

on postoperative patients with esophageal cancer [J]. BMC Gastroenterol, 2016, 16(1): 142-143.

[3] 蔡华新, 黄灿华, 陈志杰, 等. 不同手术路径治疗胸中段食管癌的疗效分析[J]. 癌症进展, 2016, 14(9): 904-906.

[4] 刘海峰, 申成玉, 王献增, 等. Ivor Lewis和sweet术式治疗食管中、下段癌的临床研究[J]. 长治医学院学报, 2017, 31(1): 43-46.

[5] 荣振华, 高双庆, 魏煜程, 等. 胸中下段食管癌手术方式的临床研究[J]. 中国医学创新, 2016, 13(5): 70-73.

[6] PIRONI L, ARENDS J, BOZZETTI F, et al. ESPEN guidelines on chronic intestinal failure in adults[J]. Clin Nutr, 2016, 35(2): 247-252.

[7] MCCLAVE SA, DIBAISE JK, MULLIN GE, et al. ACG clinical guideline: nutrition therapy in the adult hospitalized patient [J]. Am J Gastroenterol, 2016, 111(3): 315-334.

[8] TAYLOR BE, MCCLAVE SA, MARTINDALE RG, et al. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patients: society of critical care medicine (SCCM) and American society for parenteral and enteral nutrition (ASPEN)[J]. Crit Care Med, 2016, 44(2): 390-438.

[9] 江仲. 60例胃癌术后早期肠内肠外营养支持应用体会[J]. 安徽医药, 2015, 19(2): 346-348.

[10] 关志宇, 张军, 王硕, 等. 十二指肠营养管在食管癌患者术后肠内营养治疗中的应用[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2017, 4(2): 194-197. DOI: 10.16689/j.cnki.cn11-9349/r.2017.02.013.

(收稿日期: 2018-03-11, 修回日期: 2018-05-17)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.0034

◇ 临床医学 ◇

优化ATP荧光法检测医院次氯酸钠消毒后物体表面菌落数的稳定性观察

张博, 刘阳, 樊海鑫, 陈玉, 赵小梨, 张丽娟, 陆红玲

作者单位: 遵义医科大学基础医学院, 贵州 遵义 563000

通信作者: 陆红玲, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤分子生物学, E-mail: l_hongling2@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(31860315)

摘要:目的 观察优化ATP荧光法检测医院次氯酸钠消毒后物体表面菌落数的稳定性, 拓展ATP荧光法在医院的应用范围。方法 优化ATP荧光法检测试剂的成分, 采用优化后的ATP荧光法对医院一种常用消毒药次氯酸钠(NaClO)消毒后的菌落数进行检测, 并考察其检测结果与国标平皿法菌落数检测结果的相关性。**结果** 优化后的ATP荧光法检测医院次氯酸钠消毒后的物体表面菌落总数与国标平皿法菌落总数检测结果有很好的相关性, 相关系数为0.985, $Y = 0.0627X + 12.453$ ($R^2 = 0.9625$), 并在此基础上制定了荧光法检测的半定量标准。**结论** ATP荧光法可以应用于医院次氯酸钠消毒后物表的检测。**关键词:** 消毒检测; 次氯酸钠; ATP荧光法; 菌落总数

Application of optimized ATP fluorescence method in NaClO disinfection

ZHANG Bo, LIU Yang, FAN Haixin, CHEN Yu, ZHAO Xiaoli, ZHANG Lijuan, LU Hongling

Author Affiliation: Basic Medical College, Zunyi Medical University School, Zunyi, Guizhou 563000, China

Abstract: Objective This paper aims to by observing the number of colony after ATP fluorescence detection to optimize and expand the application scope of ATP fluorescence method in hospitals. **Methods** The composition of ATP fluorescence detection reagent was optimized, and then NaClO, a common disinfection component, was selected for determination. **Results** It was found that the optimized ATP fluorescence method which used to detect hospital NaClO disinfection surface had a good correlation with the national standard plate method colony count detection results, $Y = 0.0627X + 12.453$ ($R^2 = 0.9625$), and on this basis, a semi-quantitative standard for fluorescence detection was established. **Conclusion** ATP fluorescence detection results have significant correlation with the national standard colony count detection method, with a correlation coefficient of 0.985. This method can be applied to the detection of the surface which disinfected after NaClO in hospitals.

Key words: Disinfection test; Sodium hypochlorite; ATP fluorescence method; Total number of colony

ATP荧光法快速检测细菌总数是一种以生物发光反应为基础的检测方法, 该方法检测菌落总数便捷、快速、准确, 通过该方法能实时监测操作流程和

生产环境中微生物含量, 可以从源头避免因细菌总数超标导致的严重后果, 因此近些年在多个相关的行业领域中都得到了广泛的应用, 尤其是对卫生环

境要求严格的部门,如医院和食品企业等等。

目前我国大多数医院普遍都是采用消毒液来进行杀菌消毒的,此法成本低,使用范围广,目前消毒的效果还是根据国家标准(GB15982-2012)来进行菌落总数的培养,此法培养时间长,一般需要48~72 h,但是经过长时间的菌落培养等待,被消毒的位置可能菌落总数早已经超标,此时使用ATP荧光法就是对消毒效果是否理想很好的补充检查。但是外界因素很容易影响荧光法的稳定性,造成结果的不准确,这种结果的不稳定使该方法的应用范围受到了很大的限制^[1-6]。

本研究自2018年3—11月在ATP荧光反应试剂中加入不同保护成分来增强试剂稳定性,以次氯酸钠(化学分子式为NaClO)消毒物表做为实验对象,筛选一种可以明显降低干扰次氯酸钠消毒液检测结果的试剂,目的是提高ATP荧光法检测结果的稳定性,提高其在医疗领域的应用范围。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器 本研究中所用的磷酸二氢钠,次氯酸钠等生化试剂均为国产分析纯,购自广东华大技术有限公司;蛋白纯化系统为美国GE公司生产的液相色谱系统AKTA PURIFIER;检测荧光信号仪器为北京滨松光子技术有限公司生产的BHP9505微量光度仪。

1.2 试剂制备

1.2.1 PBS缓冲液的配制 pH7.8的0.2 mol/L NaH_2PO_4 8.5 mL与0.2 mol/L Na_2HPO_4 91.5 mL混合。

1.2.2 ATP荧光反应试剂的制备 荧光素酶0.02 mg/mL;D-荧光素0.003 mg/mL;pH7.8的Tris-HCl 50 mmol/L;KCl100 mmol/L;MgCl₂2 mmol/L;丙三醇(glycerol)10%;聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)1%。溶液配制后用一次性灭菌的0.2 μm水系滤膜过滤除菌。

1.2.3 消毒试剂的配制 将次氯酸钠配制成5%的母液备用,使用时将母液用灭菌蒸馏水1:100进行稀释。

1.3 反应机制 基于萤火虫生物发光的原理,在有镁离子存在的条件下,萤火虫荧光素酶以D-荧光素、ATP、O₂为底物,将化学能转化为光能并释放光量子^[4],其发光强度(I)与ATP浓度(cATP)符合函数关系; $I = I_{\max} \times c\text{ATP} / (K_m + c\text{ATP})$,式中, I_{\max} 为最大发光强度; K_m 为 $l \times 10^{-4}$ 。可知,当cATP远小于 K_m 时,I正比于样品中的cATP。因此可通过测定发光体系的I值来定量ATP浓度^[7]。正常条件下细菌体内的ATP含量趋近恒定,为 10^{-18} mol^[8]。以光电倍增管为核心

采光部件的光度计都能检测低于10 pg分子的ATP,这就使快速、准确检测细菌成为可能^[9]。

1.4 蛋白纯化 萤火虫荧光素酶质粒由美国Cellex公司CEO James惠赠,该质粒载体为pET15b-sumo。将该质粒转化到BL21DE3感受态细胞中,经过培养挑取单克隆接菌到LB培养基中,37℃培养4 h后18℃异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导,得到的粗纯蛋白质经过Ni²⁺离子交换纯化后,获得较高纯度的萤火虫荧光素酶。

1.5 ATP荧光试剂的成分优化 ATP荧光法在实际检测应用的过程中非常容易受到外界因素的干扰,比如次氯酸钠会影响检测结果的最低灵敏度和稳定性,而次氯酸钠溶液也经常被用在物体表面消毒的过程中。为此我们首先对荧光试剂的成分进行优化,在原试剂成分中加入终浓度2 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)和2%硫酸铵来增加荧光反应试剂中的蛋白质浓度和提高试剂的稳定性。

1.6 次氯酸钠消毒后菌落总数的检测方法 选取一块1.2 m×2 m的大理石平台,用0.05% NaClO溶液将无菌卫生棉浸湿,擦拭平台表面,20 min晾干。在72 h内分别9次采用平皿法和优化前后两种ATP荧光试剂同时检测所得到样品中的细菌总数。

1.7 采样方法 将无菌棉签用灭菌的PBS缓冲液浸湿,将棉签在所检测的物体表面均匀涂擦,进行细菌采集,采样面积为10 cm×10 cm,将取样后的棉签头部剪掉手接触部分再次放入装有1 mL PBS灭菌的EP管中涡旋摇晃洗涤数次,即得到物体表面菌样。将得到的菌样进行菌落总数(CFU)和相对发光值(RLU)检测,以CFU和RLU值做结果分析。

1.8 统计学方法 采用SPSS 19.0进行分析, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 次氯酸钠消毒后荧光法检测与菌落总数相关性 经消毒剂擦拭晾干后,平皿法检测的结果是没有任何细菌,但采用优化前ATP荧光试剂检测结果却显示出一定的光值,在随后的72 h,平皿法检测结果随着时间的增加,细菌总数随之增加,但荧光法检测在24 h内的检测结果没有规律,24 h后随着时间的变化,荧光值(RLU)与细菌总数(CFU)有一定的相关性(图1,2)。因此,当被检样品细菌数较少时,检测结果受次氯酸钠的影响较大,但随着次氯酸钠的不断降解和细菌总数的增加,次氯酸钠对荧光法检测结果的影响逐渐变小。优化后的荧光试剂检测的结果则与平皿法检测的结果有一定的相关性(图3)。

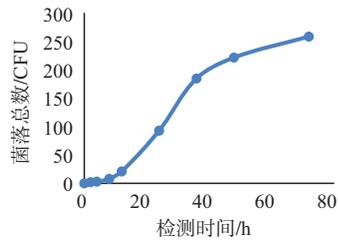


图1 次氯酸钠消毒后的物表72 h菌落总数变化曲线

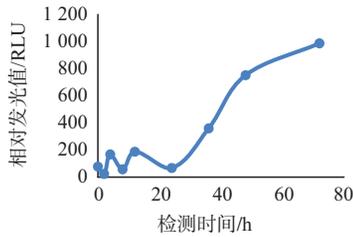


图2 次氯酸钠消毒后的物表72 h荧光值变化曲线

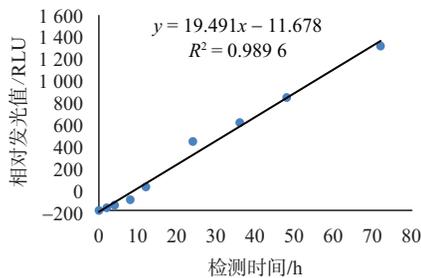


图3 优化后的荧光试剂检测次氯酸钠消毒后的物表72 h荧光值曲线

2.2 次氯酸钠消毒后荧光法菌落总数标准曲线的建立 我们再次通过对医院50张办公桌和50位工作人员的手共100个样品采用次氯酸钠溶液进行消毒,经过5 h后,采用国标平皿法和ATP荧光法两种方法同时进行检测,将平皿法检测菌落总数(CFU)和荧光法检测荧光值(RLU)的两组数据进行线性拟合,建立标准曲线(图4),得出公式(1): $y = 0.0627x + 12.453$ ($R^2 = 0.9625$),说明在次氯酸钠消毒后的物体表面经过一段时间后其菌落生物发光值与菌落总数存在着线性相关关系。

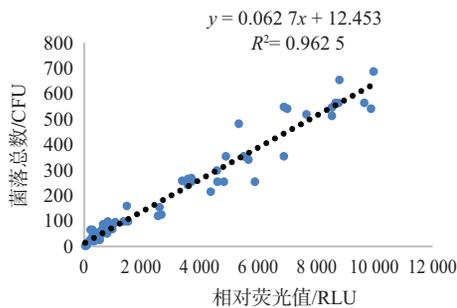


图4 ATP荧光法检测次氯酸钠消毒后表面的菌落总数标准曲线

2.3 次氯酸钠消毒后荧光法与菌落总数的检测 我们再次用相同的方法选取医院30处不同洁净程

度的物体表面(用次氯酸钠溶液消毒)。把荧光法检测得到的RLU值带入公式(1),推算出CFU值(菌落总数预测值),再将平皿法测得的CFU值(菌落总数实际值)和菌落总数预测值(表1),用SPSS软件进行显著性和相关性分析,结果表明当经过次氯酸钠溶液擦拭过的物表再次采用荧光法检测时,平皿法检测出的实际CFU值与荧光法推测的CFU预测值在 $P < 0.01$ 水平上呈显著相关,相关系数 $r = 0.985$ 。即优化后的ATP荧光试剂在检测次氯酸钠溶液擦拭后的物体表面的结果与国标平皿计数法基本一致,可以用此方法对次氯酸钠消毒后的物体表面清洁度进行半定量的判断。

表1 30处不同洁净程度的物体表面次氯酸钠消毒后的菌落总数预测值与实际推算值

序号	相对荧光值	菌落总数预测值/(CFU/mL)	菌落总数实际值/(CFU/mL)
1	57	16	30
2	104	19	37
3	136	21	45
4	280	30	56
5	312	32	56
6	312	32	56
7	423	39	72
8	503	44	84
9	519	45	86
10	838	65	87
11	838	65	88
12	1364	98	90
13	1556	110	120
14	1620	114	135
15	1715	120	164
16	1731	121	187
17	1747	122	223
18	1779	124	241
19	3167	211	268
20	3230	215	288
21	3342	222	320
22	4905	320	422
23	7457	480	490
24	7584	488	509
25	7935	510	510
26	8573	550	536
27	9451	605	750
28	9690	620	780
29	10647	680	875
30	13677	870	930

医院消毒标准-国标(GB15982-2012)规定 1 cm^2 的面积 $\text{CFU} \leq 5.0$,本实验的采样面积为 $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$,所以检测标准设定为500 CFU,我们根据荧光法推导出的CFU结果与平皿法检测的结果进行比对,并

参考国标(GB15982-2012),发现当RLU值低于7 000时,无论荧光法计算出的菌落总数CFU和平皿法实测的菌落总数CFU结果均小于450,当RLU高于8 000时,对应CFU的结果均高于550,所以我们将光值RLU低于7 000设定为清洁;RLU高于8 000设定为污染;RLU光值7 000~8 000设定为警告,需要进一步检测(表2)。

表2 医院消毒半定量标准

荧光值	菌落总数/CFU	半定量结果
< 7 000	< 500	清洁
7 000~8 000	< 500	警告
> 8 000	> 500	污染

根据表2的判断标准,我们随机在医院检测了次氯酸钠消毒后的护理托盘、医护人员的双手、办公桌面。由两个人分别各自采用一种方法进行双盲实验进行验证。结果显示当平皿法检测结果细菌超标时,荧光法测得的RLU值按照表2中设定的结果同样为超标。当平皿法检测的结果为合格时,荧光法测得的光值同样低于设定污染的光值。验证试验共检测15个样品,其中平皿法测得12个为合格样品,不合格样品3个。荧光法测得11个为合格样品,3个为不合格样品,1个为警告(表3)。该结果表明该方法改进后可以对经过次氯酸钠消毒液擦拭后的物体表面细菌总数的多少作出半定量的判断。

表3 两种方法15组盲测结果对比

序号	荧光法检测值	半定量结果	平皿法检测菌落总数/CFU	半定量结果
1	136	清洁	45	清洁
2	168	清洁	56	清洁
3	184	清洁	78	清洁
4	360	清洁	61	清洁
5	663	清洁	98	清洁
6	695	清洁	105	清洁
7	822	清洁	103	清洁
8	1 189	清洁	95	清洁
9	1 572	清洁	135	清洁
10	2 258	清洁	114	清洁
11	2 433	清洁	152	清洁
12	7 584	警告	520	警告
13	9 307	污染	640	污染
14	10 073	污染	780	污染
15	12 242	污染	860	污染

3 讨论

目前国标法细菌总数测定采用的是平皿法,工作量大,等待时间长,所以大大降低了工作效率,而且对于营养富集的检测样品不能做到实时监测,过长的检测时间会造成细菌的大量增长,如果通过荧光法对样

品进行半定量的测定,快速的给出样品合格、警告、不合格的参考,则可以快速提高工作效率和避免因检测结果时间过长造成细菌超标的危害^[8,10]。

ATP荧光法的酶促反应对外界干扰较为敏感,而目前市场中常用的消毒液种类繁多,每一种消毒液对反应的光值均有不同程度的影响,所以限制了该方法在医院中的应用。我们通过调研多家三甲医院,发现所使用的消毒液主要成分为次氯酸钠,所以我们将其作为首选并对检测试剂进行了优化,克服了在低灵敏度时次氯酸钠消毒液对检测结果的影响,并初步建立了检测标准。不同的医院或部门可以根据环境卫生的要求单独对检测标准细化,如清洁、基本清洁、警告、污染、重度污染等。另该方法的检测结果RLU光值能直接由仪器读出,并对检测结果进行不同等级的划分,直接为使用部门提供半定量的检测结果,避免了检测前需要建立标准曲线等一系列复杂的换算过程,既为日常的检测节约了时间,又便于检测人员的使用。本实验选取了较为常见的次氯酸钠消毒样品来进行实验,为荧光试剂在医院领域大范围的应用提供参考,但该试剂优化后仍然对市场上其他大部分消毒液种类不具备普遍性,因此我们也在不断的进行后续的实验,力争早日研发出更为稳定、适应性更广泛的荧光快速检测试剂。

参考文献

- [1] 程莉莉,张秀月,黄玉,等.应用ATP生物荧光法评价消毒湿巾对物体表面的清洁消毒效果[J].中国消毒学杂志,2018,35(3):236-238.
- [2] 王稼林,薛希娟,孙伦,等.ATP荧光检测仪在泡沫消毒剂杀菌效果检测中的应用[J].中国畜牧兽医文摘,2018,34(5):69.
- [3] 王汝玲,李珂.消毒供应室护士职业损伤危险因素及防护对策[J].安徽医药,2012,16(9):1371-1372.
- [4] 朱艳萍,刘素珍,张甜,等.ATP生物荧光检测法在观察产房工作人员手卫生与产后医院感染关系的分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(22):3509-3512.
- [5] 张乃波,田明杰,徐晓海,等.ATP生物荧光法对预防接种门诊物体表面及接种人员手部清洁度的检测分析[J].医学动物预防控制,2018,34(8):771-773.
- [6] 何学军,蒋国钦.ATP生物荧光法评价医疗器械清洗效果观察[J].中国消毒学杂志,2017,34(5):428-430.
- [7] 刘阳,牟金明.ATP生物发光法在快速检测物体表面清洁度中的应用[J].安徽农业科学,2016,44(1):125-128.
- [8] 张丽娜,曹子晶,尹光昕,等.ATP生物荧光法检测医疗机构环境物体表面洁净度的效果评价[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(18):195-197.
- [9] 张浩.ATP生物荧光法快速检测化妆品中菌落总数的研究[J].工业微生物,2017,47(5):53-55.
- [10] 翁月萍,吴逸海,张华平,等.ATP生物荧光法在医疗器械清洗质量检测中的应用[J].中国校医,2018,32(12):884-886.

(收稿日期:2019-03-29,修回日期:2019-05-12)