空站挑選出 2A、2B、1B，進行 PCR 測試。一共合計九者，其結果如下圖所示



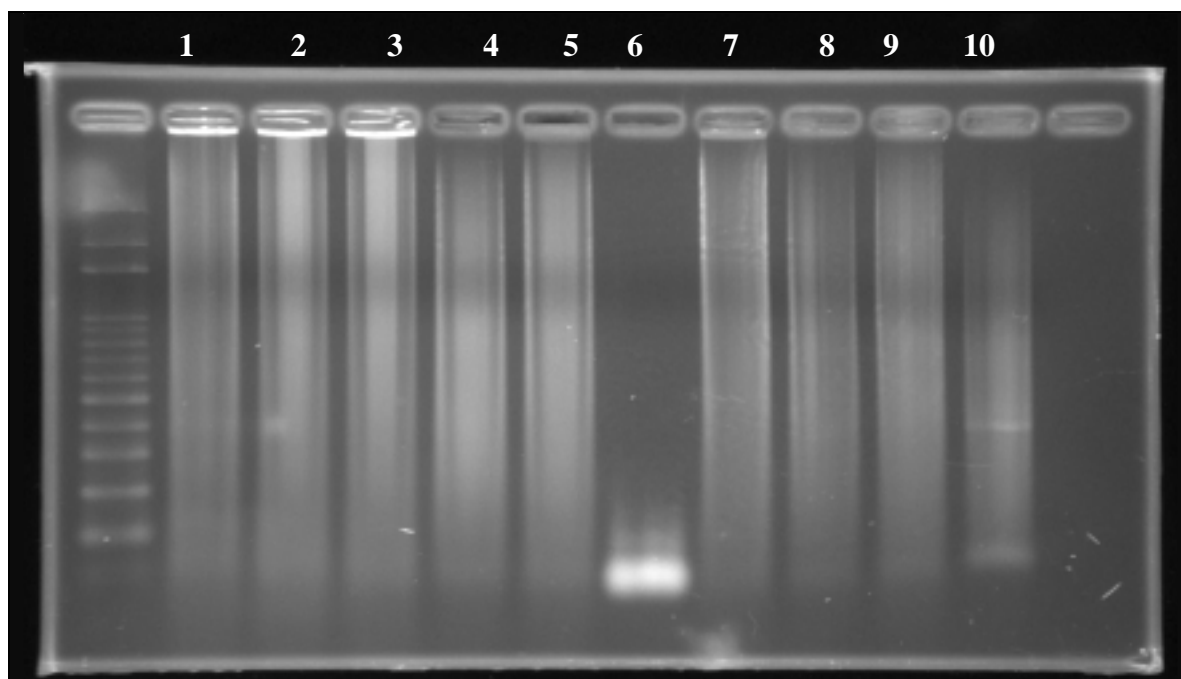
PC filter sample universal primer test

編號	內容	結果
1	2A DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
2	2B DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
3	2OUT DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
4	1A DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
5	1C DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
6	1E DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
7	2A DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
8	2B DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
9	1B DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
10	control E.coli 5ul+ PEU-7、 PEU-8 各 1ul	positive control

圖二十七 PC filter sample universal primer test

上述受檢各樣本均呈現 negative 結果，其可能由於採樣所得濃度過

低，未能成功由 universal primer 所偵測。而考量其是否因為採樣所得之原始濃度過低，以致於未能成功偵測，故將各樣本第一次所得之 PCR 產物，再次進行同條件之 PCR 反應，以提高產物訊號量。



PC filter sample 2nd universal primer test

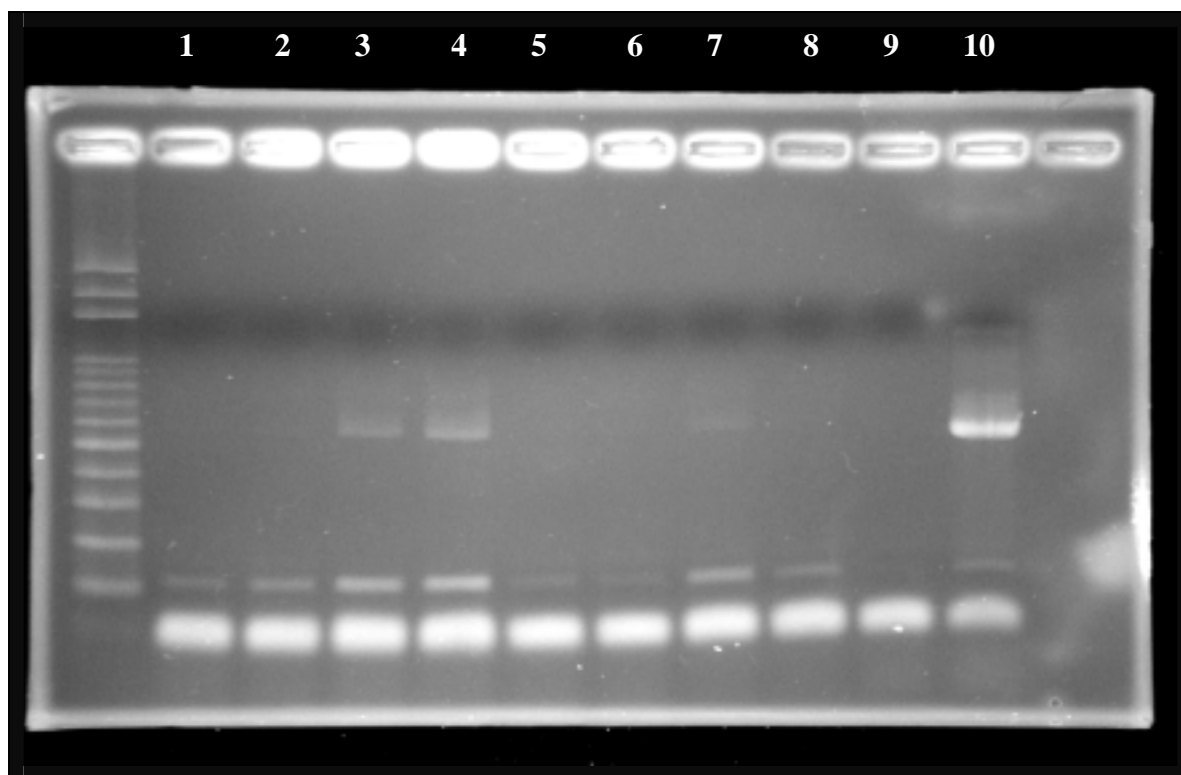
編號	內容	結果	
1	2A	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
2	2B	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
3	2OUT	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
4	1A	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
5	1C	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
6	1E	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	negative
7	2A	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
8	2B	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
9	1B	第一次 PCR 產物 DNA 5ul+PEU-7、 PEU-8 各 1ul	smear
10	control	第一次 PCR <i>E.coli</i> 產物 5ul+PEU-7 PEU-8 各 1ul	positive control

圖二十八 PC filter sample 2nd universal primer test

結果發現（圖二十八），此一部份之樣本訊號呈現 smear 狀況，其表示 universal primer 呈現非專一性 binding 狀況出現。而作為 control

之 Lane 10，其依然可見到 418bp 之產物。

而將九個現場樣本以針對 *B.cereus* 進行檢測之 Glpf-1, Glpf-2 primer 進行，其結果如下圖二十九所示。



PC filter sample Glpf primer test

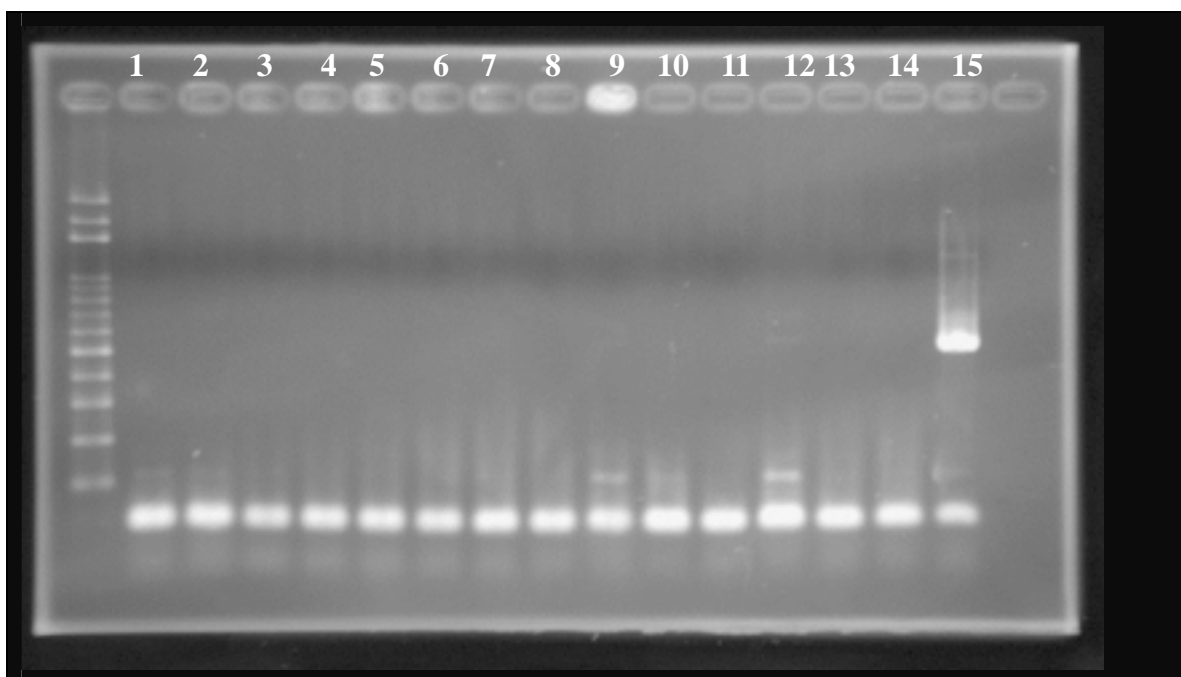
編號	內容	結果
1	2A DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	negative
2	2B DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	negative
3	2OUT DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	positive
4	1A DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	positive
5	1C DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	negative
6	1E DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	negative
7	2A DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	positive
8	2B DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	negative
9	1B DNA 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	smear
10	control <i>B.cereus</i> 5ul+ Glpf-1、 glpf-2 各 1ul	positive control

圖二十九 PC filter Glpf primer test

此處結果顯示，Lane 3, 4, 7 訊號呈現陽性反應。此處可能由於環

境中出現與此組 primer 相互干擾之微生物。此一數據顯示 Glpf-1,Glpf-2 需重新進行調整序列或者重新設計 primer，以免未來產生偽陽性反應，並在未來希望進一步研商是否能透過正式申請管道取得去活化之炭疽桿菌以作為 positive control，並進一步設計專一性之 primer 以進行進一步檢測。

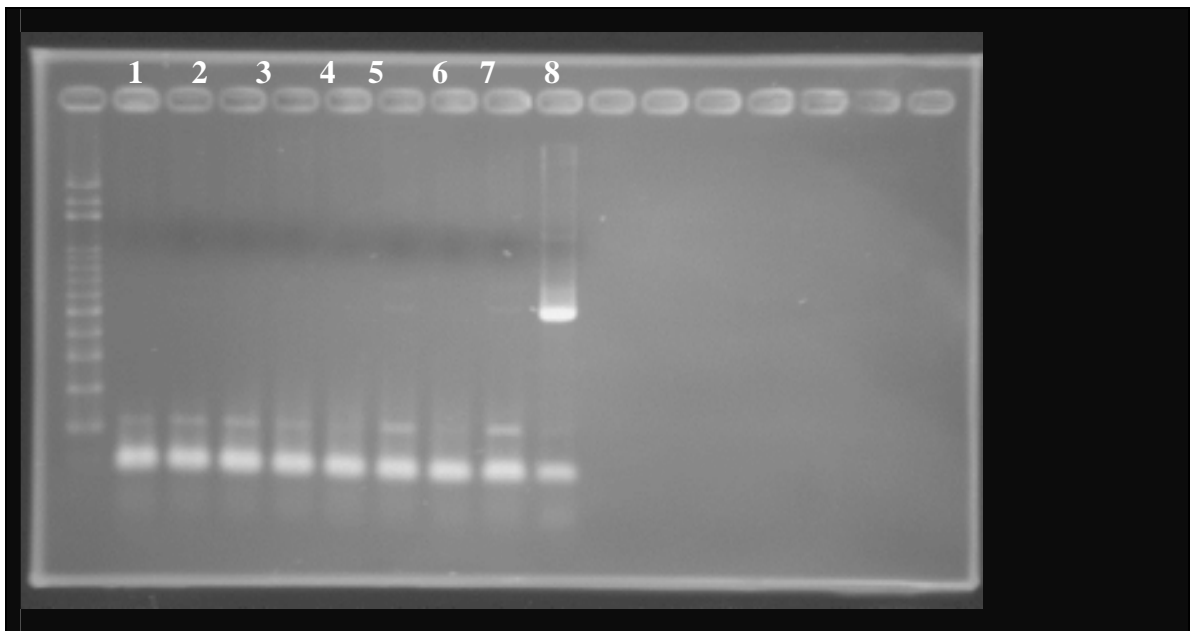
而偵測極限確立之 YRF-YRB 之 primer set，則將國際航空站之 PC filter 與 ESP 捕集液等樣本以及辦公空間之 PCR filter 等三種類型樣本，共同進行檢測，則可得結果如下圖三十、三十一所示：



PC filter and ESP sample YRF-YRB primer test

編號	內容	結果
1	3A DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
2	3B DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
3	3C DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
4	3D DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
5	3E DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
6	3G DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
7	3G(fail) DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
8	3OUT DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
9	1B DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
10	1D DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
11	1OUT DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
12	ESP-1F DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
13	ESP-2F DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
14	ESP-3F DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
15	contorol <i>Y. enterocolitica</i> 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	positive

圖三十 PC filter and ESP sample YRF-YRB primer test



PC filter and ESP sample YRF-YRB primer test

編號	內容	結果
1	17B DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
2	17E DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
3	18B DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
4	18C DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
5	19A DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
6	19C DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
7	20A DNA 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	negative
8	20C <i>Y. enterocolitica</i> 5ul+ YRF、YRB 各 1ul	positive

圖三十一 辦公空間 PC filter YRF-YRB primer test

上圖三十、三十一所有樣本均呈現 negative 狀況，此則顯示此一 primer set 不致受到環境中其他微生物之干擾，而呈現偽陽性之狀況。此組 YRF-YRB primer set 則為未來實場監測可用之引子。

綜合而言，文獻上記載有關於致病原偵測可用之 PCR 技術，無論原始為臨床檢體所用，延伸至環境樣本檢驗，即有偵測極限以及內容物干擾複雜等問題。如何得將此一技術標準並最佳化，實為本單位明

年度首須解決之關鍵處。

揆諸生物恐怖攻擊預警系統之架構，商用市售之各類型固定式微生物檢驗系統實均已成熟可用，成效良好，唯其成本與架設尚有適用性之考量。此一快速篩檢技術雖與商售品有所重疊，然而立於實驗室基礎與成本考量，未能偏廢。

四 結論與建議

本研究有鑑於開發一針對生物恐怖攻擊防範未然之所需，架構建置一以空氣中微生物作為監測目標之早期預警系統。其中以源於室內空氣品質之採樣監測規劃原則為骨幹，搭配 ESP 靜電集塵式採樣器、串連式濾紙收集、Burkard 活性微生物捕集等設備，得以進行空氣中微生物之監測。並以一公務機關之辦公形式空間代表，國內航站及國際航站各一處之交通運輸中心為代表進行測試。其間並搭配感染風險模式評估與電腦程式氣流模擬，以瞭解本系統之可行性。實測數據可達成以下結論：

1. 由活性微生物採樣濃度變化結果而論，本系統之採樣點選取設置之原則可謂有效反應環境間濃度之差異，實能取得生物戰劑施放時，具環境代表性之樣本。
2. 本系統除一般之環境採樣實測之外，另外利用通風換氣效率量測以及感染風險評估模式瞭解遭受感染之風險。而數據顯示，小樓地板面積且低通風量之環境，受生物戰劑攻擊時之感染風險較高，而提高空間之通風量能有效降低感染風險。
3. 於國內航空站試行使用 CFD 電腦程式模擬流場之結果，與活性微生物濃度分佈大致相符。未來於正式系統建置時，將可採用

此一工具協助建構。

4. 以 PCR 為基礎之偵測技術，實有偵測極限與環境干擾等問題，目前尚未完全發展成熟，亟待更多實場測試技術盲點與突破限制。

五 計畫重要研究成果及具體建議

1. 本研究藉助未曾所用之室內空氣品質採樣原則，建立一能取得環境代表性樣本之生物恐怖攻擊早期預警系統採樣規劃原則。
2. 此一系統同時藉助 CFD 電腦程式模擬，驗證理論結果與微生物分佈動向趨勢一致，未來可作為採樣規劃之輔助參考。
3. 利用通風換氣效率為基礎之風險模式評估，增加單位面積之通風量，得有助於降低受生物戰劑攻擊時之感染風險。
4. 關於空氣中微生物之監測技術，其由臨床延伸至環境樣本所需克服之難關，實有專注開發之必要。

參考文獻

- ACGIH(1999).Bioaerosol : Assessment and Control. American Conference of Governmental Industrial Hygienists
- Agranovski I.E., Safatov A.S., Borodulin A.I., Pyankov O.V., Petrishchenko V.A., Sergeev A.A., Agranovski V., Grinshpun S.A.(2005) New personal sampler for viable airborne viruses: feasibility study. *Aerosol Science*36:609-617.
- Belgrader P. (2003) A reusable flow-through polymerase chain reaction instrument for the continuous monitoring of infectious biological agents. *Analytical Chemistry*. 75(14) 3446-50.
- Brown K. (2004) Up in the air. *Science* 305:1228-29.
- Iqbal S.S., Mayo M. W., Bruno J. G., Bronk B. V., Batt C. A., Chambers J. P.(2000) A review of molecular recognition technologies for detection of biological threar agents. *Biosensors and Bioelectronics*. 15:549-78.
- Charrel R N, Scola B L , Raoult D. (2004) Multi-pathogens sequence containing plasmids as posiive controls for universal detection of potential agents of bioterrorism. *BMC Microbiology*. 4:21
- Cox C., Wathes C. (1995) Bioaerosols in the environment .Bioaerosol Handbook.
- Donaldson K.A., Kramer M. F., Lim D.V. (2004) A rapid detection method for Vaccinia virus, the surrogate for smallpox virus. *Biosensor and Biotechnology*. 20:322-27
- Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., Günther S.(2002). Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Vally fever virus, Dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.40:2323-30.
- Espy M.J., Cockerill I. F., Meyer R. F., Bowen M. D., Poland G. A.Hadifield T.L., Smith T.F.(2002). Detection of small virus DNA by Light-Cycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.40:1985-88
- Fennelly K.P., Davidow A.L., Miller S.L., Ellner J.J.(2004). Airborne infection with Bacillus anthracis-from mills to mail. *Emerging Infectious Diseases*. 10,6 998-1001

- Gottschalk R., Preiser W. (2005) Bioterrorism: is it a real threat? *Medical Microbiological Immunology*. 194:109-14.
- Hindson B. J., Makarewicz A. J., Setlur U.S., Henderer B. D., McBride M. T., Dzenitis J M. (2005). *Biosensors and Bioelectronics* 20:1925-31.
- Jeffer A.S.(2004) Biohazard detection system deployment resumes. US Postal Service Postal News. No.38
- Karwa M., Cruuine B., Kvetan V. (2005) Bioterrorism: preparing for the impossible or the improbable. *Critical Care Medicine*.33(1):S75-95.
- Lee S., Willeke K., Mainelis G., Adhikari A., Wang H., Reponen T., Grinshpun S.A.(2004). Assessment of electrical charge on airborne microorganisms by a new bioaerosol sampling method. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 1:127-38.
- Lin X, Reponen T., Willeke K., Wang Z., Grinshpun S.A. Trunov M. (2000) Survival of airborne microorganisms during swirling aerosol collection. *Aerosol Science and Technology*. 32:184-96.
- Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A., Kramer M.F. (2005) Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and bioware. *Clinical Microbiology Reviv.* 18,4, 583-607
- MacNeil L., Kauri T., *et al.* (1995). "Molecular techniques and their potential application in monitoring the microbiological quality of indoor air." *Canadian Journal of Microbiology* 41.
- Mainelis G., Grinshpun S.A., Willeke K., Reponen T., Ulevicius V., Hintz P.J.(1999). Collection of airborne microorganisms by electrostatic precipitation. *Aerosol Science and Technology* 30:127-44.
- Mainelis G., Willeke K., Adhikari A., Reponen T., Grinshpun S.A., (2002). Design and collection efficiency of a new electrostatic precipitator for bioaerosol collection. *Aerosol Science and Technology* 36:1073-8.
- McBride M. T., Masquelier D., Hindson B. J., Makarewicz A J., Brown S., Burris K., Metz T., Langlois R. G., Tsang K. W., Bryan R., Anderson D. A., Venkateswaran K.S., Milanovich F. P., Colston B.W. Jr. (2003). Autonomous Detection of Aerosolized *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. *Analytical Chemistry* 5293-99.

- McDonough E. A., Barrozo C.P., Russell K.L., Metzgar D.(2005). A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens. Molecular and cellular probes 15.
- Niedrig M., Schmitz H., Becker S., Günther S. Meulen J t., Meyer H., Ellerbrok H., Nitsche A., Gelderblom H. R.(2004) First international quality assurance study on the rapid detection of viral agents of bioterrorism. Journal of Clinical Microbiology. 42(4)1753-55
- Raffel M., Willert C.E., Kmpemhans J.(1998) Partice Image Velocimetry, Springer publish.
- Radstrom P., Knutsson R. Wolffs P., Lovenklev M., Lofstrom C. (2004) Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible sample. Molecular Biotechnology. 26:133-146.
- Rothman R.E., Majmudar M.D., Kelen G.D., Madico G., Gaydos C.A., Walker T., Quinn T.C. (2002) Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. Journal of Infectious Disease1;186(11):1677-81
- Shea D.A., Lister S.A. The biowatch program: detection of bioterrorism. (2003).Congressional research service report No. RL 32152. Federation of American Scientists.
- Stratis-Cullum D. N., Griffon G. D., Mobley J., Vass A. A., Vo-Dinh T. A miniature biochip system for detection of aerosolized *Bacillus globigii* spores(2003)Analytical Chemistry. 75:275-80.
- Stewart S., Grinshpun S.A., Willeke K., Terzieva S., Ulevicius V., Donnelly J. (1995). Effect of impaction stress on microbial recovery on an agar surface. Applied and Environmental Microbiology.61:1232-3.
- Su H.J., Wu P.C., Chen H.L., Lee F.C., and Lin L.L. Exposure Assessment of indoor allergens, endotoxin, and airborne fungi for homes in southern Taiwan. Environmental Research 2001 85; 135-144.
- USEPA (2002). Guidance on choosing a sampling design for environmental data collection: for use in developing a quality assurance project plan. Washington, D.C.,U.S. Environmental Protection Agency.

- Verhoeff A. P., van Wijnen J.H., *et al.* (1990). "Enumeration and identification of airborne viable mould propagules in houses. A field comparison of selected techniques." *Allergy*45 (4):275-8.
- Wilson J. W., Erler A M , Nasarabadi S L, Skowronski E W, Imbro P M. (2005) A multiplexed PCR-coupled liquid bead array for the simultaneous detection for four biothreat agents. *Molecular and Cellular Probes*19 : 147-44.
- Wu P.C., Su H.J., and Lin C.Y. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. *The Science of the total Environment* 2000 253; 111-118.
- Wu P.C., Su H.J., and Ho H.M. Comparison of sampling media for environmental viable fungi collected in a hospital environment. *Environmental Research* 2000 82; 253-257.
- Wu P.C., Li Y.Y., Lee C.C., Chiang C.M., Su H.J. Risk assessment of formaldehyde at typical office buildings in Taiwan. *Indoor Air* 2002 13:1-5.
- Wu P.C., Li Y.Y., Lee C.C., Li F.C., Huang C.Y., Chiang C.M., Su H.J. Changing microbial concentrations associated with ventilation performance in Taiwan's air-conditioned office buildings. *Indoor Air* 2004 (accepted)
- Zhou G., Whong W.Z., *et al.* (2000). "Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment." *Molecular & Cellular Probes*14(6):339-48.
- 蘇慧貞、李俊璋、江哲銘，室內空氣品質檢測方法之研究，行政院環境保護署研究報告，2003年6月 EPA-91-1601-02-07。
- 蘇慧貞、李俊璋、江哲銘，室內空氣品質及污染源管制法規策略分析，行政院環境保護署研究報告，2001年12月 EPA-90-FA11-03-163。
- 蘇慧貞、江哲銘，室內空氣污染物健康風險評估及管制成本效益分析，行政院環境保護署研究報告，2005年2月。
- 蘇慧貞、江哲銘、李俊璋，室內空氣品質標準草案及管制策略探討，行政院環境保護署研究報告，EPA-F88-FA31-03-0007。
- 于台珊、蘇慧貞，生物氣膠快速監測技術研究 I，行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所科技研究發展計畫，IOSH94-H311。
- 蘇慧貞，生物氣膠暴露評估與控制技術研究-室內真菌暴露評估與控制技術研究 (1/3)，行政院國家科學委員會計畫，NSC94-2321-B-006-119。