

• 基础研究 •

ATP 生物荧光法在一次性卫生用品抗菌性能检测上的可行性研究

福州海关技术中心 福建省检验检疫技术研究重点实验室 (福州 350003) 彭华毅 陈 彬 林 杰 曾维扬
徐 珊 柯 璐

【摘 要】 目的 建立一次性卫生用品抗菌性能的 ATP 快速检测方法。**方法** 以大肠杆菌 (ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、白色念珠菌 (ATCC 10231) 3 个标准菌株为目标菌种, 利用 ATP 生物荧光法对一次性使用卫生用品的抗菌性能进行测试, 并与传统菌落计数法进行比较。项目进行以下验证性研究: 1) 菌落计数法与 ATP 生物荧光法相关性比较; 2) 抗菌性能试验的准确度验证; 3) ATP 生物荧光法的精密性验证。**结果** 1) 3 个标准菌株菌悬液采用传统平板法检出菌落的对数值与 ATP 读数的对数值之间呈线性关系, 相关系数 R^2 均大于 0.95; ATP 法适用的浓度检测范围为 $0 \sim 10^6$ CFU/mL。2) ATP 法检测与平板计数法相比, 杀菌率有所降低, 随着接触杀菌时间的延长, 偏离度明显减小。3) ATP 法检测 3 个标准菌株不同浓度的菌悬液和染菌空白样片, 其相对标准偏差 (RSD) 均小于 35%, 属于可接受范围。**结论** ATP 生物荧光法适用于检测一次性卫生用品的抗菌性能, 可以满足快速检测的需求。

【关键词】 ATP 生物荧光法; 菌落计数; 抗菌性能; 替代实验

【中图分类号】 R187 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)01-0135-03

ATP 普遍存在于细菌等微生物细胞内, 是新陈代谢的能量物质。ATP 生物发光法是利用 ATP 试剂中如荧光素-荧光素酶等组分与被测样本反应, 再用荧光检测仪来检测发光值, 由于被测样本所含细菌等微生物的数量与所含的 ATP 值之间存在一定的函数关系, 因此能间接得到被测标本所含细菌等微生物含量^[1]。美国多个专业权威机构研究了 1 000 个以上的样品, 这种只需十几秒就能完成检测的快速检测法所得实验结果 90% 以上与 24~48 h 标准细菌培养法/平皿法所得结果一致。由日本纤维制品新功能评估协会 (JAFET) 提交的工业标准 JIS L 1902: 2002 “纺织品的抗菌性能试验方法”^[2] 以及由此基础修订提交的 ISO 20743-2007 “抗菌整理纺织品的抗菌性能测定”中就提到了用 ATP 生物荧光法替代传统方法。中国 CDC 研究证实, ATP 检测结果与不同浓度的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌成直线相关。因此, 完全可以通过比较研究, 最终将 ATP 用于一次性卫生用品的抗菌性能快速检测。目前一次性使用卫生用品抗菌性能的定量测试方法是将菌种培养后计数^[3], 以减少率作为判定指标, 并无使用 ATP 进行快速检测的研究。由于菌种培养周期长^[4], 使得抗菌性能检测周期也相应较长。为达到快速检测的目的, 本项目拟通过 ATP 生物荧光法进行菌种接种后检测, 与传统方法得到的减少率进行比较, 以实现一次性卫生用品的快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂: 以下 3 种标准菌株由本实验室提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922, 购自上海汉学贸易有限公司, 质控菌种保存档案号: BJ013; 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538, 福州抗菌素厂进口, 质控菌种保存档案号: BJ028; 白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC 10231, 福州抗菌素厂进口, 质控菌种保存档案号: BJ029。营养琼脂、乳糖胆盐发酵管、伊红美蓝琼

脂 EMB、SCDLP 液体培养基、营养肉汤培养液均购自北京陆桥技术股份有限公司; 乳糖发酵管、沙氏琼脂培养基、血琼脂平板、Baird-Parker 培养基 (BP 平板) 均购自广东环凯微生物科技有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、蔗糖等均为分析纯, 购自上海试一化学试剂有限公司。检测试剂盒: Ultrasnap ATP test 测试拭子及试剂、Cat. No. US2020、Lot00813 购自美国 Hygiena 公司。测试样本: 共收集市场上流通具有抗菌性能的一次性卫生用品 10 份, 其中湿巾 6 份, 卫生巾 4 份。

1.2 仪器与设备: SystemSURE PLUS ATP 荧光仪 (美国 Hygiena 公司); AL204 精密分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; BOX389 微生物鉴定仪配套麦氏比浊仪 (HACH COMPANY 公司); MU-425-400E 二级生物安全柜 (美国 NUAIRE 公司); BD115 微生物培养箱 (德国 BINDER 公司); PYX-250M-CII 霉菌培养箱 (科力实验仪器有限公司); M37610-33 振荡器 (金华雷琪实验器材有限公司); SHKE4450 台式恒温振荡器 (美国 Thermo 公司); MPR-414F 冷藏冷冻箱 (日本 SANYO 公司)。

1.3 方法:

1.3.1 菌落计数法与 ATP 生物荧光法相关性比较: 制备大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、白色念珠菌 ATCC 10231 这 3 个标准菌株的菌悬液, 分别用传统平板培养法^[5-7]与 ATP 生物荧光法进行检测 (每株试验菌选择 5 个浓度, 每个浓度测定 5 次)。根据以上实验数据, 以 ATP 荧光读数的对数值为因变量, 以菌落计数的对数值为自变量进行线性回归分析, 计算相关系数 R^2 。同时检验方法适用的高低限浓度范围。

1.3.2 抗菌性能试验的准确度验证: 选择 10 份不同的一次性卫生用品样品, 使用上述 3 个标准菌株, 按 GB 15979-2002 附录 C 中的试验要求进行一次性使用卫生用品抗菌性

能试验。进行杀菌性能测试前,先进行中和剂鉴定试验。杀菌性能测试同时做菌落计数法与 ATP 生物荧光法,每个试验重复 3 次,对试验结果进行准确度确认。

1.3.3 ATP 生物荧光法的精密度验证:选择 ATCC 25922、ATCC 6538、ATCC 10231 这 3 个标准菌株至少 5 个浓度的菌悬液进行 ATP 生物荧光法检测,同时将 100 μ L 不同浓度的菌悬液滴加于相同大小灭菌空白样片上,进行 ATP 生物荧光法检测,每个试验重复 10 次,对试验结果进行精密度确认。一般情况下,可以接受的相对标准偏差(RSD)应不大于 35%。

2 结果

2.1 菌落计数法与 ATP 生物荧光法相关性比较:1) 大肠杆菌 ATCC 25922 菌悬液检测结果:大肠杆菌检出菌落的对数值与 ATP 读数的对数值之间呈线性关系。回归方程为: $y=0.5739x-0.0951$, $R^2=0.9712$ 。2) 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 菌悬液检测结果:金黄色葡萄球菌检出菌落的对数值与 ATP 读数的对数值之间也呈线性关系。回归方程为: $y=0.5747x-0.1288$, $R^2=0.9791$ 。3) 白色念珠菌 ATCC 10231 菌悬液检测结果:白色念珠菌检出菌落的对数值与 ATP 读数的对数值之间同样呈线性关系。回归方程为: $y=0.5747x-0.1288$, $R^2=0.9791$ 。当活菌浓度 $\geq 10^7$ CFU/mL 时,超过 ATP 荧光计检测范围,不能正确读取数值。即 ATP 法适用的浓度检测范围为 $0\sim 10^6$ CFU/mL。

2.2 抗菌性能试验的准确度验证:含 0.5% 卵磷脂+5% 吐温 80 的 PBS 可有效中和样品(主要抗菌材料为 0.1% 苯扎氯铵)对大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、白色念珠菌 ATCC 10231 的杀灭作用,且中和剂及中和产物对试验菌生长无明显影响。10 份不同的一次性卫生用品样品,菌落计数法与 ATP 荧光法试验结果见表 1。

表 1 ATP 法与平板法检测抗菌性能偏移率
($n=10, \%, \bar{x} \pm s$)

时间	大肠杆菌 ATCC 25922	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538	白色念珠菌 ATCC 10231
2 min	15.56 \pm 0.64	15.58 \pm 0.69	11.54 \pm 0.93
5 min	12.61 \pm 0.62	8.71 \pm 0.72	8.54 \pm 0.76
10 min	3.88 \pm 0.69	2.24 \pm 0.54	4.13 \pm 0.49
20 min	0.54 \pm 0.19	0.88 \pm 0.25	1.72 \pm 0.39

6 份湿巾、4 份卫生巾对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的杀菌率分别用平板法和 ATP 法进行检测,结果显示 ATP 生物荧光法检测与平板计数法相比,杀菌率有所降低。由表 1 可见,平均偏离率在 0.5%~16%,且随着接触杀菌材料时间的延长,偏离度明显减小^[8]。

2.3 ATP 生物荧光法的精密度验证:选择 ATCC 25922、ATCC 6538、ATCC 10231 这 3 个标准菌株 5 个浓度的菌悬液和染菌空白样片进行 ATP 生物荧光法检测,重复 10 次,

试验结果见表 2~7。

表 2 ATP 法检测大肠杆菌不同浓度梯度菌悬液
($n=10, \bar{x} \pm s$)

菌悬液浓度	ATP 荧光值/RLU	RSD/%
10^5 CFU/mL	683.7 \pm 12.9	1.9
10^4 CFU/mL	242.4 \pm 10.3	4.3
10^3 CFU/mL	70.5 \pm 5.1	7.2
10^2 CFU/mL	34.6 \pm 3.5	10.2
10^1 CFU/mL	11.2 \pm 1.0	9.2

注:RLU 为相对光单位。

表 3 ATP 法检测金黄色葡萄球菌不同浓度梯度菌悬液
($n=10, \bar{x} \pm s$)

菌悬液浓度	ATP 荧光值/RLU	RSD/%
10^5 CFU/mL	726.6 \pm 13.3	1.8
10^4 CFU/mL	340.6 \pm 12.4	3.7
10^3 CFU/mL	71.0 \pm 6.3	8.9
10^2 CFU/mL	25.6 \pm 3.1	12.1
10^1 CFU/mL	10.9 \pm 1.4	12.6

表 4 ATP 法检测白色念珠菌不同浓度梯度菌悬液
($n=10, \bar{x} \pm s$)

菌悬液浓度	ATP 荧光值/RLU	RSD/%
10^5 CFU/mL	558.6 \pm 15.1	2.7
10^4 CFU/mL	215.2 \pm 11.0	5.1
10^3 CFU/mL	56.6 \pm 4.5	8
10^2 CFU/mL	23.3 \pm 3.2	13.7
10^1 CFU/mL	10.3 \pm 1.3	13

表 5 ATP 法检测大肠杆菌不同浓度梯度染菌空白片
($n=10, \bar{x} \pm s$)

染菌空白片回收菌数	ATP 荧光值/RLU	RSD/%
10^4 CFU/片	248.3 \pm 17.7	7.1
10^3 CFU/片	69.9 \pm 7.3	10.4
10^2 CFU/片	33.4 \pm 5.2	15.5
10^1 CFU/片	11.9 \pm 2.2	18.8
10^0 CFU/片	1.9 \pm 0.6	29.9

表 6 ATP 法检测金黄色葡萄球菌不同浓度梯度染菌空白片
($n=10, \bar{x} \pm s$)

染菌空白片回收菌数	ATP 荧光值/RLU	RSD/%
10^4 CFU/片	343.5 \pm 14.5	4.2
10^3 CFU/片	73.3 \pm 9.1	12.4
10^2 CFU/片	27.2 \pm 5.5	20.1
10^1 CFU/片	12.1 \pm 2.5	20.4
10^0 CFU/片	1.6 \pm 0.5	32.3

表 7 ATP 法检测白色念珠菌不同浓度梯度染菌空白片
($n=10, \bar{x} \pm s$)

染菌空白片回收菌数	ATP 荧光值/RLU	RSD/%
10^4 CFU/片	215.7 ± 11.7	5.4
10^3 CFU/片	56.9 ± 5.5	9.7
10^2 CFU/片	22.1 ± 3.3	15.2
10^1 CFU/片	9.8 ± 1.8	17.9
10^0 CFU/片	1.1 ± 0.3	28.7

由表 2~7 可见, ATP 生物荧光法检测 3 个标准菌株不同浓度的菌悬液和染菌空白样片, 其 RSD 均小于 35%, 属于可接受范围。相同浓度梯度下, 菌悬液的 ATP 检测值 RSD 较染菌样片的 ATP 值更小。随着含菌浓度的下降, RSD 有上升趋势^[9]。

3 讨论

ATP 检测法用于抗菌性能的检测, 其原理与传统菌落计数法一样, 是根据抗菌试样与菌悬液不同接触时间同对照染菌空白样的比值。在试验中, ATP 生物荧光法检测与平板计数法相比, 杀菌率有所降低, 可能是由于细菌被抗菌剂苯扎氯铵(表面活性剂)杀灭后残存的 ATP 干扰所致。相同浓度梯度下, 染菌样片的 ATP 检测值相对标准偏差 RSD 较菌悬液大, 可能是由于染菌样片上滴加菌液不够均匀, 或是 ATP 拭子涂抹程度无法达到一致造成的误差。随着含菌浓度的下降, RSD 有上升趋势, 提示这种情况在含菌量稀少的情况下更易发生。

传统的菌落计数法采用平板培养方式, 存在检测周期长(48 h 以上, 酵母菌需要 72 h 以上)^[10-11]、操作繁琐、工作量大等问题。随着具有抗菌性能的一次性卫生用品的市场占有率逐渐上升, 如何对其抗菌性能进行快速检验, 减轻检测人员的负担, 提高工作效率, 近年来已有不少研究人员提出诸如电阻抗法、流式细胞术、自动免疫技术、生物荧光法等新的快速检测方法^[12]。其中 ATP 检测法作为生物荧光法的一种, 得到越来越多的认可, 是最有望实现即时检测细菌总数的快速方法^[13]。其测试时间短, 时效性高, 操作简便。卫生部已将其作为食品卫生和消毒情况的快速检测手段。但是, 由于自然界 ATP 广泛存在于生物体中, 对于食品表面、手部消毒等, 均存在其他细胞或残渣干扰现象。一次性卫生用品本身不具有 ATP 干扰情况, 而且按 GB 15979-2002 附录 C 中的试验要求, 抗菌性能试验主要检测的是抗菌材料影

响下染菌程度的比值, 对于传统菌落计数值与具体 ATP 荧光值的对应没有太直接的要求, 因此 ATP 快速检测法应用于一次性卫生用品的抗菌性能检测正是理想之选^[14]。

参考文献

- [1] 易滨, 刘军, 王芳, 等. ATP 生物荧光检测技术相关性基础研究 [J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11 (2): 81-85.
- [2] Japanese Industrial Standards Committee Standards Board. JIS L 1902: 2008 Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products [S]. Tokyo: Japanese Standards Association, 2008.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局. GB 15979-2002 一次性使用卫生用品卫生标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 2-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 38-2012 食品安全国家标准食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 10-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 15-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验 霉菌和酵母计数 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL02 能力验证结果的统计处理和评价指南 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [9] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL03 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [10] 王志惠. 纺织品抗菌性能评价方法的研究与改进 [D]. 上海: 东华大学, 2015.
- [11] 董素梅. 鞋材抗菌防霉性能检测方法的研究与改进 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2012.
- [12] 罗金平, 田青, 岳伟伟, 等. 快速检测细菌总数的便携式生物荧光传感器 [J]. 分析化学, 2009, 37 (2): 306-310.
- [13] 陆焯, 胡国庆, 陆龙喜, 等. ATP 生物荧光技术快速测定细菌总数的应用研究 [J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30 (7): 613-618.
- [14] 史利克, 王悦, 刘燕, 等. ATP 生物荧光法检测染菌量的可行性研究 [J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31 (9): 926-928.