

ATP 生物荧光检测技术相关性基础研究

易 滨, 刘 军, 王 芳, 涂显春, 赵晓晓, 赵江丽

(中国人民解放军第 309 医院, 北京 100091)

[摘 要] **目的** 测试三磷酸腺苷(ATP)生物荧光检测技术与菌落数和血液含量的关系。**方法** 将大肠埃希菌 ATCC 8099 菌液和健康人的血液分别稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} , 加入裂解液、酶、ATP 标准品, 用荧光光度计测定 2 次相对发光值(RLU), 按照公式($\text{ATP 含量} = \frac{A_1}{A_2 - A_1} \times 10^6$)换算成 ATP 含量(amol); 用血细胞分析仪测定血红蛋白值, 以反映蛋白残留量。将各稀释度菌液、血红蛋白含量与 ATP 含量之间的关系进行曲线标定, 判定其相关性。**结果** 菌数对数值与 ATP 含量对数值($y = 1.07x - 0.55, R^2 = 0.99$); 菌数对数值和 ATP RLU 对数值($y = 1.14x + 0.33, R^2 = 0.99$), 都呈线性关系。不同 RLU 值推算的菌数理论值与实际值相比, 差异无统计学意义。稀释后血红蛋白对数值与 ATP RLU 对数值($y = 1.03x - 8.42, R^2 = 0.99$)亦呈线性关系。**结论** ATP 生物荧光检测技术可通过 ATP 值和 RLU 来判断细菌和蛋白含量, 从而判断医疗器械和物体表面的污染程度以及清洁、清洗效果, 是一种较好、较敏感的快速检测新方法。

[关键词] ATP; 生物荧光; ATP 生物荧光检测; 清洗; 感染控制

[中图分类号] R197.39 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)02-0081-05

Association study on adenosine triphosphate biofluorescence detection technology

YI Bin, LIU Jun, WANG Fang, TU Xian-chun, ZHAO Xiao-xiao, ZHAO Jiang-li (No 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective** To test the relation between adenosine triphosphate (ATP) biofluorescence detection technology and bacterial colony forming unit (CFU) and blood content. **Methods** *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 8099 and healthy controls' blood were diluted to the concentration of 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} , respectively, then lysate, luciferase and ATP standard substance were added, relative light unit (RLU) values were determined twice by fluorimeter, ATP contents(amol) were converted according to formula($\text{ATP content} = \frac{A_1}{A_2 - A_1} \times 10^6$); hemoglobin values were measured by hematology analyzer to reflect protein residue level. Curve demarcate standardization was made to show the relation between diluted bacteria, hemoglobin content and ATP content. **Results** Bacterial CFU and ATP content logarithm values ($y = 1.07x - 0.55, R^2 = 0.99$), bacterial CFU and ATP RLU logarithm values ($y = 1.14x + 0.33, R^2 = 0.99$) showed linear relationship respectively. There was no significant difference between the logical values figured out by different RLU values and the actual values. After hemodilution, hemoglobin and ATP RLU logarithm values also showed linear relationship ($y = 1.03x - 8.42, R^2 = 0.99$). **Conclusion** ATP biofluorescence detection technology can detect the content of bacteria and protein through ATP value and RLU, it can determine contamination degree and clean effect of medical equipments and object surface, it's a new, sensitive and rapid detection method.

[Key words] ATP; biofluorescence; ATP biofluorescence detection; clean; infection control

[Chin Infect Control, 2012, 11(2):81-85]

世界卫生组织(WHO)于 2005 年将医院感染控制的主题定为“Clean care is safe care”,在全球控

制医院感染的行动中,特别强调了医疗机构中清洁、清洗工作质量的重要作用。2007 年,我国卫生部也

[收稿日期] 2011-10-07

[作者简介] 易滨(1950-),女(汉族),河南省商城县人,主任技师,主要从事医院感染管理研究。

[通讯作者] 易滨 E-mail:yb309982@sina.com

加入此项行动,在近年下发的一系列医院感染管理法规中,对清洁和清洗工作的流程、标准及监测都提出了明确的要求^[1],使这项工作越来越引起医疗机构的领导和医务人员的重视,并不断得到加强。清洁、清洗工作在医疗机构中是最大量、最基础、最广泛、最经常的工作,但对其质量与效果的较好评价手段比较少。为了加强清洁、清洗工作质量的快速检测,我们对国家卫生部推荐的三磷酸腺苷(ATP)生物荧光检测技术进行了系统的基础和实用检测实验。本文将 ATP 生物荧光检测技术与菌落数和血液中血红蛋白含量的相关基础实验情况报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂 BioThema 生物荧光检测试剂盒(型号:266-112;检测精度:10⁻¹⁷ mol ATP);ATP 提取剂、酶和裂解液;ATP 标准品(液态 100 nmol/L),均为瑞典 BioThema 公司产品。另外,还有生理盐水、营养琼脂等。

1.1.2 主要仪器 BioTech 生物荧光快速检测系统(型号:BT-112D),北京创新世纪生化科技发展有限公司产品;移液枪、移液枪头及吸管;血细胞分析仪(日本希森美康生物科技有限公司生产的全自动血液分析仪 XS-800i)。

1.1.3 菌株 大肠埃希菌 ATCC 8099,由国家微生物菌种保存中心提供。

1.1.4 血标本 健康志愿者血液标本 3 份。

1.2 方 法

1.2.1 细菌菌落计数 取 37℃ 培养 18~24 h 的大肠埃希菌 ATCC 8099,以生理盐水洗菌,制成菌悬液,将菌悬液作系列梯度稀释:原液、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷;选择适宜稀释度试管(以预计生长菌落数每平皿 30~300 CFU 者为宜),吸取混合均匀的悬液 0.5 mL 涂抹接种于已做好的

营养琼脂平皿上。每一稀释度接种 2 个平皿,置 37℃ 培养 48 h,计数菌落数(平均值)。

1.2.2 ATP 生物荧光法相对发光值(RLU)测定及 ATP 含量的换算 取 1.2.1 中制备的菌悬液各 50 μL,加入无菌离心管中,再加入 50 μL 裂解液,混匀后室温下放置 5 min;加入 400 μL 酶,迅速混匀后立即用荧光光度计测定第 1 次 RLU 值(A1);再加入 10 μL ATP 标准品测定第 2 次 RLU 值(A2);按照公式(ATP 含量 = $\frac{A1}{A2-A1} \times 10^6$)最后换算成 ATP 含量(amol)。将各稀释度菌落计数值与 ATP 含量之间的关系进行曲线标定。

1.2.3 ATP 含量的稳定性试验 抽取 3 名健康志愿者血液标本各 5 mL,加入到含抗凝剂的试管中,用生理盐水作 10⁻⁵ 稀释,用血液细胞检测仪进行血红蛋白检测,所测结果分别是 118、115、88 g/L。依照 1.2.2 法进行 ATP 含量(amol)测算,每份样本重复做 10 次平行检测并计算平均值;将 10 次测得的 ATP 含量之间的关系进行曲线标定。

1.2.4 血红蛋白与 RLU 测定及 ATP 含量换算 抽取健康志愿者血液(血红蛋白 118 g/L)5 mL 加入含抗凝剂的试管中,按下列倍数用生理盐水进行稀释:10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸;按照 1.2.2 法进行 RLU 测定及 ATP 含量(amol)换算,同时用血液细胞分析仪分别测定各稀释度血红蛋白含量,以反映蛋白的残留量。将各稀释度血红蛋白含量与 ATP 含量之间的关系进行曲线标定。

1.2.5 统计分析 采用线性、相关性计算进行统计分析。

2 结 果

2.1 大肠埃希菌菌数对数值与 ATP 含量对数值以及 ATP RLU 对数值的关系 见表 1、图 1~2 以及表 2、图 3。ATP 含量的稳定性试验结果见表 3、图 4。

表 1 大肠埃希菌菌落计数值与 ATP 含量的对应关系

Table 1 Relation between *E. coli* CFU values and ATP contents

Sample No.	Bacterial concentration (CFU/mL)	Log (CFU/50 μL)	A1	A2	ATP (amol)	Log (amol)
1	2.94×10 ⁸	7.17	950 177	OUT OF LINE	OUT OF LINE	OUT OF LINE
2	2.43×10 ⁷	6.09	172 388	227 723	3 115 351.95	6.49
3	3.22×10 ⁶	5.21	16 201	109 365	173 897.64	5.24
4	2.92×10 ⁵	4.16	1 442	103 192	14 171.99	4.15
5	2.48×10 ⁴	3.09	229	98 252	2 336.19	3.37
6	2.32×10 ³	2.06	47	136 620	344.14	2.54
7	2.52×10 ²	1.10	5	101 110	49.45	1.69

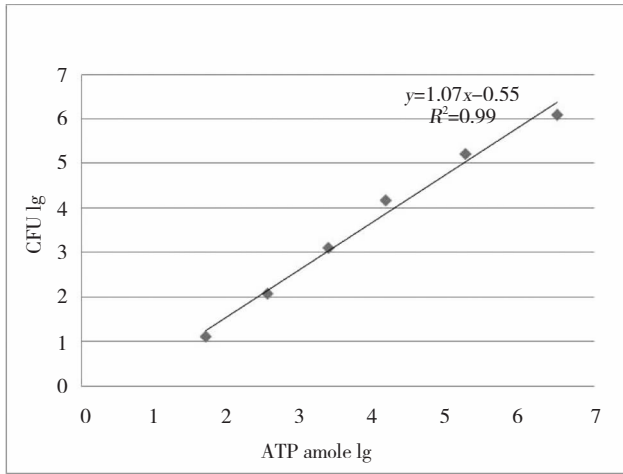


图 1 大肠埃希菌菌数对数值与 ATP 含量的线性关系

Figure 1 Linear relation between lg of *E. coli* CFU and ATP content

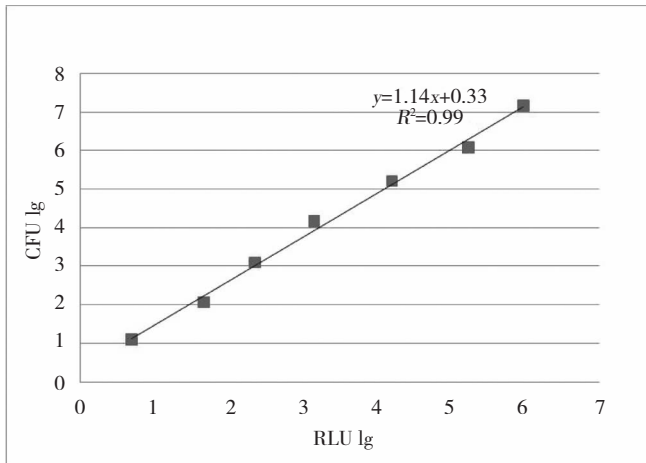


图 2 大肠埃希菌菌数对数值与 RLU 的线性关系

Figure 2 Linear relation between lg of *E. coli* CFU and RLU

表 2 实测发光值推算理论菌落数与实际菌落数的对应关系

Table 2 Logical values of *E. coli* CFU figured out by different RLU values and actual values

Bacterial concentration (CFU/mL)	Colony forming unit (CFU/50 μ L)	Log (CFU/50 μ L)	A1	CFU lg	Logical value of CFU
2.94×10^8	1.47×10^7	7.17	842 262	7.08	1.20×10^7
2.94×10^7	1.47×10^6	6.17	129 617	6.15	1.43×10^6
2.94×10^6	1.47×10^5	5.17	14 094	5.06	1.14×10^5
2.94×10^5	1.47×10^4	4.17	1 165	3.83	6.69×10^3
2.94×10^4	1.47×10^3	3.17	110	2.66	4.56×10^2
2.94×10^3	1.47×10^2	2.17	21	1.84	6.92×10^1
2.94×10^2	1.47×10^1	1.17	3	0.88	7.55×10^0

2.2 各稀释度血液血红蛋白与 ATP 含量及 RLU 之间的关系 见表 4、图 5~6(由于 ATP 检测灵敏度很高,原血以及-1 稀释度的血液中 ATP 含量过

大,超出反应体系,因此制图时未采用以上两点的数

据)。

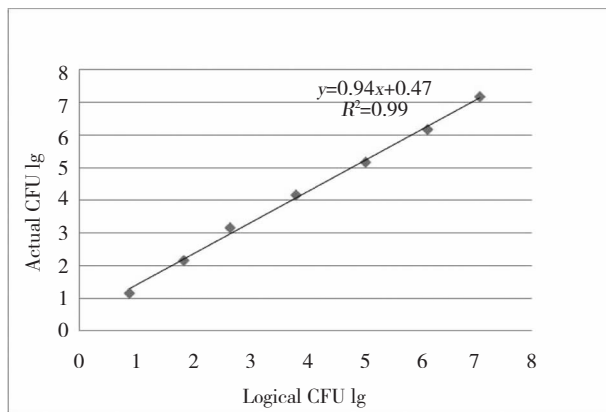


图 3 通过 ATP 推算理论菌落数与实际菌落数的线性关系

Figure 3 Linear relation between logical values of *E. coli* CFU figured out by ATP and actual values

表 3 血液 ATP 稳定性试验结果

Table 3 Blood ATP stability testing result

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average
Spl 1(118 g/L)	38 907	36 585	37 416	43 605	41 190	45 662	42 221	44 399	42 589	44 360	41 693. 4
Spl 2(115 g/L)	29 478	30 584	26 640	27 593	27 377	30 221	27 528	27 105	29 253	29 720	28 549. 9
Spl 3(88 g/L)	17 570	18 665	17 747	16 037	17 919	18 050	16 600	17 645	17 681	15 806	17 372

Dilute the volunteers' blood to 10^{-5} , repeat test 10 times.

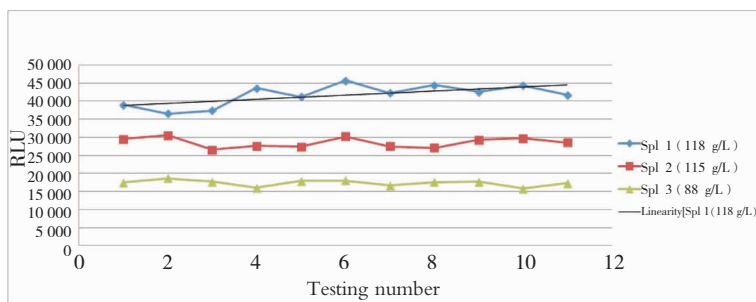


图 4 血液 ATP 检测稳定性试验

Figure 4 Blood ATP stability testing result

表 4 不同血液稀释度血红蛋白与 RLU 之间的对应关系

Table 4 Relation between different dilution of hemoglobin and RLU

Dilution of Sample	Protein residue of sample 63 (mg/50 μ L)	Lg value of protein residue of sample 63 (mg/50 μ L)	Lg value of RLU	Protein residue of sampte 64 (mg/50 μ L)	Lg value of protein residue of sample 64 (mg/50 μ L)	Lg value of RLU
Non-diluted	6. 1	0. 79	7. 25	6. 6	0. 82	7. 25
- 1	$6. 1 \times 10^{-1}$	- 0. 21	7. 25	$6. 6 \times 10^{-1}$	- 0. 18	7. 25
- 2	$6. 1 \times 10^{-2}$	- 1. 21	6. 82	$6. 6 \times 10^{-2}$	- 1. 18	7. 01
- 3	$6. 1 \times 10^{-3}$	- 2. 21	6. 06	$6. 6 \times 10^{-3}$	- 2. 18	6. 19
- 4	$6. 1 \times 10^{-4}$	- 3. 21	5. 14	$6. 6 \times 10^{-4}$	- 3. 18	5. 37
- 5	$6. 1 \times 10^{-5}$	- 4. 21	4. 13	$6. 6 \times 10^{-5}$	- 4. 18	4. 49
- 6	$6. 1 \times 10^{-6}$	- 5. 21	3. 18	$6. 6 \times 10^{-6}$	- 5. 18	3. 47
- 7	$6. 1 \times 10^{-7}$	- 6. 21	2. 16	$6. 6 \times 10^{-7}$	- 6. 18	2. 11
- 8	$6. 1 \times 10^{-8}$	- 7. 21	1. 04	$6. 6 \times 10^{-8}$	- 7. 18	1. 61

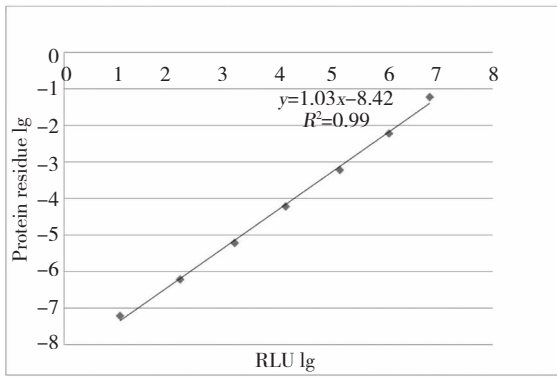


图5 63号样品血红蛋白残留量与ATP相对发光值对数关系
Figure 5 Relation between sample 63 hemoglobin residue levels and ATP RLU lg values

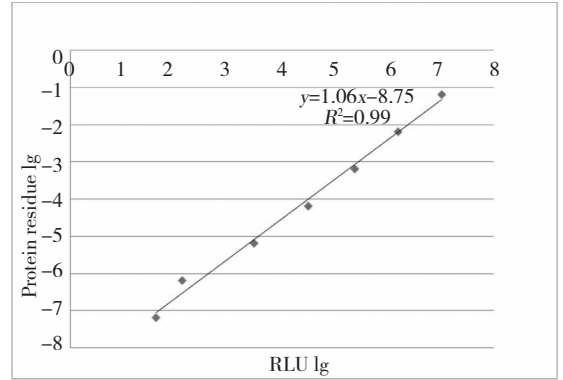


图6 64号样品血红蛋白残留量与ATP相对发光值对数关系
Figure 6 Relation between sample 64 of hemoglobin residue levels and ATP RLU lg values

(The ATP detection was highly sensitive, the concentration of ATP in the blood without dilution and with 10^{-1} dilution were too high, and out of reaction range, so these two concentrations weren't shown in figure 5 and figure 6.)

3 讨论

ATP存在于所有有机体中,包括微生物。它的存在可以认定有微生物污染以及有食物饮料或体液等可供微生物滋生条件的存在^[2]。ATP生物荧光检测技术是通过细胞内ATP与荧光素酶反应发光原理,通过光照值的测量,从而达到监控被测物微生物污染和有机物(如血液、体液、分泌物、引流物等)残留的程度。本研究通过采用大肠埃希菌 ATCC 8099 标准菌株,由 10^{-1} 依次稀释至 10^{-7} ,大肠埃希菌菌数对数值与ATP含量对数值($y = 1.07x - 0.55, R^2 = 0.99$);菌数对数值和ATP RLU对数值($y = 1.14x + 0.33, R^2 = 0.99$);实测发光值推算理论菌落数与实际菌落数的对应关系($y = 0.94x + 0.47, R^2 = 0.99$),都呈线性关系。血液ATP检测稳定性试验中,10次测得的ATP含量之间的关系,经统计分析表明,差异无统计学意义。血红蛋白检测试验中,将血液稀释至 $10^{-2} \sim 10^{-8}$ 范围时,取 $50 \mu\text{L}$ 样品,血红蛋白的范围为 $6.1 \times 10^{-2} \sim 6.1 \times 10^{-8} \text{ mg}$ 。血红蛋白对数值与Biotech生物荧光快速检测系统测得的ATP RLU对数值($y = 1.03x - 8.42, R^2 = 0.99$)也呈线性关系。通过3个基础实

验表明,ATP生物荧光检测技术检测微生物和血液有机物,有很好的灵敏度、稳定性和相关性,比肉眼直观法、棉拭子采样细菌培养法、潜血实验等要全面、简单、快速、直观、准确。可用于医疗机构医疗器械、内镜和呼吸机管路等清洗后微生物含量和蛋白残留的检测^[3]。是近年来发展的物体表面及医疗器械清洁、清洗效果快速检测的一种好方法^[4]。下一步,我们将用于对医疗器械的实用清洗效果的检测实验。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部. 卫生行业标准 WS 310.2 医院消毒供应中心·第2部分:清洗消毒及灭菌技术操作规范[S]. 北京, 2009.
[2] Holah J. Effective microbiological sampling of food processing environments[S]. Chipping Campden; Campden and Chorleywood Food Research Association, 1999.
[3] 张流波. 医疗器械清洗效果评价方法进展[J]. 中国护理管理, 2007, 7(2): 15.
[4] 邢书霞, 马玲, 张伟, 等. 4种医疗器械清洗效果评价方法的比较[J]. 中国消毒学杂志, 2009, 26(1): 28-30.