ارزیابی عملکرد دستگاه تشخیص سریع آلودگی (Luminometer) در مقایسه با روش کشت میکروبی در تشخیص و اندازه‌گیری بار میکروبی موجود در سطوح مختلف

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق مقایسه نتایج بدست آمده از دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 با نتایج حاصل از روش کشت میکروبی به منظور تشخیص میزان آلودگی در چندین سطح مختلف بود. یافته‌های این تحقیق می‌تواند کمک زیادی به ارزیابی میزان صحت و دقت عملکرد تجهیزات تشخیص سریع آلودگی بر پایه ATP کند. **نمونه‌ها روش‌ها:** در این تحقیق، به منظور تعین میزان بار میکروبی در یک کارخانه مواد غذایی، از ۲۷ سطح مختلف به دو روش کشت میکروبی و تشخیص سریع میکروبی نمونه‌برداری شد. در روش کشت میکروبی از نمونه‌بردار، محیط کشت میکروبی (Blood Agar) و دستگاه انکوباتور و همچنین در روش تشخیص سریع میکروبی از نمونه‌بردار و دستگاه لومینومتر Lumitester PD–30 برای اندازه‌گیری تعداد کل میکروارگانیسم‌های موجود در هر سطح استفاده شد. قبل از نمونه‌برداری سطوح مورد نظر ضدعفونی شدند. **یافته‌ها:** در مقایسه یافته‌های بدست آمده از دو روش مورد نظر، به جز یک سطح، یافته‌های بدست آمده برای کلیه سطوح از لحاظ کیفی کاملا مشابه بودند. **نتیجه‌گیری:** به طور کلی با توجه به یافته‌های بدست آمده در خصوص مقایسه دو روش مورد نظر در این تحقیق که منجر به ارزیابی میزان صحت و دقت دستگاه Lumitester PD-30 در اندازه‌گیری

بار میکروبی موجود در سطوح شد و همچنین با توجه به سرعت عمل بسیار بالای روش تشخیص سریع آلودگی، استفاده از دستگاه Lumitester PD-30 با ۳٪ خطا بسیار نوید بخش و امیدوار کننده به نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: میکروارگانیسم، لومینومتر، ATP، کشت میکروبی

معرفی و بیان موضوع

آگاهی از میزان آلودگی و سنجش تمیزی در محیط‌هایی که ملزم به اجرای قوانین مربوط به پاکیزگی هستند، نقش بسیار مهمی را در کنترل عفونت و بهداشت محیط ایفا می‌کند. از آنجایی که بخش بزرگی از هزینه‌های پاک‌سازی به نیروی کار مرتبط است، اجرای پروتکل‌های صحیح پاک‌سازی علاوه بر تضمین سلامت افراد به حفظ و بهره‌وری صحیح منابع مالی نیز کمک شایانی می‌نماید. به این منظور مسئولین کنترل عفونت و بهداشت مراکز درمانی به دنبال روشی سریع و مقرون به صرفه با کاربری آسان جهت تایید فرآیندهای کنترل عفونت، پاک‌سازی و ضد عفونی محیط می‌باشند. به همین منظور امروزه متخصصین این حوزه با طراحی و ابداع روش‌های تشخیص سریع آلودگی در مدت زمان چند ثانیه، تاثیر شگرفی در کاهش و کنترل عفونت داشته‌اند. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش تشخیص سریع آلودگی بر پایه اندازه‌گیری ATP (Adenosine Triphosphate) اشاره کرد که با اندازه‌گیری ATP موجود در باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها در مدت زمان چند ثانیه میزان آلودگی موجود در سطوح را بر حسب RLU (Relative Light Units) یا همان واحد نور نسبی نشان می‌دهد. اساس کار این روش به این صورت است که ATP موجود در باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها طی واکنشی در حضور آنزیم لوسیفراز (Luciferase) سبب آزاد سازی نور بیولومینسانس (Bioluminescence) می‌گردد که این نور توسط دستگاه لومینومتر (Luminometer) قابل تشخیص و اندازه‌گیری دقیق می‌باشد (۱). روش تشخیص سریع آلودگی بر پایه اندازه‌گیری ATP به واسطه سرعت عمل زیاد و همچنین دقت بالا در تشخیص آلودگی محیط، بارها توسط

محققین متعدد مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است. به عنوان مثال Willis و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲) طی تحقیقی گزارش کردند که روش تشخیص سریع آلودگی بر پایه‌ی ATP روشی جدید و مطمئن برای تشخیص و نمایش میزان آلودگی در مدت زمان بسیار کوتاه می‌باشد. Turner و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۳) بعد از مطالعه و بررسی، حساسیت و دقت بالای تجهیزات تشخیص سریع آلودگی بر پایه ATP را گزارش کردند. Higgins و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۴) طی یک تحقیق گزارش کردند که روش مورد نظر روشی مناسب برای توسعه بهداشت دست در مراکز درمانی می‌باشد. Osimani و همکاران (۵) پس از بررسی در سال ۲۰۱۴ تجهیزات تشخیص سریع آلودگی بر پایه ATP را ابزاری قدرتمند و دقیق برای تشخیص سریع آلودگی حتی برای محیط های ضد عفونی شده معرفی کردند. Alfa و همکاران (۶) هم پس از بررسی در سال ۲۰۱۵ به این نتیجه رسیدند که در صورت عدم تمیزی و ضدعفونی سطوح، این تجهیزات ابزار مناسبی برای سنجش میزان آلودگی هستند. همچنین Nante و همکاران در سال ۲۰۱۷ (۷) طی تحقیقی گزارش کردند که تجهیزات مورد نظر ابزار مناسبی برای تشخیص آنی و نمایش میزان آلودگی در سطوح و محیط‌های بیمارستانی هستند.

به طور کلی از روش کشت میکروبی که واحد اندازه‌گیری آن CFU/ml (Colony-Forming Units per milliliter) یا به عبارتی تعداد کلنی بر واحد حجم نمونه می‌باشد، به طور وسیع برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. در این روش که صحت و دقت آن قبلا تایید و بررسی شده است، به علت سرعت عمل بسیار پایین به خاطر کند رشد بودن میکروارگانیسم‌ها، نتایج بعد از گذشت مدت زمان نسبتا طولانی (۴۸ ساعت)

مشخص می‌شود. یک روش ایده آل و مناسب برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها، کنترل عفونت و تشخیص آلودگی بایستی سریع بوده و حساسیت، دقت و صحت بالایی داشته باشد و همچنین تفسیر نتایج آن آسان بوده و از نظر ارزش اقتصادی هم مقرون به صرفه باشد. دستگاه لومینومتر Lumitester PD–30 (ساخت کشور ژاپن، کمپانی Kikkoman) یکی از جدیدترین تجهیزات مربوط به روش تشخیص سریع آلودگی بر پایه ATP است که در مدت زمان کمتر از ۱۰ ثانیه آلودگی سطوح را تشخیص داده و علاوه بر تشخیص ATP، قادر به ارزیابی و اندازه گیری میزان ADP (Adenosine Diphosphate) و AMP (Adenosine Monophosphate) می‌باشد چرا که گاهی در دماهای بسیار بالا و یا بسیار پایین میکروارگانیسم‌ها بسیار ضعیف شده و پیوندهای بین آنها شکسته می‌شود و تبدیل بهADP و AMP می‌شود یعنی با وجود اینکه میکروب وجود دارد اما چون ضعیف شده است با ATP قابل تشخیص نیست اما با کمک دستگاه Lumitester PD-30 میزان آلودگی با حساسیت بالا قابل تشخیص می‌باشد (۸).

با توجه به ضرورت و اهمیت تشخیص سریع عفونت و آلودگی در مراکز درمانی و بهداشتی، لازم است که کلیه تجهیزات پیشرفته و جدید در زمینه تشخیص سریع آلودگی بر پایه ATP، بر اساس استانداردها و روش‌های معتبر مورد ارزیابی و بررسی قرار گیرند. بر همین اساس در تحقیق حاضر تلاش شده است تا صحت و عملکرد دستگاه لومینومتر Lumitester PD–30 که از پیشرفته ترین تجهیزات در زمینه مورد نظر میباشد از طریق مقایسه با روش کشت میکروبی که بسیار رایج بوده و صحت آن قبلا بررسی و تایید شده است، مورد ارزیابی و

سنجش قرار گیرد. به طور کلی هدف از این تحقیق مقایسه نتایج بدست آمده از دستگاه لومینومتر Lumitester PD–30 با نتایج حاصل از روش کشت میکروبی برای تشخیص میزان آلودگی در چندین سطح مختلف بود. یافته‌های این تحقیق می‌تواند کمک زیادی به ارزیابی میزان صحت و دقت عملکرد تجهیزات تشخیص سریع آلودگی بر پایه ATP کند.

نمونه‌ها روش‌ها

در این تحقیق، به منظور تعیین میزان بار میکروبی در یک کارخانه مواد غذایی، از ۲۷ سطح مختلف به دو روش کشت میکروبی و تشخیص سریع میکروبی به منظور سنجش میزان بار کلی میکروبی (Total Count) نمونه‌برداری شد. در روش کشت میکروبی از نمونه‌بردار، محیط کشت میکروبی (Blood Agar) و دستگاه انکوباتور و همچنین در روش تشخیص سریع میکروبی از نمونه‌بردار و دستگاه لومینومتر Lumitester PD–30 برای اندازه‌گیری تعداد کل میکروارگانیسم‌های موجود در هر سطح استفاده شد. قبل از نمونه‌برداری سطوح مورد نظر ضدعفونی شدند. در کشت میکروبی با توجه به میزان حساسیت سطوح در برابر آلودگی، حد مجاز بار میکروبی برای سطوح حساس، کمتر از 10 CFU/ml و برای سایر سطوح 100 CFU/ml در نظر گرفته شد. در روش تشخیص سریع میکروبی، حد مجاز بار میکروبی برای سطوح با حساسیت بالا 50 RLU، برای سطوح حساس 100 RLU، برای سطوح نیمه‌حساس200 RLU، برای سطوح با حساسیت پایین 500 RLU و برای سطوح

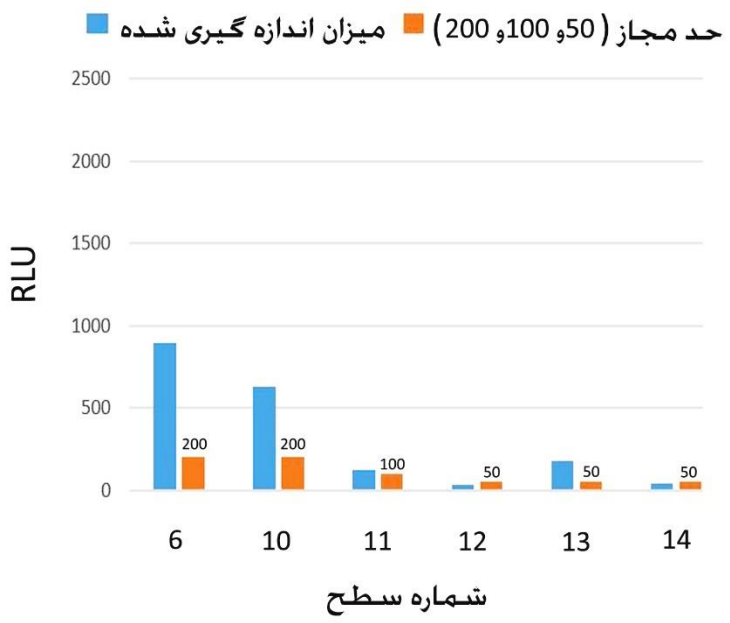
غیرحساس 2000 RLU در نظر گرفته شد (جدول ۱). در روش تشخیص سریع میکروبی ابتدا با توجه به میزان حساسیت سطح مورد نظر، حد مجاز بار میکروبی در دستگاه لومینومتر Lumitester PD-30 تنظیم شده و سپس با استفاده از نمونه‌بردار مخصوص سطح، از سطح ضدعفونی شده نمونه‌برداری شد. در مرحله‌ی بعد نمونه‌بردار در دستگاه مورد نظر قرار گرفت و بعد از گذشت مدت زمان ۱۰ ثانیه میزان آلودگی میکروبی در نمایشگر دستگاه مشخص و ثبت شد (۹). در روش کشت میکروبی، از هر سطح ضدعفونی شده، با استفاده از نمونه‌بردار نمونه‌هایی به منظور کشت بر روی محیط‌های کشت میکروبی قرار داده شدند و سپس محیط‌های کشت میکروبی در دستگاه انکوباتور قرار گرفته و بعد از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت، تعداد کلنی‌های موجود در محیط‌های کشت میکروبی شمرده شده و نتایج ثبت شدند (۱۰و۱۱). در نهایت نتایج بدست آمده از دو روش مورد نظر با هم مقایسه شدند. به منظور کسب اطمینان از تکرارپذیری داده‌های بدست آمده از آزمایش‌ها، هر آزمایش دو بار تکرار شد.

جدول ۱-مشخصات مربوط به سطوح مورد آزمایش برای تعیین میزان آلودگی

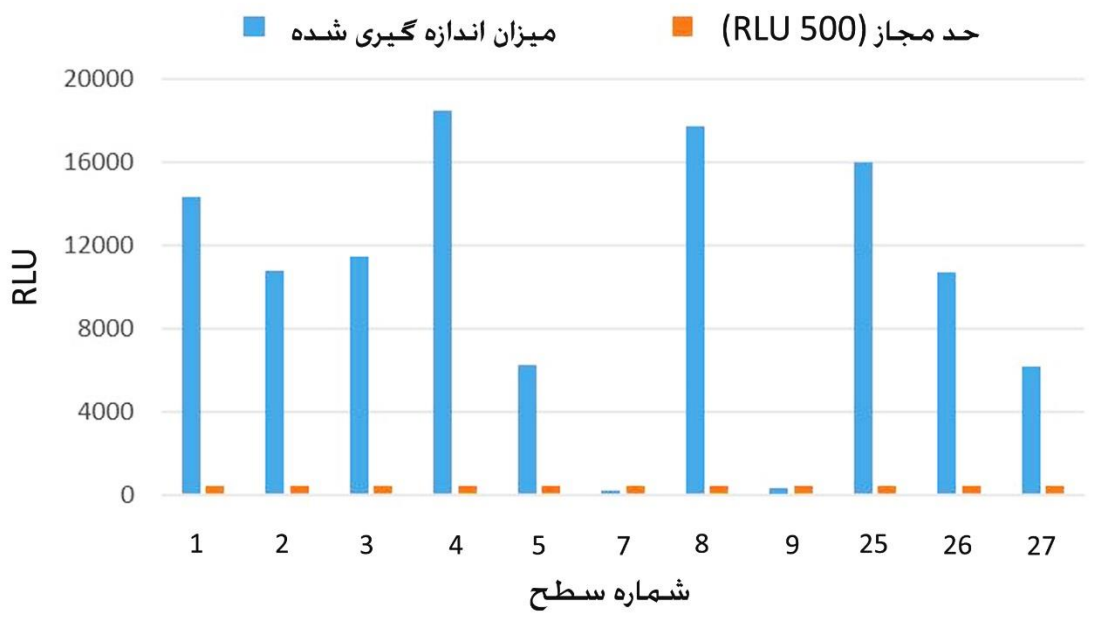
شماره سطح	نوع سطح	حد مجاز	
		RLU	CFU/ml
1	سکوی گزارش ۱	۵۰۰	۱۰۰
2	سکوی گزارش ۲	۵۰۰	۱۰۰
3	سکوی گزارش ۳	۵۰۰	۱۰۰
4	سکوی کشت ۱	۵۰۰	۱۰۰
5	سکوی کشت ۲	۵۰۰	۱۰۰
6	هود لامینار	۲۰۰	۱۰
7	انکوباتور ۱	۵۰۰	۱۰
8	انکوباتور ۲	۵۰۰	۱۰
9	یخچال میکروبی	۵۰۰	۱۰
10	سطح بالای انکوباتور ۱	۲۰۰	۱۰۰
11	فیلر ۱	۱۰۰	۱۰
12	فیلر ۲	۵۰	۱۰
13	فیلر ۳	۵۰	۱۰
14	فیلر ۴	۵۰	۱۰
15	فینگر تست ۱	۲۰۰۰	۱۰
16	فینگر تست ۲	۲۰۰۰	۱۰
17	فینگر تست ۳	۲۰۰۰	۱۰
18	فینگر تست ۴	۲۰۰۰	۱۰
19	فینگر تست ۵	۲۰۰۰	۱۰
20	فینگر تست ۶	۲۰۰۰	۱۰
21	فینگر تست ۷	۲۰۰۰	۱۰
22	فینگر تست ۸	۲۰۰۰	۱۰
23	فینگر تست ۹	۲۰۰۰	۱۰
۲۴	فینگر تست ۱۰	۲۰۰۰	۱۰
25	سکوی شیمیایی ۱	۵۰۰	۱۰۰
26	سکوی پروتئین	۵۰۰	۱۰۰
27	سکوی شیمیایی ۲	۵۰۰	۱۰۰

یافته‌ها

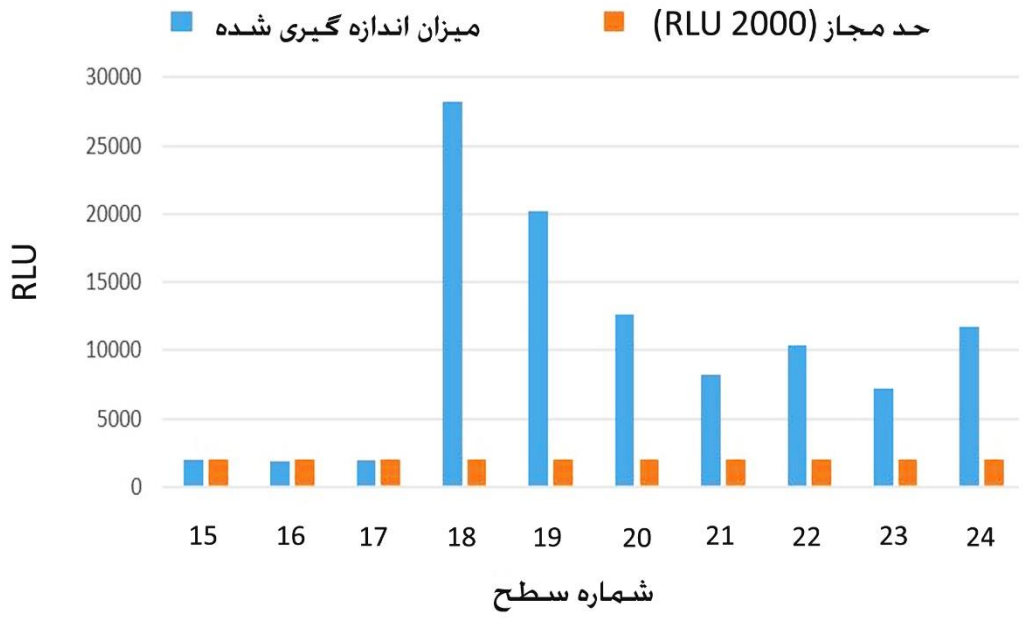
شکل ۱ یافته‌های بدست آمده از تست تشخیص سریع میزان آلودگی توسط دستگاه لومینومتر lumitesterPD-30 را بر روی چندین سطح مختلف با حدود مجاز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ RLU نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود به جز سطوح شماره ۱۲ و ۱۴، میزان آلودگی برای کلیه سطوح بیشتر از حد مجاز بوده است به طوریکه برای سطوح ۶ و ۱۰ تفاوت بین حد مجاز و میزان اندازه‌گیری شده کاملا چشمگیر بوده است. شکل ۲ هم یافته‌های بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط دستگاه مورد نظر را بر روی چندین سطح مختلف با حد مجاز ۵۰۰ RLU نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود به جز سطوح شماره ۷ و ۹، میزان آلودگی برای کلیه سطوح بیشتر از حد مجاز بوده است به طوری که برای کلیه سطوح تفاوت بین حد مجاز و میزان اندازه‌گیری شده کاملا چشمگیر بوده است. همچنین شکل ۳ هم یافته‌های بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط دستگاه مورد نظر را بر روی چندین سطح مختلف با حد مجاز ۲۰۰۰ RLU نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود میزان آلودگی برای کلیه سطوح به جز سطوح ۱۵، ۱۶ و ۱۷، بیشتر از حد مجاز بوده است و تفاوت بین حد مجاز و میزان اندازه‌گیری شده بسیار چشمگیر بوده است.



شکل ۱-نمودار میله ای مربوط به نتایج بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 بر روی چند سطح مختلف با حدود مجاز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ RLU



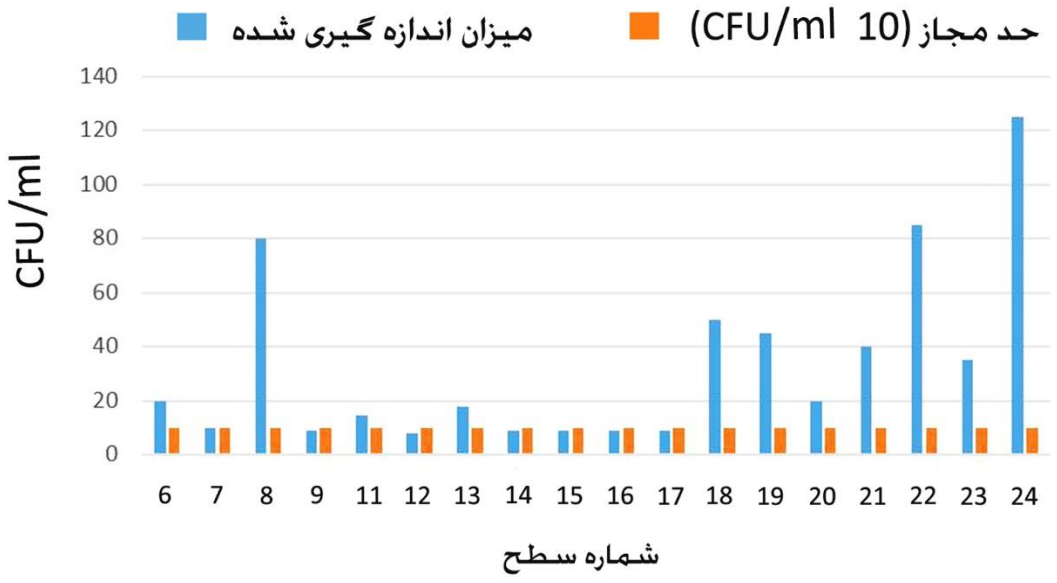
شکل ۲-نمودار میله ای مربوط به نتایج بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 بر روی چند سطح مختلف با حد مجاز ۵۰۰ RLU



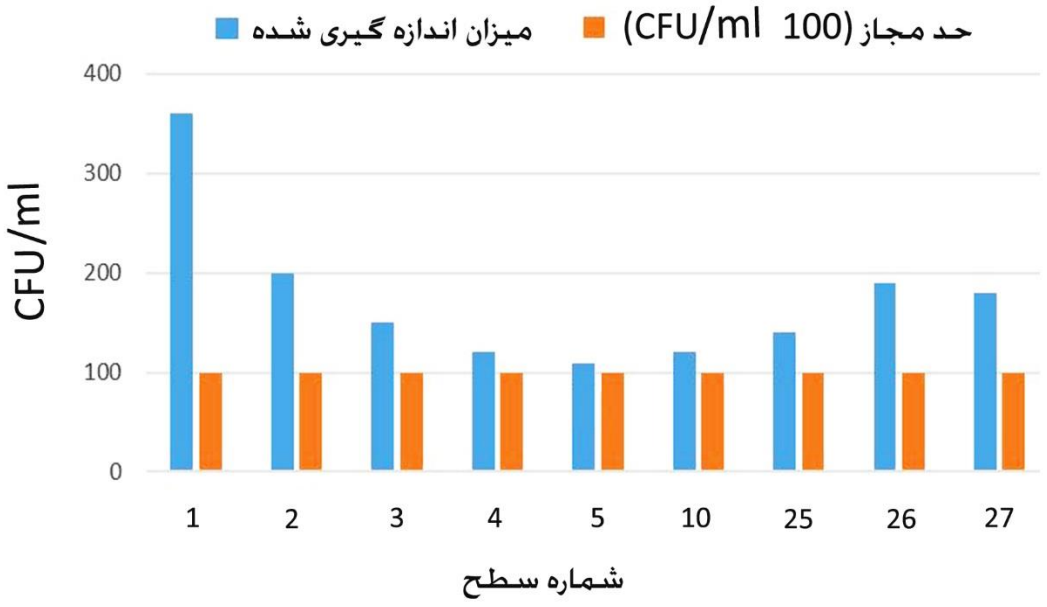
شکل ۳-نمودار میله ای مربوط به نتایج بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 بر روی چند سطح مختلف با حد مجاز ۲۰۰۰ RLU

شکل ۴ یافته‌های بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط روش کشت میکروبی را بر روی سطوح مورد نظر با حد مجاز 10 CFU/ml نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود به جز سطوح شماره ۷، ۹، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷، میزان آلودگی برای کلیه سطوح بیشتر از حد مجاز بوده است به طوری که تقریبا برای همه سطوح تفاوت بین حد مجاز و میزان اندازه‌گیری شده کاملا چشمگیر بوده است. شکل ۵ هم یافته‌های بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط روش کشت میکروبی را بر روی سطوح مورد نظر با حد مجاز ۱۰۰

CFU/ml نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود میزان آلودگی برای کلیه سطوح بیشتر از حد مجاز بوده است.



شکل ۴-نمودار میله ای مربوط به نتایج بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط روش کشت میکروبی بر روی چند سطح مختلف با حد مجاز ۱۰ CFU/ml



شکل ۵-نمودار میله ای مربوط به نتایج بدست آمده از تست تشخیص میزان آلودگی توسط روش کشت میکروبی بر روی چند

سطح مختلف با حد مجاز ۱۰۰ CFU/ml

بحث

همانطور که یافته‌ها نشان داد (شکل ۲) مقادیر بدست آمده از دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 برای سطوح ۱ تا ۳ که از یک جنس بوده نشان دهنده‌ی وجود بار میکروبی به میزان چندین برابر حد مجاز در این سطوح میباشد که یافته‌های بدست آمده از کشت میکروبی (شکل ۵) یافته‌های حاصل از تشخیص سریع میکروبی را تایید می نماید. همانطور که در شکل ۲ مشاهده شد، مقادیر بدست آمده از تشخیص سریع میکروبی برای سطوح مورد نظر از لحاظ مقداری چندین برابر حد مجاز بوده که این پدیده در یافته‌های بدست آمده از کشت میکروبی (شکل۵) مشاهده نمی‌شود یعنی با این که مقادیر بدست آمده در کشت میکروبی بیش تر از حد مجاز بوده ولی در مقایسه با روش تشخیص سریع میکروبی تفاوت چندان زیادی با حد مجاز ندارد. این به این معنی است که در مقایسه یافته‌های بدست آمده از تشخیص سریع میکروبی و کشت میکروبی برای سطوح ۱ تا ۳، هیچ رابطه کمی خاصی بین این دو روش مشاهده نمی‌شود و تنها وجه اشتراک بین این دو روش، تایید وجود بار میکروبی به میزان بالاتر از حد مجاز در سطوح مورد نظر می‌باشد. یافته‌های بدست آمده از تشخیص سریع میکروبی برای سطوح ۴ و ۵ که از یک جنس بوده (شکل ۲) نشان دهنده وجود بار میکروبی در سطوح مورد نظر بود که نتایج بدست آمده از کشت میکروبی هم این یافته‌ها را تایید کرد(شکل ۵). همچنین مشاهده شد که در روش تشخیص سریع میکروبی، تفاوت بین مقادیر اندازه‌گیری شده و حد مجاز بار میکروبی بسیار زیاد بوده که در مقایسه با روش کشت میکروبی این تفاوت به مراتب کم‌تر بوده است. همانطور که قبلا گفته شد این به این معنی است که

در مقایسه بین یافته‌های بدست آمده از تشخیص سریع میکروبی و کشت میکروبی هیچ رابطه کمی خاصی بین این دو روش مشاهده نمی‌شود و تنها وجه اشتراک بین این دو روش، تایید وجود بار میکروبی به میزان بالاتر از حد مجاز در سطوح مورد نظر می‌باشد. همچنین یافته‌های بدست آمده برای سایر سطوح به جز سطح ۷، همانند با سطوح ذکر شده در بالا بوده است که در مقایسه بین یافته‌های بدست آمده از تشخیص سریع میکروبی و کشت میکروبی برای این سطوح هیچ رابطه کمی خاصی بین این دو روش مشاهده نشد و تنها وجه اشتراک بین این دو روش، تایید وجود بار میکروبی به میزان بالاتر از حد مجاز و یا تایید وجود بار میکروبی به میزان کمتر از حد مجاز در سطوح مورد نظر بوده است. در خصوص سطح ۷، یافته‌های بدست آمده از دو روش با یکدیگر متفاوت بوده است به طوری که یافته‌های بدست آمده از تشخیص سریع میکروبی وجود بار میکروبی به میزان کمتر از حد مجاز و یافته‌های بدست آمده از کشت میکروبی وجود بار میکروبی به میزان برابر با حد مجاز را در سطح مورد نظر نشان داده اند. در خصوص سطوح ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۷-۱۴، مقادیر اندازه‌گیری شده بار میکروبی در هر دو روش بسیار نزدیک به حد مجاز بار میکروبی سطوح مورد نظر بوده است که این نشان دهنده دقت بالای دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 در تشخیص و اندازه‌گیری میزان بار میکروبی موجود در سطوح مورد نظر می‌باشد. همانطور که گفته شد نتایج حاصل از کشت میکروبی بر حسب واحد CFU/ml و نتایج حاصل از دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 بر حسب واحد RLU است که برای تبدیل آنها به یکدیگر روش خاصی وجود ندارد چرا که پایه و اساس این دو واحد کاملا با هم متفاوت است و از همین رو مقایسه این دو روش تنها به صورت کیفی ممکن پذیر است.

به طور کلی از یافته‌های این تحقیق ۲ نکته‌ی کلی را می‌توان استنتاج کرد. نکته اول این است که تنها تشابه بین یافته‌های بدست آمده از دو روش مورد نظر، تشابه کیفی است و هیچ رابطه کمی خاصی بین واحدهای اندازه‌گیری این دو روش وجود ندارد که این پدیده کاملا منطقی به نظر می‌رسد چرا که RLU واحد نور نسبی و CFU/ml واحد شمارش کلنی‌ها در حجم نمونه می‌باشد که کاملا از دو جنس متفاوت و غیرهمگن می‌باشند. نکته دوم این است که با توجه به یافته‌های بدست آمده از روش کشت میکروبی برای سطوحی که میزان بار میکروبی موجود در آن‌ها بسیار کم و نزدیک به حد مجاز بوده و همچنین تشابه آن با یافته‌های بدست آمده از دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 برای سطوح مورد نظر، می‌توان به دقت بالای دستگاه مورد نظر در تشخیص و اندازه‌گیری بارهای میکروبی به میزان بسیار کم و نزدیک به حد مجاز در سطوح پی برد.

نتیجه گیری

از آنجا که روش کشت میکروبی برای تشخیص میزان آلودگی در شرایط فوری و اضطراری بسیار زمان‌بر است و همچنین از آنجا که در مراکز درمانی سرعت عمل در تشخیص میزان آلودگی سطوح به منظور جلوگیری از عفونت و حفظ سلامت بیمار بسیار حائز اهمیت است، دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش کشت میکروبی در خصوص تشخیص میزان بار کلی میکروبی موجود در سطوح شود. به طور کلی با توجه به یافته‌های بدست آمده در خصوص مقایسه دو روش مورد نظر در این تحقیق که منجر به ارزیابی میزان صحت و دقت دستگاه لومینومتر lumitester PD-30 در اندازه‌گیری بار میکروبی موجود در سطوح شد و همچنین با توجه به سرعت عمل بسیار بالای روش تشخیص سریع آلودگی، استفاده از دستگاه مورد نظر بسیار نوید بخش و امیدوار کننده به نظر می‌رسد.

منابع

1. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J Immunol Methods 1993; 160:81–88.
2. Willis C, Morley R, Westbury J, Greenwood M, Pallett A. Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning. British Journal of Infection Control. 2007;8:17-21.
3. Turner DE, Daugherity EK, Altier C, Maurer KJ. Efficacy and limitations of an. ATP-based monitoring system. J Am Soc Lab Animal Sci 2010;49:190
4. Higgins A, Hannan MM. Improved hand hygiene technique and compliance in healthcare workers using gaming technology. J Hosp Infect. 2013 May;84(1):32-7.
5. Osimani A, Garofalo C, Clementi F, Tavoletti S, Aquilanti L. Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. Int J Environ Res Public Health. 2014 Oct 17;11(10):10824-37.
6. Alfa MJ, Olson N, Murray BL. Adenosine tri-phosphate (ATP)-based cleaning monitoring in health care: how rapidly does environmental ATP deteriorate? J Hosp Infect. 2015 May;90(1):59-65.

7. Nante, N., Ceriale, E., Messina, G., Lenzi, D., and Manzi, P. Effectiveness of ATP bioluminescence to assess hospital cleaning: a review. J Prev Med Hyg. 2017 Jun; 58(2): E177–E183.
8. Kimmich GA, Randles J, Brand JS. Assay of Picomole Amounts of ATP, ADP, and AMP using the Luciferase Enzyme System. J Anal Biochem. 1975 Nov;69(1): 187-206.
9. Lee KJ, Lee WS, Hwang A, Moon J, Kang T, Park K, Jeong J. Simple and rapid detection of bacteria using a nuclease-responsive DNA probe. Analyst. 2017 Dec 18;143(1):332-338.
10. Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media- Second Edition; Approved standard- Third edition document M22-A3. Vol. 24, No. 19; 2006.
11. Microbiological culture media; second Edition; 2009; Becton, Dickinson and Company.