



出自第34届日本环境感染学会大会、学术集会
“新一代ATP检测法的实践应用~面向所有对卫生有要求的场所~”

有效利用ATP荧光检测评估消化道内窥镜的清洁度 ~验证ATP+ADP+AMP涂抹检测（A3法）的有效性~

社会医疗法人生长会 府中医院 质量管理中心
感染防控室 高橋 陽一

日本环境感染学会第34届大会及学术集会于2019年2月22日在神户国际展览馆·神户国际会议厅·神户波多比亚酒店召开。本文为大会第二日(23日),学会与龟甲万百欧凯米发株式会社联合举办的研讨会中,府中医院感染防控室的高橋陽一先生(国家认可的感染防控专家、消化道内窥镜工程师)以“真的清洗干净了吗?有效利用ATP荧光检测评估消化道内窥镜的清洁度”为题所进行的演讲内容要旨。

演讲者高橋先生目前拥有感染防控专家、消化道内窥镜工程师等资格,作为一名内窥镜与感染防控双领域的专家,高橋先生不仅从事医院的工作,同时也积极活跃于演讲和写作等活动中。现在,高橋先生还担任日本消化道内窥镜医师会副会长等职务。

另外,研讨会主席由弘前大学医学部附属医院感染防控中心主任萱場広之先生担任。在美国爆发抗碳青霉烯类肠杆菌(CRE)疫情时,萱場先生作为日本环境感染学会多重耐药菌感染防控委员会的一员,参与撰写总结了整体控制多重耐药革兰氏阴性菌的普遍共识的“立场文件”。他是院内感染对策等领域的一流专家,同时还十分了解ATP荧光检测在内窥镜清洁度管理中的实用性,因而被特别邀请为本次会议的主席。



府中医院感染防控室的高橋陽一先生



研讨会主席由弘前大学医学部附属医院感染防控中心主任萱場広之先生担任



230名听众参与了位于神户国际会议厅的研讨会,盛况空前



高橋先生与国立国际医疗研究中心的黑須一見女士(左)在研讨会上发表演讲

前言

(1) 检查内窥镜清洁度的重要性

2015年,美国食品药品监督管理局(FDA)爆发了抗碳青霉烯类肠杆菌感染病(CRE;Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae),7人确诊感染克雷伯菌属和大肠杆菌(疑似感染病例179人),其中2人死亡。日本厚生劳动省等机构也以此为契机,向广大市民发出警告。引起该事件的原因估计是清洗后的十二指肠内镜中残留的微生物发生传播,引起感染所致。使用后的内窥镜清洗,是感染防控中极其重要的项目。

一般来说,美国使用的是照片1左侧的这种在先端部拥有拾钳器款式的十二指肠内窥镜。由于其结构复杂,如果未彻底清洗、消毒,便很可能造成微生物残留。另一方面,日本使用的十二指肠内窥镜通常具有可拆卸的先端帽,且呈可刷洗形状,相较于美国的十二指肠内窥镜更易清洗(照片1右侧)。但是,由于钳道难以清洗,在使用清洗剂进行充分清洗等操作时必须十分注意。

(2) 利用ATP检测检查内窥镜清洁度的意义及背景

针对CRE爆发,厚生劳动省为防止多重耐药细菌传播,提出“再生处理必须遵守相关学会制定的指南以及附加文件、说明书等资料规定方法”、“由于拾钳器所在前端构造复杂,清洗时要先卸下前端帽,再使用专用洗刷仔细清洗”等内容,强调应该彻底清洗内窥镜。另外,日本消化道内窥镜医师会建议“将检测ATP(三磷酸腺苷)等物质作为清洁度的评价指标”、“每年一次,对随机抽选的内窥镜、内窥镜附件表面以及钳道等器材进行培养检测”等作为防止多重耐药细菌传播的具体防控方法。

ATP是所有生物所必备的能量来源。ATP荧光检测(以下称为ATP检测)是一种以ATP为指标,迅速、简易地检测环境清洁度的涂抹检测法。因此,ATP、ATP在加热或pH条件、酶促反应等情况下变化产生的物质ADP(二磷酸腺苷)以及AMP(一磷酸腺苷)的存在,表明生物或其痕迹的存在,是检测环境中生物来源污染物残留的指标。

在医疗领域上,ATP检测能有效运用于手部卫生与环境检测、内窥镜室、ME室、透析室、中心供应室、牙科、厨房等各种场所的卫生管理(图1)。与只能检测ATP的传统检测法相比,这种可以同时检测ATP、ADP、AMP的检测法(以下称为A3法)能够进行更灵敏的检测,作为一种支持更严格的卫生管理与感染防控的工具而备受期待。本文将为大家介绍使用A3法能否有效确认清洗后的内窥镜的清洁度。



【美国】先端部拥有拾钳器。结构复杂,如果未彻底清洗、消毒,便很可能造成微生物残留。
【日本】具有可拆卸的先端帽,可刷洗。较美国的十二指肠内窥镜更易清洗。

照片1 日美十二指肠内窥镜构造的差异



图1 医疗领域中ATP荧光检测的有效运用事例

人工清洗消化道内窥镜后的清洁度评估 ~检验A3法的有效性~

(1) 清洁度的评估、判定方法

日本医疗器械学会制定的《清洗评估判定指南》(2012年8月修订)中,列举出了目视、色素染色、涂抹法、提取法等一系列清洁度的判定方法(表1)。但是,无论哪种方法都有利有弊。例如,目视法纵然方便,却容易因个人原因导致结果的差异,而且器材上也可能存在不可视的污染残留。色素染色的操作也很方便,但不利于检查钳道等内部构造的清洁度。提取法虽然可以获得正确的定量值,但操作复杂且需要专用仪器,有些场所很难引入使用。因此,很多场所都选择引入ATP检测等迅速、简易的涂抹检测法。

另外,龟甲万百欧凯米发株式会社建议将100RLU暂定为ATP检测人工清洗后的内窥镜的管理基准值(表2)。

(2) 检验方法

府中医院使用A3法对清洗后的内窥镜进行清洁度评估。评估的主要方法如下。

判定方法	试验方法、试剂	指标物质	特征
目视	目测	蛋白质、多糖类、脂质、药物	方便但容易因个人原因导致结果的差异难以量化
色素染色	氨基黑10B	蛋白质	容易获得定性值和可获得（半）定量值
涂抹	棉球附着物的化学反应	蛋白质	容易获得（半）定量值 可获得（半）定量值
	生物学发光法	三磷酸腺苷	
提取	CBB法	蛋白质	可获得准确定量值 但操作复杂且需要试剂与仪器
	OPA法		
	BCA法		

表1 清洁度的评估、判定方法
(日本医疗器械学会《清洗评估判定指南》)

①检测对象

•20支直窥镜(10支上消化道内窥镜, 10支下消化道内窥镜)

•20支侧窥镜

②清洗方法

按照《清洗评估判定指南》依次按照以下3个步骤来清洗内窥镜①床旁清洗→②在清洗室中清洗→③使用全自动内窥镜清洗消毒机清洗(照片2)。

③检测方法

【直窥镜】首先使用长轴棉棒“LuciSwab ES”涂抹钳道, 进行ATP检测。接着, 用新的“LuciSwab ES”涂抹另一支内窥镜的钳道, 在蒸馏水中搅拌配制出检测溶液, 然后进行微生物检测。

【侧窥镜】使用冲洗法回收注液道中的液体后, 分别进行A3法与微生物检测(照片3)。之后, 抬钳器内外侧都使用A3法进行涂抹检测。

(3) 检验结果

【直窥镜】直窥镜的A3法检测结果如表3与图2所示。上消化道内窥镜的平均值为61RLU, 下消化道内窥镜的平均值为12RLU, 整体中间值为24RLU(最大值:442RLU, 最小值:10RLU), 平均值与中间值通过管理基准值(100RLU)。

表3中蓝色部分为上消化道内窥镜, 红色部分为下消化道内窥镜, 可见下消化道内窥镜的RLU值更低。这很可能是因为上消化道内窥镜是用于观察胃的内部等粘性强

检测部位	管理基准值 (RLU)	回收方法
钳道	暂定100	涂抹棉棒可以插入的范围。转动棉棒的同时, 仔细涂抹整个管道。
吸引管		
送气送水管		
消化道内窥镜先端		仔细涂抹镜头和消化道内窥镜前端至外侧1cm左右的全部位置。
钳道内部 (使用LuciSwab ES/LuciPac)		- 从出钳口插入涂抹 - 从消化道内窥镜前端插入涂抹

表2 消化道内窥镜的ATP荧光检测建议基准值

且容易黏附污垢(黏附难以去除的污垢)的位置。

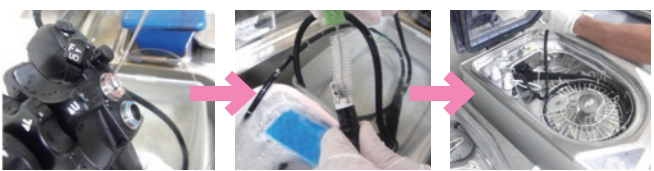
在微生物检测结果方面, 20支直视镜中有1支检测出芽孢杆菌(2CFU/mL), 其他19支的检测结果皆为0CFU/mL(表4)。

【侧窥镜】侧窥镜的A3法与微生物检测结果如表5与图3所示。根据A3法结果, 抬钳器的中间值为90RLU(最大值:2947RLU, 最小值:20RLU), 注液道的检测值为37RLU(最大值:703RLU, 最小值:2RLU), 中间值通过了管理基准值(100RLU)。

微生物检测结果中, 20支侧窥镜中有17支为阳性, 中间值为138CFU/mL。另外, 微生物检测中结果为阳性的注液道经过乙酸高水平消毒后, 检测值皆降为0CFU/mL。

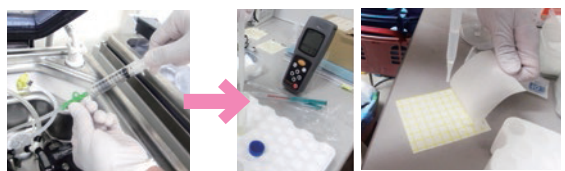


内窥镜专用检测棒LuciSwab ES



照片2 清洗顺序

(①床旁清洗→②在清洗室中清洗→③使用全自动内窥镜清洗消毒机清洗)



照片3 对冲洗法回收到的液体进行A3法和微生物检测

No	操作日期	机械型号	管径	A3
1	6月25日	GIF-H290	2.8	56
2	6月27日	GIF-H290	2.8	41
3	6月28日	GIF-H290	2.8	22
4	6月28日	CF-H290ZI	3.2	10
5	6月29日	GIF-H290	2.8	442
6	6月29日	GIF-H290	2.8	25
7	6月29日	GIF-H290	2.8	250
8	6月29日	GIF-H290Z	2.8	40
9	6月29日	GIF-H290Z	2.8	66
10	6月29日	GIF-H290	2.8	84
11	6月29日	GIF-H290	2.8	311
12	6月29日	PCF-H290ZI	3.2	11
13	6月29日	PCF-H290I	3.2	12
14	6月29日	PCF-H290ZI	3.2	11
15	6月29日	CF-HQ290I	3.7	12
16	6月29日	PCF-H290ZI	3.2	21
17	6月29日	CF-HQ290I	3.7	10
18	6月29日	PCF-H290ZI	3.2	13
19	6月29日	PCF-H290ZI	3.2	14
20	6月29日	PCF-H290ZI	3.2	32

表 3
直窥镜的A3法检测结果①

上消化道内窥镜
中间值: 61RLU

下消化道内窥镜
中间值: 12RLU
中间值: 23.5RLU

No	操作日期	机械型号	管径	CFU/mL
1	6月25日	GIF-H290	2.8	0
2	6月27日	GIF-H290	2.8	0
3	6月28日	GIF-H290	2.8	0
4	6月28日	PCF-H290ZI	3.2	0
5	6月28日	GIF-H290	2.8	0
6	6月30日	GIF-H290	2.8	0
7	6月30日	GIF-H290	2.8	0
8	6月30日	GIF-H290Z	2.8	0
9	7月2日	GIF-H290	2.8	0
10	7月2日	GIF-H290	2.8	0
11	7月2日	GIF-H290	2.8	0
12	7月4日	GIF-H290	2.8	0
13	7月4日	GIF-H290	2.8	0
14	7月4日	GIF-H290	2.8	0
15	7月4日	GIF-H290	2.8	0
16	7月4日	PCF-H290ZI	3.2	2 (※)
17	7月4日	PCF-H290ZI	3.2	0
18	7月4日	CF-HQ290I	3.7	0
19	7月4日	PCF-H290ZI	3.2	0
20	7月4日	PCF-H290ZI	3.2	0

表 4 直窥镜的微生物检测结果

上消化道内窥镜

下消化道内窥镜

No	操作日期	机械型号	拾钳器 (A3)	注液道 (A3法)	培养	鉴定检测
1	6月27日	JF-260V	46	32	>250	GNR • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	7月4日	JF-260V	169	94	>250	GPR • <i>Bacillus</i> sp GNR • <i>Citrobacter amalonaticus</i> GNR • <i>Enterobacter aerogenes</i>
3	7月5日	JF-260V	205	65	2	GPC • <i>Streptococcus</i> sp
4	7月9日	JF-260V	1947	703	6	GNR • <i>Enterobacter cloacae</i>
5	7月10日	JF-260V	159	51	>250	GNR • <i>Enterobacter cloacae</i>
6	7月10日	JF-260V	58	20	>250	GNR • <i>Klebsiella pneumoniae</i> GNR • <i>Escherichia coli</i>
7	7月12日	JF-260V	170	112	>250	GPC • <i>Streptococcus</i> sp GPR • <i>Bacillus</i> sp
8	7月17日	JF-260V	115	100	31	GPC • <i>Streptococcus viridans</i> group GPC • <i>Streptococcus</i> sp
9	7月18日	JF-260V	62	41	116	GNR • <i>Escherichia coli</i>
10	7月18日	JF-260V	61	12	64	GPC • <i>Streptococcus</i> sp
11	7月19日	JF-260V	93	9	0	***
12	7月19日	JF-260V	115	61	>250	GNR • <i>Klebsiella pneumoniae</i> GNR • <i>Escherichia coli</i> GPC • <i>Enterococcus</i> sp
13	7月21日	JF-260V	20	7	4	GNR • <i>Enterobacter cloacae</i> GPC • <i>Enterococcus</i> sp GPC • <i>Streptococcus</i> sp GPC • <i>S. viridans</i> group
14	7月21日	JF-260V	86	10	0	***
15	7月23日	JF-260V	54	2	160	GNR • <i>Escherichia coli</i> GNR • <i>K. pneumoniae</i> GPC • <i>Enterococcus</i> sp GPC • <i>Streptococcus</i> sp GPC • <i>S. viridans</i> group
16	7月23日	JF-260V	86	107	>250	GNR • <i>Enterobacter cloacae</i> GNR • <i>Escherichia coli</i> GPC • <i>S. viridans</i> group
17	7月24日	JF-260V	103	29	240	GNR • <i>Escherichia coli</i> GPC • <i>Enterococcus</i> sp GPC • <i>S. viridans</i> group
18	7月25日	JF-260V	22	69	>250	GNR • <i>Enterobacter amnigenus</i> GNR • <i>Enterobacter asburiae</i> GPC • <i>Enterococcus</i> sp
19	7月25日	JF-260V	295	9	80	GNR • <i>Escherichia coli</i> GNR • <i>Klebsiella pneumoniae</i> GPC • <i>Enterococcus</i> sp
20	7月26日	JF-260V	43	10	0	***

表 5 侧窥镜的A3法与微生物检测结果

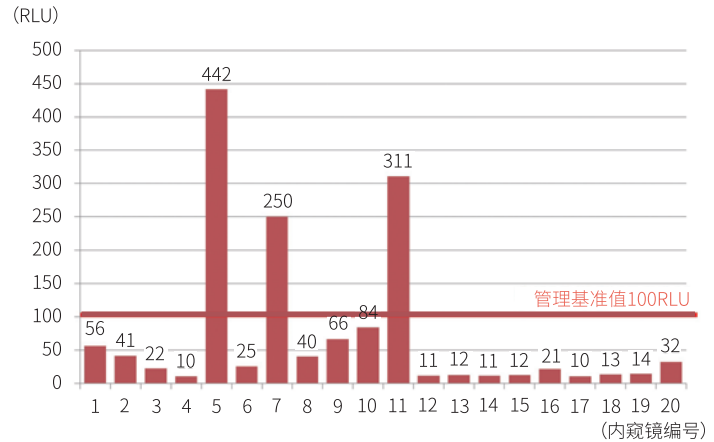


图 3 侧窥镜的A3法检测结果②

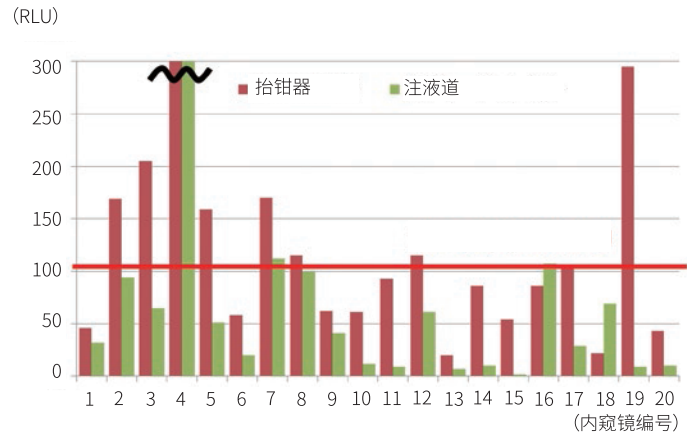


图 3 侧窥镜的A3法检测结果



图4 医院开放活动中洗手课堂的现场

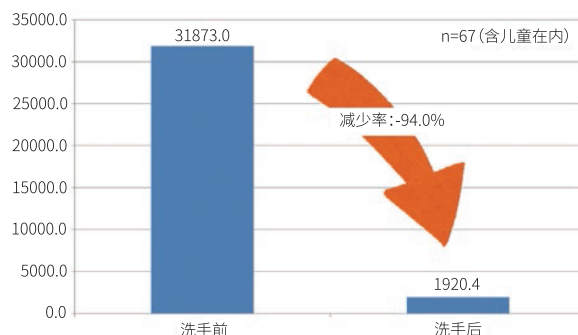


图5 医院开放活动中，洗手前后进行ATP荧光检测的RLU值

(4) 总结与考察

经确认，A3法的确能够简易地在10秒左右的短时间内评估内窥镜清洗后的清洁度。若检测出了较高的RLU值，可以立即重新清洗。若重新清洗后仍然保持较高的RLU值，原因可能是清洗顺序存在问题或是钳道内有划痕。

A3法检测新旧内窥镜获得的检测值也有所不同。例如，内窥镜通常会配套活检钳等配件使用。保持先端弯曲的配件插入内窥镜中可能会划伤管道内部结构，导致污垢在划痕中积聚，A3法检测旧内窥镜时检测值会有所偏高，因此A3检测也是一种判断这些配件使用情况的有效工具。府中医院在评估A3法检测结果的同时，也会委托内窥镜生产商维修保养器械，或根据情况购买新品替换。

有效利用A3法的检测结果，也可能获得除清洁度以外的信息。今后，府中医院还将斟酌A3法的实施频率等相关问题，摸索出一套更为高效的应用方法。

其他有效运用的事例：

在面向一般群众的洗手课堂中有效运用ATP检测

府中医院每年都会举办名为“开放医院”的活动（2018年于11月19日举办）。该活动类似于大学的校园开放日，各部门都会设立一个摊位，方便当地居民了解院内工作。

去年感染防控室以“必看！专家建议的‘在家就可以做到的感染预防措施’”为题，举办了一场学习预防感染的相关知识体验活动。例如，从口腔中采取微生物后放到显微镜下观察，或制备消毒水（次氯酸钠）用来进行大扫除。

另外，府中医院还开办了洗手课堂，通过ATP荧光检测让大家亲身感受“正确洗手”后到底能去除多少污垢（图4、图5）。例如，洗手前的平均检测值为31,873RLU，洗手后的平均检测值会降至1,920RLU。希望该活动能帮助大家在诸如病毒疫情爆发前，理解“只要正确洗手，就可以充分洗去手上污垢”这一观点。

※ RLU值=Relative Light Unit简称，是表现相对发光量的ATP荧光检测特有单位

kikkoman

龟甲万百欧凯米发株式会社
(Kikkoman Biochemifa Company)

地址：东京都港区西新桥2-1-1

Tel: +81-3-5521-5481 Fax: +81-3-5521-5498

E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

URL: <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/c/>

● 何为ATP荧光检测

ATP荧光检测（以下称为ATP检测）是一种能够简易且迅速地检测环境表面残留的有机物来源污垢的检测法，该方法刊载于食品卫生检测指南（微生物篇 第2版，2018年）等资料上。

ATP（三磷酸腺苷）是所有生物体内能量代谢所必需的化学物质。以ATP为指标的ATP检测，是环境清洁度检测方法之一。检测步骤为，①采样（试剂与棉棒一体化，使用棉棒部位涂抹检测对象）⇒②反应（棉棒涂抹到的物质与试剂反应）⇒③检测（将试剂放入检测装置，约10秒后可获得数据化的检测结果）。仅需以上三步，任何人都能进行简单且科学的检测。作为一种简单且快速的卫生检查工具，ATP检测能应用于注重卫生管理的食品工厂、制药工厂、饮食店、注重传染病预防的医院以及养老设施、幼儿园、洗浴中心等各种各样的场所。

● 同时检测ATP、ADP、AMP的“A3法”

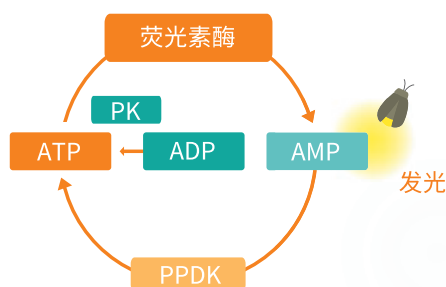
ADP（二磷酸腺苷）以及AMP（一磷酸腺苷）是ATP在加热或pH条件、酶促反应等情况下变化产生的物质，而龟甲万百欧凯米发株式会社开发了能够同时检测ATP、ADP、AMP的“A3法”。原理如图所示，通过使用将AMP转变成ATP的酶（PPDK: pyruvate orthophosphate dikinase）以及将ADP转变为ATP的酶（PK: pyruvate kinase），同时检测ATP、ADP、AMP，可以完成比以ATP为单一指标的检测方法更为灵敏的检测。

ATP检测装置“Lumitester Smart”，A3法专用试剂液体检测专用试剂“LuciPac A3 Water”，涂抹检测专用试剂“LuciPac A3 Surface”皆在龟甲万百欧凯米发株式会社有售。

● ATP检测设备“Lumitester Smart”

龟甲万百欧凯米发株式会社销售的ATP检测装置“Lumitester Smart”，通过与专用APP连接，增强了数据管理和分析功能。简单、迅速地可视化卫生状态，能有效提升卫生管理水平，提高员工的卫生意识。Lumitester Smart在常规检测方法的基础上，通过与专用APP连接，大幅增强数据管理能力。

通过与相关软件的连接，用户可在平板电脑、手机、电脑的屏幕上轻松处理与分析“Lumitester Smart”检测出的结果。例如，使用饼状图统计每个检查点的合格率，使用折线图呈现某个时期检测结果的变化等，在可直观操作的APP上以多样的形式将数据“可视化”。而且，数据可上传云端，能统一管理多个工厂或多个连锁饮食店的多项数据。无论身在何处都可登录查看数据，方便用户在发生问题时迅速掌握情况并做出对应。APP将根据用户的意见反馈，按需求更新（APP支持11种语言）。



最新型号“Lumitester Smart”（左），液体检测专用试剂“LuciPac A3 Water”（中间），涂抹检测专用试剂“LuciPac A3 Surface”（右）。“Lumitester Smart”触控面板只有三个按键，操作简单。表面采用富有洁净感的材料与设计。