

EC STER – mokslinio straipsnio vertimas į lietuvių kalbą

Kiekybinis suspensijos tyrimas: redukuojančiais laisvaisiais radikalais pagrįstos šaltosios sterilizacijos sistemos ir autoklavo sterilizacijos ciklą palyginimas

Christian Cirillo, Daniele Botticelli, Stefano Benedicenti | Journal of Functional Biomaterials (2025), 16, 410 | DOI: 10.3390/jfb16110410

A autorių institucijos: ¹ Eurolab S.r.l., Viale Mare Ionio 4, 89040 Marina di Caulonia (RC), Italija; ² ARDEC Academy, 47838 Riccione (RN), Italija; ³ Genujos universiteto Chirurgijos mokslų ir integruotos diagnostikos departamentas, 20991 Genuja (GE), Italija.

Susirašinėjimui: Christian Cirillo (cirillochristian@libero.it). Gauta 2025 m. rugsėjo 14 d.; pataisyta 2025 m. spalio 9 d.; priimta 2025 m. spalio 31 d.; paskelbta 2025 m. lapkričio 4 d.

Originalus šaltinis: Cirillo, C.; Botticelli, D.; Benedicenti, S. Journal of Functional Biomaterials 2025, 16, 410. <https://doi.org/10.3390/jfb16110410>. Licencija: Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Vertimas į lietuvių kalbą. Originalus straipsnis anglų kalba yra pirminis šaltinis.

Santrauka

Medicinos priemonių sterilizavimas yra itin svarbus procesas pacientų saugai užtikrinti. Tačiau tradiciniai gariniai autoklavai gali netikti karščiui jautrioms medžiagoms. Šiame tyrime įvertinta naujoviška šaltosios sterilizacijos sistema, pagrįsta kontroliuojamu redukuojančių savybių turinčių laisvųjų radikalų susidarymu. Sistema jau buvo validuota ir pateikta rinkai atlikus daugybę mikrobiologinių tyrimų pagal UNI EN standartus (13727, 13624, 17126, 14476, 14348). Kontroliuojamomis sąlygomis atliktas kiekybinis suspensijos tyrimas, kuriame šaltosios sistemos pasiektas mikroorganizmų kiekio sumažėjimas palygintas su standartinio autoklavo ciklo rezultatais. Sistema parodė didesnę nei 6 log₁₀ baktericidinį veiksmingumą, panašų į autoklavo ciklo veiksmingumą. Rezultatai leidžia manyti, kad laisvųjų radikalų sistema gali būti saugi, greita ir veiksminga alternatyva karščiui jautrioms medžiagoms sterilizuoti, potencialiai pritaikoma sveikatos priežiūros ir pramonės srityse.

Raktažodžiai: šaltoji sterilizacija; laisvieji radikalai; autoklavas; mikroorganizmų kiekio sumažėjimas; UNI EN standartai; bioplėvelė; medicinos priemonės.

1. Įvadas

Medicinos priemonių sterilizavimas yra būtinas pacientų saugai užtikrinti ir su sveikatos priežiūra susijusių infekcijų prevencijai [1]. Pastaraisiais dešimtmečiais etaloniniu metodu laikyta sterilizacija prisotintais garais autoklave. Ji pasižymi dideliu mikrobicidiniu veiksmingumu, tačiau turi reikšmingų apribojimų sterilizuojant karščiui jautrias medžiagas ar sudėtingos konstrukcijos priemonės: aukšta temperatūra gali pakenkti jų vientisumui ir funkcijai [2].

Ilgainiui moksliniai tyrimai buvo sutelkti į alternatyvius žematemperatūrius metodus, įskaitant plazmos [3], etileno oksido [4], peracto rūgšties [5–7] ir laisvųjų radikalų [8,9] sistemas. Keli tyrimai patvirtino šaltosios plazmos veiksmingumą nukenksminant temperatūrai jautrius paviršius ir chirurginius instrumentus, pabrėžiant trumpą apdorojimo laiką ir toksinių likučių nebuvimą [10,11]. Kartu laisvųjų radikalų sistemos, gaunamos, pavyzdžiui, skaidant peroksidus arba jonizuojant vandeninius tirpalus, parodė didelį veiksmingumą prieš bakterijas, sporas, virusus ir mikobakterijas, taip pat esant bioplėvelėms [12–14].

Reglamentavimo požiūriu šių sistemų veiksmingumas vertinamas remiantis Europos ir tarptautiniais standartais: UNI EN 13727:2015 baktericidiniame aktyvume [15], UNI EN 17126:2019 sporicidiniame aktyvume [16], UNI EN 14476:2019 virucidiniame aktyvume [17], UNI EN 13624:2022 fungicidiniame ir mielicidiniame aktyvume [18] ir UNI EN 14348:2005 mikobaktericidiniame aktyvume [19]. Jie suteikia pagrindą veiksmingumui vertinti ir palyginti su tradiciniais metodais.

Šiame tyrime nagrinėjama EC STER sistema sterilizavimo poveikiui pasiekti naudoja kontroliuojamą labai reaktyvių redukuojančių savybių turinčių laisvųjų radikalų generavimą. Sistema jau tiekama rinkai ir gaminama taikant kokybės užtikrinimo sistemą, atitinkančią UNI EN ISO 9001:2015 [20], UNI EN ISO 13485:2021 [21] ir Reglamento (ES) 2017/745 [22] reikalavimus. Atlikti mikrobiologiniai bandymai pagal pirmiau minėtus pagrindinius UNI EN standartus parodė veiksmingumą prieš įvairius kliniškai reikšmingus mikroorganizmus.

Pažymėtina, kad erbio lazerių rankiniai antgaliai ir diodinių lazerių skaidulos paprastai sterilizuojami autoklave. Tačiau aukšta temperatūra ir garai gali sumažinti šių instrumentų veiksmingumą ir sutrumpinti jų naudojimo trukmę. Todėl šaltosios sterilizacijos sistema, kurios poveikis būtų palyginamas su autoklavo poveikiu, bet nebūtų minėtų nepageidaujamų padarinių, galėtų padėti ilgiau išsaugoti lazerių skaidulas ir jų eksploatacines savybes. Šio tyrimo tikslas – kiekybiniu suspensijos metodu palyginti EC STER redukuojančių laisvųjų radikalų sistemos mikrobicidinį veiksmingumą su standartiniu autoklavo ciklu, įtraukiant ir sudėtingas kliniškes situacijas imituojančias sąlygas, pavyzdžiui, kelių padermių bioplėveles.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Mikroorganizmų atranka ir paruošimas

Atrinkti trys klinikinio ir pramoninio požiūriu svarbūs mikroorganizmai: *Clostridioides difficile* (R027 NCTC 13366) – oportunistinis patogenas, gebantis formuoti atsparias ir išliekančias bioplėveles; *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) – indikatorinis mikroorganizmas, naudojamas sporicidinio aktyvumo tyrimuose dėl atsparių sporų; ir *Bacillus cereus* (ATCC 9634) – aplinkoje ir klinikinėje praktikoje aptinkamas mikroorganizmas, pasižymintis gebėjimu prisitvirtinti ir formuoti bioplėveles.

Padermės augintos iki stacionariosios fazės ir standartizuotos nuoseklaus skiedimo metodu pagal UNI EN 13727 reikalavimus [15]. Išgrynintos sporos ir subrendusios bioplėvelės paruoštos 96

šulinėlių mikrotitravimo plokštelėse, laikantis griežtų anaerobinių protokolų, taikant šiluminį šoką ir auginimą BHIS sultinyje, papildytame 0,1 M gliukozės bioplėvelės formavimuisi skatinti.

Po neutralizavimo kultūros pasėtos ant triptono sojų agarų (TSA) ir inkubuotos 24 valandas, kad būtų suskaičiuoti kolonijas sudarantys vienetai (KSV) ir apskaičiuotas logaritminis sumažėjimas.

C. difficile sporos buvo gaminamos ir gryninamos laikantis griežtų anaerobinių protokolų, įskaitant šiluminį šoką ir pasėjimą į BHIS terpę anaerobinėje aplinkoje (37 °C).

Po augimo viena kolonija perkelta į BHIS sultinį ir inkubuota 14–18 valandų. Suspensija sureguliuota iki 1×10^7 ląstelių/ml, papildant 0,1 M gliukoze bioplėvelės formavimuisi skatinti.

Į kiekvieną 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės šulinėlį įpilta po 100 µl inokulianto ir 24 valandas inkubuota anaerobinėmis sąlygomis 37 °C temperatūroje, kad subręstų prisitvirtinusi biomasė.

Švelniai plaunant iš anksto redukuotu fosfatinu buferiniu druskos tirpalu (PBS), pašalintos laisvos ląstelės ir palikta tik bioplėvelės biomasė prieš apdorojimą.

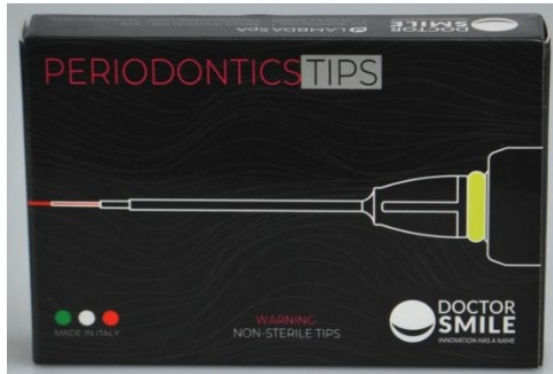
Naudota padermė persėta iš pradinės kultūros pagal gamintojo protokolą (žr. pridėtą schemą), kad redukuojančių laisvųjų radikalų generatorius nesiliestų su maistinių terpių likučiais ar kitomis medžiagomis.

Svarbu atskirti sąvokas „naudotas inokuliatas“ ir „pradinis skaičius“. „Naudotas inokuliatas“ – standartizuotas mikrobinės suspensijos kiekis, bandymo pradžioje užneštas ant bandomųjų nešiklių pagal EN standartų (pvz., EN 13727 ir EN 13697) reikalavimus. Ši vertė atitinka minimalų metodologinį reikalavimą, užtikrinantį bandymo tinkamumą.

„Pradinis skaičius“ – faktinis mikroorganizmų kiekis, atgautas ir kiekybiškai nustatytas prieš pat apdorojimą. Jis didesnis už pradinį inokuliatą, nes po užnešimo mikroorganizmai prisitvirtina ir dauginasi ant bandomojo paviršiaus, todėl reali koncentracija siekia apie 10^6 – 10^7 KSV/ml. Logaritminiam sumažėjimui apskaičiuoti naudojamas „pradinis skaičius“, nes jis atspindi tikrąjį mikrobinį krūvį, kurio atžvilgiu vertintas EC STER sistemos poveikis.

2.2. Naudoti medicininiai instrumentai

Tyrime naudoti įvairių kampų ir skaidulų skersmenų lazerių rankiniai antgaliai bei galvutės (1–3 pav.). Jie parinkti taip, kad atspindėtų įvairias kliniškes situacijas: nuo tiesioginio lengvai pasiekiamų paviršių apdorojimo iki spinduliuotės nukreipimo į vidines ar sunkiai pasiekiamas sritis. Skirtingi spinduliavimo kampai leido vertinti sterilizavimo sistemos veiksmingumą esant sudėtingai instrumentų geometrijai. Autoklave sterilizuojamos nuimamos dalys buvo apdorojamos atskirai pagal atitinkamuose UNI EN standartuose nustatytas įprastas procedūras.



(A)



(B)

1 pav. Diodinio lazerio antgaliai „White/Blue Fiber LAACS018.6“: (A) scheminis brėžinys; (B) standartinių diodinio lazerio antgalių rinkinys. Baltos ir mėlynos skaidulos naudojamos skirtingomis veikimo sąlygomis ir užtikrina tolygų energijos pasiskirstymą.



2 pav. Įvairaus skersmens erbio lazerio antgaliai.



3 pav. (a) Visas „WISER 3 BLUE“ rankinis antgalis (be blokavimo įtaiso) su nuimama autoklavuojama cilindrine dalimi LATPA 402.4, naudotas kaip pagrindinis instrumentas; (b) 0° erbio lazerio rankinis antgalis, II versija LOMAN 018.3, skirtas tiesioginiam naudojimui, kai spinduliuotė statmena apdorojamam paviršiui; (c) 110° laisvo spindulio rankinis antgalis, II versija LOMAN 018.9, leidžiantis nukreipti lazerį kampu į sunkiau pasiekiamas vietas; (d) 90° erbio lazerio rankinis antgalis, II versija LOMAN 018.2, skirtas sunkiai pasiekiamiems šoniniams arba vidiniams paviršiams.

2.3. Tirpalų paruošimas

EC STER tirpalas paruoštas 0,45 % koncentracijos (4,5 g/l; partija 03/2025; vidinis kodas ICM/01/25), skiedžiant vandentiekio vandeniu. Tirpalas laikytas kambario temperatūroje ir naudotas praėjus 30 minučių po paruošimo. Prieš naudojimą išmatuotas pH.

2.4. Auginimo terpės ir neutralizatorius

Naudotas triptono sojų agaras (TSA): kazeino kasos fermentų hidrolizatas – 15 g, sojų peptonas – 5 g, NaCl – 5 g, agaras – 15 g, vanduo iki 1000 ml. Neutralizatoriaus sudėtis 1000 ml vandens: Tween 80 – 30 g, sojų lecitinas – 1 g, L-histidinas – 1 g, natrio tiosulfatas – 5 g.

2.5. Įranga ir laboratoriniai indai

Drėgnosios šilumos sterilizavimo įranga: autoklavas, galintis palaikyti 135 °C temperatūrą 5 minutes. Vandens vonelės, kuriose palaikoma 20 ± 1 °C ir 45 ± 1 °C temperatūra. Inkubatorius, galintis palaikyti 36 ± 1 °C arba 37 ± 1 °C, taip pat 30 ± 1 °C temperatūrą; visoms konkrečaus bandymo, jo kontrolės ir validavimo inkubacijoms turi būti naudojama ta pati temperatūra. pH matuoklis, kurio kalibravimo tikslumas $\pm 0,1$ pH vieneto esant 25 °C. Kita būtina įranga:

chronometras; elektromechaninė purtyklė (pvz., „Vortex“); mėgintuvėliai, kultūrų buteliukai ar tinkamos talpos indai; 10 ml, 1 ml ir 0,1 ml nominalios talpos graduotos pipetės (galima naudoti kalibruotas automatinės pipetės); 90–100 mm skersmens Petri lėkštelės; orbitinė mechaninė purtyklė; centrifuga, galinti pasiekti 3000 aps./min.; mikroskopas, pageidautina fazinio kontrasto, didinantis bent 400 kartų.

2.6. Užteršimo procedūra

Paruošta 1000 ml bakterijų suspensijos, ji homogenizuota ir padalyta į dvi 500 ml dalis. Prietaisai 30 min. panardinti į mikroorganizmų suspensijas 22–25 °C temperatūroje, siekiant imituoti tiesioginį užteršimą esant apibrėžtai sąlyčio trukmei. Išėmus iš suspensijos, prietaisai džiovinti 37 °C temperatūroje, kad mikroorganizmai prisitvirtintų ir prasidėtų bioplėvelės formavimasis.

Tiriamosios grupės buvo šios:

A grupė: apdorojimas EC STER (1 min.), po to panardinimas į neutralizuojantį tirpalą 5 min.

B grupė: sterilizavimas autoklave (135 °C, 5 min.) pakuotėse, atitinkančiose UNI EN 868-1, 868-3 ir 868-5.

Po sąlyčio su bakterijų suspensija prietaisai išimti, perkelti į sterilius padėklus ir inkubuoti 37 °C temperatūroje, kol visiškai išdžiūvo, kad būtų skatinamas mikroorganizmų prisitvirtinimas ir galimas pradinis bioplėvelės formavimasis.

Autoklavui skirti prietaisai iš anksto supakuoti į specialius popieriaus ir polimerinės plėvelės laminato maišelius, atitinkančius UNI EN 868-1, UNI EN 868-3 ir UNI EN 868-5 reikalavimus bei tinkamus sterilizavimui garais.

Sterilizavimas atliktas autoklave 135 °C temperatūroje 5 min., vadovaujantis Europos farmakopėjoje ir atitinkamuose techniniuose standartuose (UNI EN 285, UNI EN 554) aprašyta prisotintų garų sterilizavimo metodika.

EC STER sistemai (redukuojančių laisvųjų radikalų generatoriui) priskirti prietaisai panardinti į 500 ml aktyviojo tirpalo; tokio tūrio reikėjo visiems apdorojamiems paviršiams visiškai apsemti. Pasibaigus gamintojo nurodytai 1 min. sąlyčio trukmei, prietaisai perkelti į specialų neutralizuojantį tirpalą ir jame laikyti 5 min. – tiek laiko pakako visiškai inaktyvuoti veikliąją medžiagą.

2.7. Mikroorganizmų paruošimas

Šaltosios sterilizacijos sistemos veiksmingumui įvertinti parinktos skirtingos bakterijų padermės, atspindinčios atsparumą dezinfekavimo priemonėms: Clostridioides difficile – kliniškai svarbus anaerobinis, sporas formuojantis patogenas; Bacillus spizizenii (anksčiau Bacillus subtilis) – standartinė sporicidinio aktyvumo vertinimo etaloninė padermė; ir Bacillus cereus – papildoma sporas formuojanti rūšis, svarbi tiek aplinkos, tiek klinikiniu požiūriu. 1 lentelėje apibendrintos eksperimentiniuose bandymuose taikytos auginimo sąlygos ir inokulianto kiekiai.

1 lentelė. Tirtos bakterijų padermės, auginimo sąlygos, inokuliatas ir logaritminis sumažėjimas.

Padermė	Auginimo sąlygos	Reikalaujamas inokuliatas (KSV/ml)	Naudotas inokuliatas (KSV/ml)	Pradinis kiekis (KSV/ml)	Galutinis kiekis (KSV/ml)	Log sumažėjimas
Clostridioides difficile R027 NCTC 13366	Anaerobinės, TSA	1,5–5,0 × 10 ⁶	1,2 × 10 ²	≈1 × 10 ⁷	<10 (LOD)	>7

Bacillus spizizenii ATCC 6633	TSA (1–2 d., 36 °C)	1,5–5,0 × 10 ⁶	3,1 × 10 ²	≈5 × 10 ⁶	<10 (LOD)	>6,7
Bacillus cereus ATCC 9634	TSA (1–2 d., 36 °C)	1,5–5,0 × 10 ⁶	2,2 × 10 ²	≈8 × 10 ⁶	<10 (LOD)	>6,9

2.8. Mikroorganizmų atgavimas ir skaičiavimas

Po apdorojimo likę mikroorganizmai surinkti išplaunant 500 ml sterilaus vandens ir mechaniškai nugrindant paviršius steriliomis mentelėmis, siekiant atskirti bioplėveles ir prisitvirtinusias ląsteles. Gautas išplovimo skystis nuosekliai skiestas ir pasėtas ant TSA terpės. Lėkštelės inkubuotos 37 °C temperatūroje 24–48 val., tada suskaičiuotos kolonijos ir apskaičiuotas mikroorganizmų kiekio logaritminis sumažėjimas. Kiekvienas bandymas atliktas dviem pakartojimais.

3. Rezultatai

Eksperimentiniai bandymai atlikti trimis pakartojimais. Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN < 0,3 log). Nedidelis rezultatų kintamumas tarp pakartojimų patvirtina rezultatų atkuriamumą ir patikimumą.

Abu sterilizacijos bandymai pradėti nuo vienodos pradinės mikroorganizmų apkrovos (6,81 ± 0,12 log₁₀ KSV/ml), gautos iš mišrios bioplėvelės suspensijos, sudarytos iš Clostridioides difficile, Bacillus spizizenii ir Bacillus cereus.

Kiekvieno mikroorganizmo pradinės ir galutinės vertės išreikštos KSV/ml. Kai rezultatas buvo mažesnis už metodo aptikimo ribą (LOD = 10 KSV/ml, t. y. maždaug 1 log₁₀ KSV/ml), jis žymėtas „< LOD“; tai atitiko didesnę kaip 6 log sumažėjimą.

Po apdorojimo nei EC STER sistema apdorotoje grupėje, nei autoklavo grupėje bakterijų augimo neaptikta; tai rodo, kad likusi mikroorganizmų apkrova buvo mažesnė už metodo aptikimo ribą. Taigi abiem sterilizavimo metodais pasiektas didesnis nei 6 log₁₀ mikroorganizmų kiekio sumažėjimas. Tai rodo visišką tirtų mikroorganizmų inaktyvavimą. Visuose bandymuose sumažėjimas viršijo metodologiškai nustatytą visiško sterilizavimo slenkstį. Pradinės bakterijų suspensijos koncentracijos, metodo validavimas ir neutralizatoriaus patikra patvirtino eksperimentinių sąlygų tinkamumą (2 lentelė).

2 lentelė. Tyrimams naudotų mikroorganizmų suspensijų koncentracija.

Padermė	Koncentracija (KSV/ml)	Reikalavimas (KSV/ml)	Atitinka
Clostridioides difficile	1,2 × 10 ²	≥1,0 × 10 ⁶	Taip
Bacillus spizizenii	3,1 × 10 ²	≥1,0 × 10 ⁶	Taip
Bacillus cereus	2,2 × 10 ²	≥1,0 × 10 ⁶	Taip
Iš viso	6,5 × 10 ²	≥1,0 × 10 ⁶	Taip

Neutralizatoriaus veiksmingumas patikrintas suspensijos bandymais su pasirinktomis bakterijų padermėmis. Patvirtinta, kad neutralizatorius neturėjo liekamojo antimikrobinio poveikio ir gyvybingų mikroorganizmų atgavimas atitiko reikalavimus (3 lentelė).

3 lentelė. Neutralizatoriaus veikimo validavimo suspensijos koncentracija.

Padermė	Koncentracija (KSV/ml)	Reikalavimas (KSV/ml)	Atitinka
Clostridioides difficile	2,7 × 10 ⁴	3,0 × 10 ⁴ –1,6 × 10 ⁵	Taip
Bacillus spizizenii	3,1 × 10 ⁴	3,0 × 10 ⁴ –1,6 × 10 ⁵	Taip
Bacillus cereus	3,2 × 10 ⁴	3,0 × 10 ⁴ –1,6 × 10 ⁵	Taip

Siekiant užtikrinti eksperimentinės procedūros patikimumą, metodas ir neutralizuojantis tirpalas validuoti naudojant tris reprezentatyvius mikroorganizmus: C. difficile, B. spizizenii ir B. cereus.

Rezultatai patvirtino, kad buvo laikomasi minimalių inokulianto reikalavimų, neutralizatorius nebuvo toksiškas ir pasižymėjo pakankamu neutralizuojamuoju pajėgumu (4 lentelė).

4 lentelė. Metodo ir neutralizatoriaus validavimas.

Padermė	Aprašymas	Reikalavimas (KSV/ml)	Rezultatas (KSV/ml)	Atitinka
Clostridioides difficile	Metodo validavimas	$\geq 1,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	Taip
	Neutralizatoriaus netoksiškumas			Taip
	Neutralizavimo geba			Taip
Bacillus spizizenii	Metodo validavimas	$\geq 3,1 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	Taip
	Neutralizatoriaus netoksiškumas			Taip
	Neutralizavimo geba			Taip
Bacillus cereus	Metodo validavimas	$\geq 2,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	Taip
	Neutralizatoriaus netoksiškumas			Taip
	Neutralizavimo geba			Taip

Šie rezultatai rodo, kad nei metodas, nei neutralizatorius netrukdė bandymo rezultatams ir leido patikimai vertinti vėliau atliktų sterilizavimo bandymų duomenis. Bandymo suspensijos koncentracija buvo 6,81 log.

Po metodo validavimo įvertintas etaloninis sterilizavimo autoklave ciklas (135 °C, 5 min., kontroliuojamas slėgis). Toliau pateiktoje lentelėje apibendrinti rezultatai rodo, kad po apdorojimo autoklave aptinkamų mikroorganizmų nebeliko, o jų kiekis sumažėjo iki metodo aptikimo ribos (5 lentelė).

5 lentelė. B grupė – sterilizavimas autoklave (135 °C, 5 min., kontroliuojamas slėgis).

Padermių mišinys	Pradinis kiekis ($\log_{10}$ KSV/ml)	Galutinis kiekis ($\log_{10}$ KSV/ml)	Log sumažėjimas	SN (log)	Vertinimas
Mišri bioplėvelė (C. difficile, B. spizizenii, B. cereus)	$6,81 \pm 0,12$	<1,00 (LOD)	>6,8	0,28	Veiksminga

Redukuojančiais laisvaisiais radikalais pagrįstos šaltosios sterilizacijos sistemos EC STER veiksmingumas įvertintas tokiomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis kaip ir sterilizavimo autoklave ciklas, naudojant 4,5 g/l produkto koncentraciją ir 1 min. sąlyčio laiką.

Taikant šį apdorojimą pasiektas mikroorganizmų kiekio sumažėjimas, panašus į gautą sterilizuojant autoklave: bakterijų kiekis sumažėjo iki metodo aptikimo ribos (6 lentelė).

6 lentelė. A grupė – sterilizavimas EC STER (4,5 g/l, sąlyčio trukmė 1 min.).

Padermių mišinys	Pradinis kiekis ($\log_{10}$ KSV/ml)	Galutinis kiekis ($\log_{10}$ KSV/ml)	Log sumažėjimas	SN (log)	Vertinimas
Mišri bioplėvelė (C. difficile, B. spizizenii, B. cereus)	$6,81 \pm 0,12$	<1,00 (LOD)	>6,8	0,28	Veiksminga

Šie rezultatai rodo, kad EC STER sistema gali užtikrinti veiksmingą sterilizavimą net esant didelei pradinei mikrobinei apkrovai ir bioplėvelių struktūroms; tai patvirtina jos potencialą kaip alternatyvos karščiui jautrių medicinos priemonių terminiam sterilizavimui.

Aktyvieji bandomieji tirpalai išliko stabilūs visos procedūros metu. Aktyviojo tirpalo stabilumas buvo vertinamas per visą procesą (30 min. paruošimo ir 1 min. sąlyčio) stebint pH ir pakartotinai tikrinant veiksmingumą; nustatytas nuoseklus poveikis. Rezultatai atitiko tikėtiną redukuojančių radikalų rūšių stabilumo šarminėje aplinkoje tendenciją [23].

4. Aptarimas

Gauti duomenys patvirtina, kad redukuojančių laisvųjų radikalų technologija gali būti tinkama garinio sterilizavimo alternatyva, ypač karščiui jautrioms medžiagoms ir priemonėms [8,9,12]. Tai, kad rezultatai gauti naudojant eksperimentinį kelių padermių bioplėvelės modelį, suteikia išvadoms papildomo pagrįstumo, nes toks modelis imituoja realias ligoninėse pasitaikančias užterštumo situacijas [14].

Palyginus šiuos rezultatus su ankstesniais tyrimais matyti, kad oksiduojančiomis medžiagomis arba plazma pagrįstos žematemperatūros sistemos pasiekė $\geq 6 \log_{10}$ bakterijų sporų ir virusų kiekio sumažėjimą, tačiau kartais joms reikėjo ilgesnio sąlyčio laiko arba sudėtingesnių veikimo sąlygų [10,11,24]. EC STER sistema išsiskiria itin trumpa apdorojimo trukme (1 min.), todėl gali būti ypač tinkama klinikinėms įstaigoms, kuriose instrumentai naudojami intensyviai.

Kalbant apie klinikinį taikymą, literatūroje aprašyti bandomieji panašių sistemų naudojimo odontologijoje ir ambulatorinėje chirurgijoje tyrimai. Juose redukuojančių laisvųjų radikalų sterilizavimas buvo siejamas su užterštumo nebuvimu po apdorojimo ir geresniu instrumentų fizinių savybių išsaugojimu, palyginti su gariniu sterilizavimu [13,25,26]. Tačiau didelės apimties kontroliuojamų klinikinių tyrimų vis dar nedaug, todėl būtini tolesni tyrimai veiksmingumui įprastinėmis naudojimo sąlygomis patvirtinti.

Gauti rezultatai patvirtina, kad redukuojančių laisvųjų radikalų pagrindu veikianti šaltojo sterilizavimo sistema gali pasiekti mikroorganizmų kiekio sumažėjimą, prilygstantį autoklavo ciklui. Todėl ji ypač patraukli temperatūrai jautrioms priemonėms, kurioms šilumos poveikis būtų žalingas arba nepraktiškas.

Mišrių kultūrų ir *C. difficile* bioplėvelės sąlygų naudojimas didina tyrimo reikšmę ir jo klinikinio pritaikymo galimybes, nes toks modelis labiau atitinka sudėtingą užterštumą kritiškai svarbiose sveikatos priežiūros aplinkose.

Mūsų rezultatai rodo, kad redukuojančiais radikalais pagrįsta technologija yra perspektyvi įprastinio garinio sterilizavimo alternatyva, ypač karščiui jautrioms medžiagoms ir instrumentams [8,9,12]. Net esant sudėtingoms kelių padermių bioplėvelėms pasiektas mikroorganizmų kiekio sumažėjimas leidžia manyti, kad EC STER gali užtikrinti standartiniam autoklavo ciklui prilygstantį veiksmingumą, kartu gerokai sutrumpinant apdorojimo trukmę.

Produkto veikimo pagrindas – redukuojantys laisvieji radikalai, susidarantys šarminio pH vandeniniame tirpale. Jų veikimo mechanizmas pagrįstas elektronų perdavimu, kuris veikia mikroorganizmų baltymų struktūras, sukelia negrįžtamus cheminius pažeidimus ir lemia neatidėliotiną mikroorganizmų inaktyvaciją. Šis mechanizmas skiriasi nuo įprastinių oksiduojančių medžiagų veikimo ir, kaip teigia autoriai, dėl radikalų redukuojančių savybių bei šarminio tirpalo pH nesukelia oksidacijos reiškinių apdorotuose paviršiuose, todėl išsaugomas medicinos instrumentų vientisumas ir funkcionalumas.

EC STER purškiamosios formos sporicidinio aktyvumo bandymas, atliktas su užterštais medicinos instrumentais, parodė didesnę nei 8 log sporų kiekio sumažėjimą vos per 15 s sąlyčio. Autoriai šį rezultatą apibūdina kaip eksponentiškai viršijantį 6 log sumažėjimo ribą, kurią jie nurodo kaip būtiną sistemai pripažinti „sterilantu“; jų teigimu, tai rodo ne tik didelį produkto veiksmingumą, bet ir išskirtinį proceso greitį. Autorių teigimu, toks greitas sterilizavimas reikšmingai sumažina darbuotojų užsikrėtimo riziką, nes mikroorganizmai inaktyvuojami dar prieš jiems galint migruoti arba pasklisti į aplinką.

Palyginimas su literatūros duomenimis rodo, kad kitos šaltojo sterilizavimo sistemos, pavyzdžiui, plazma arba oksiduojančios medžiagos, taip pat gali pasiekti ≥ 6 log mikroorganizmų kiekio sumažėjimą, tačiau dažnai reikalauja ilgesnio poveikio arba sudėtingesnių veikimo sąlygų [10,11,24]. EC STER gebėjimas pasiekti panašų veiksmingumą per itin trumpą laiką gali būti ypač naudingas klinikinėse įstaigose, kuriose būtina greita instrumentų apyvarta.

Veikimo mechanizmo požiūriu redukuojantys radikalai veiksmingai veikia sudėtingas mikroorganizmų struktūras, įskaitant subrendusias bioplėveles ir sporas. Tai paaiškina stebėtą poveikį net tokiems atspariems mikroorganizmams kaip *Clostridioides difficile*. Be to, šiluminio poveikio nebuvimas yra papildomas pranašumas prieš sterilizavimą autoklave: jautrūs prietaisai, pavyzdžiui, lazerių antgaliai ir optinės skaidulos, gali būti apdorojami nepažeidžiant jų funkcionalumo. Tai svarbu kasdienėje klinikinėje praktikoje, kur būtina išsaugoti ir sterilumą, ir instrumentų veikimo savybes.

Redukuojančiais radikalais pagrįstas šaltasis sterilizavimas yra novatoriškas, greitas ir saugus metodas. Gebėjimas per kelias sekundes inaktyvuoti daugiau kaip 8 log sporų, kartu išsaugant apdorojamus paviršius ir išvengiant šiluminio poveikio, leidžia autoriams vertinti EC STER kaip potencialiai revoliucinį sprendimą karščiui jautrių instrumentų apdorojimo srityje, galintį turėti reikšmingą poveikį infekcijų prevencijai ir klinikinio darbo organizavimui.

Vis dėlto šis tyrimas turi tam tikrų ribotumų: bandymai atlikti in vitro ir su ribotu mikroorganizmų padermių skaičiumi. Todėl būtina patvirtinti rezultatus realiomis klinikinėmis sąlygomis, įtraukiant platesnį instrumentų ir mikroorganizmų spektrą, taip pat įvertinti ilgalaikį medžiagų suderinamumą po pakartotinių apdorojimo ciklų. Ateityje kontroliuojami klinikiniai tyrimai ir didelės apimties bandymai galėtų suteikti papildomos informacijos apie šios technologijos saugumą, ekonominį tvarumą ir poveikį aplinkai. Ypač svarbūs bus sąnaudų, priežiūros poreikio ir ciklų trukmės palyginimai su įprastais metodais, kurie padėtų pagrįsti jos taikymą sveikatos priežiūroje ir pramonėje.

Apibendrinant galima teigti, kad redukuojančiais radikalais pagrįstas šaltasis sterilizavimas yra perspektyvus metodas, derinantis greitą antimikrobinį poveikį su jautrių instrumentų išsaugojimu. Nors gauti rezultatai teikia vilčių, prieš rekomenduojant plačiai taikyti šią technologiją būtinas papildomas patvirtinimas realiomis klinikinėmis sąlygomis.

ICM Srl (Portigliola, Kalabrija, Italija) sukurtas ir patentuotas EC STER produktas yra vandeninis tirpalas, kuriame yra pirmtakų, galinčių generuoti redukuojančius laisvuosius radikalus esant šarminiam pH (apie 9). Elektronų perdavimu pagrįstas veikimo mechanizmas negrįžtamai pažeidžia mikroorganizmų baltymų struktūras ir užtikrina neatidėliotiną inaktyvaciją, autorių teigimu, nesukeldamas oksidacinio poveikio apdorojamiems paviršiams. Šis metodas iš esmės skiriasi nuo tradicinių oksiduojančių dezinfekantų ir padeda išsaugoti karščiui jautrių priemonių vientisumą bei funkcionalumą.

Trys mikroorganizmai – *Clostridioides difficile*, *Bacillus spizizenii* ir *Bacillus cereus* – buvo pasirinkti dėl jų, kaip atsparių modeliųjų mikroorganizmų, savybių: jie sudaro sporas arba bioplėveles ir dažnai naudojami standartiniuose sterilizavimo bandymuose.

Per 1 min. sąlyčio laikotarpį laisvųjų radikalų koncentracija nebuvo tiesiogiai stebima spektrofotometriniais ar chromatografiniais metodais. Tačiau aktyvaus tirpalo stabilumas buvo vertinamas netiesiogiai, atliekant pakartotinius veiksmingumo bandymus ir nuolat stebint pH per 30 min. paruošimo etapą bei paskesnę 1 min. apdorojimą. Pakartojimų mikroorganizmų inaktyvacijos rezultatų atkuriamumas (standartinis nuokrypis $<0,3$ log) patvirtino, kad radikalų aktyvumas išliko visą sąlyčio laikotarpį. Toks netiesioginis vertinimo būdas atitinka kitus radikalais pagrįstų sterilizavimo sistemų tyrimus, kuriuose veiksmingumas ir pH stabilumas naudojami kaip radikalų išlikimo rodikliai. Kaip aptarė Karogodina ir kt. [23], cheminiai veiksniai, tokie kaip pH, redukuojanti aplinka ir oksidatorių nebuvimas, gali užtikrinti radikalų stabilumą reikšmingais laiko intervalais.

Buvo parodytas medžiagų suderinamumas: net ir po pakartotinių ciklų lazerių antgaliuose ir optinėse skaidulose nepastebėta korozijos, drumstumo ar funkcionalumo praradimo požymių.

Palyginamoji sąnaudų analizė parodė, kad naudojant EC STER, palyginti su sterilizavimu autoklave, sutaupoma 25–30 % dėl mažesnio eksploatacinių medžiagų naudojimo, mažesnio energijos suvartojimo ir mažesnio instrumentų dėvėjimosi.

Cheminis saugumas buvo patvirtintas tiriant išplovus ir atliekant chemines analizes, kurių metu ant apdorotų instrumentų neaptikta toksiškų likučių.

Šie rezultatai, vertinami kartu su techniniu dosjė, rodo, kad EC STER gali užtikrinti greitą sterilizavimą ir didesnę nei 7–8 log mikroorganizmų kiekio sumažėjimą net sudėtingomis bandymo sąlygomis („dirty/clean“) per itin trumpą laiką (15–30 s). Laboratorinių duomenų derinimas su stebėjimais, atliktais naudojant tikrus instrumentus, sustiprina sistemos klinikinio ir praktinio pritaikymo pagrindimą.

5. Išvados

Ištirta sistema yra tinkama, veiksminga ir saugi alternatyva tradicinei sterilizacijai autoklave. Jos veiksmingumas sudėtingomis eksperimentinėmis sąlygomis, įskaitant bioplėveles ir mišrias kultūras, rodo galimą pritaikymą sveikatos priežiūros ir pramonės srityse. Papildomas privalumas – galimybė išsaugoti jautrių instrumentų, tokių kaip lazerių rankiniai antgaliai ir skaidulos, veiksmingumą ir ilgaamžiškumą, kuriems aukštos temperatūros sterilizavimas gali pakenkti. Vis dėlto tyrimą reikės papildyti tolesniais medžiagų suderinamumo bandymais ir patvirtinimu realiomis naudojimo sąlygomis.

Autorių indėlis

Tyrimo koncepcija – C. C. ir S. B.; metodika – C. C.; validavimas – C. C.; formalioji analizė – C. C.; tyrimas – C. C.; ištekliai – C. C. ir S. B.; duomenų tvarkymas – C. C. ir D. B.; pirminio rankraščio rengimas – C. C. ir D. B.; peržiūra ir redagavimas – C. C., S. B. ir D. B.; priežiūra – C. C.; projekto administravimas – C. C. ir S. B.; finansavimo gavimas – C. C. ir S. B. Visi autoriai perskaitė ir patvirtino paskelbtą rankraščio versiją.

Finansavimas

Šį tyrimą finansavo ICM SRL, C/DA TORRE, SNC, Portigliola (RC), Italija.

Institucinės etikos komisijos pareiškimas

Netaikoma.

Informuoto sutikimo pareiškimas

Netaikoma.

Duomenų prieinamumo pareiškimas

Pirminiai šiame tyrime pateikti duomenys yra įtraukti į straipsnį; dėl papildomos informacijos galima kreiptis į atsakingąjį autorių.

Padėka

Autoriai dėkoja EC STER sistemos išradėjui Felice Alberto Martelli už techninę pagalbą ir vertingas įžvalgas apie įrenginį. Taip pat dėkojama Lambda S.p.A. (Brendola, Vičencos provincija, Italija) už tyrime naudotas medžiagas ir instrumentus. EC STER Spray varianto sporidinio veiksmingumo bandymą su medicinos priemonėmis atliko Eurolab. Dantų implantų bioplėvelės tyrimą atliko Perudžos universitetas (UNIPG).

Interesų konfliktai

Autorius Christian Cirillo dirbo bendrovėje Eurolab S.r.l. Kiti autoriai pareiškia, kad tyrimas atliktas nesusijęs su komercinių ar finansinių ryšių, kuriuos būtų galima laikyti galimu interesų konfliktu.

Santrumpos

NCTC – Nacionalinė tipinių kultūrų kolekcija; ATCC – Amerikos tipinių kultūrų kolekcija; TSA – triptono sojų agaras; CFU (KSV) – kolonijas sudarantis vienetas; BHIS – papildais praturtinta smegenų ir širdies infuzinė terpė; ICM – pradinis mikrobinis užterštumas.

Literatūros sąrašas

1. Rutala, W.A.; Weber, D.J. Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: An Overview. *Am. J. Infect. Control* 2016, 44, e1–e6. [CrossRef] [PubMed]
2. McDonnell, G.; Russell, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12, 147–179. [CrossRef] [PubMed]
3. Lerouge, S.; Wertheimer, M.R.; Yahia, L.H. Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations. *Plasma Process. Polym.* 2001, 8, 175–188. [CrossRef]
4. Rogers, J.V.; Sabourin, C.L.; Choi, Y.W.; Richter, W.R. Evaluation of Ethylene Oxide Sterilization for Medical Devices. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 105, 1643–1651.

5. Malchesky, P.S. Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization. *Artif. Organs*. 1993, 17, 147–452. [CrossRef] [PubMed]
6. Mannion, P.T. The use of peracetic acid for the reprocessing of flexible endoscopes and rigid cystoscopes and laparoscopes. *J. Hosp. Infect.* 1995, 29, 313–315. [CrossRef] [PubMed]
7. Baldry, M.G. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J. Appl. Bacteriol.* 1983, 54, 417–423. [CrossRef] [PubMed]
8. Dukan, S.; Touati, D. Hypochlorous Acid Stress in *Escherichia coli*: Resistance, DNA Damage, and Comparison with Hydrogen Peroxide Stress. *J. Bacteriol.* 1996, 178, 6145–6150. [CrossRef] [PubMed]
9. Block, S.S. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2001.
10. O'Connor, N.; Cahill, O.; Daniels, S.; Galvin, S.; Humphreys, H. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *J. Hosp. Infect.* 2014, 88, 59–65. [CrossRef] [PubMed]
11. Fridman, G.; Friedman, G.; Gutsol, A.; Shekhter, A.B.; Vasilets, V.N.; Fridman, A. Applied Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym.* 2008, 5, 503–533. [CrossRef]
12. Maillard, J.Y. Bacterial Target Sites for Biocide Action. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92, 16S–27S. [CrossRef] [PubMed]
13. Leprat, R.; Michel, M.; Bayon-Auboyer, M.H. Evaluation of a Cold Sterilization System for Dental Instruments. *J. Dent. Res.* 2018, 97, 1356–1362.
14. Bridier, A.; Briandet, R.; Thomas, V.; Dubois-Brissonnet, F. Resistance of Bacterial Biofilms to Disinfectants: A Review. *Biofouling* 2011, 27, 1017–1032. [CrossRef] [PubMed]
15. UNI EN 13727:2015; Disinfettanti Chimici ed Antisetici—Prova Quantitativa in Sospensione per la Valutazione Dell'attività Battericida in Area Medica—Metodo di Prova e Requisiti (Fase 2, Stadio 1). Ente Italiano di Normazione: Milano, Italia, 2015.
16. UNI EN 17126:2019; Valutazione Dell'attività Sporidica dei Disinfettanti Chimici in Ambito Medico. Ente Italiano di Normazione: Milano, Italia, 2019.
17. UNI EN 14476:2019; Prova Quantitativa in Sospensione per Attività Virucida in Area Medica. Ente Italiano di Normazione: Milano, Italia, 2019.
18. UNI EN 13624:2022; Prova Quantitativa in Sospensione per Attività Fungicida e Levuricida in Campo Medico. Ente Italiano di Normazione: Milano, Italia, 2022.
19. UNI EN 14348:2005; Valutazione Dell'attività Micobattericida dei Disinfettanti Chimici. Ente Italiano di Normazione: Milano, Italia, 2005.
20. UNI EN ISO 9001:2015; Sistemi di Gestione per la Qualità—Requisiti. Ente Italiano di Normazione: Milano, Italia, 2015.
21. UNI EN ISO 13485:2021; Dispositivi Medici—Sistemi di Gestione per la Qualità—Requisiti per Scopi Regolamentari. Ente Italiano di Normazione: Milano, Italia, 2021.
22. Sbrenni, S.; Conduce, A.; Di Sciacca, D. Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 5 aprile 2017, relativo ai dispositivi medici. *Gli Articoli* 2020, 33, 11–18.

23. Karogodina, T.Y.; Sergeeva, S.V.; Stass, D.V. Stability and reactivity of free radicals: A physicochemical perspective with biological implications. *Hemoglobin* 2011, 35, 262–275. [CrossRef] [PubMed]
24. Herrmann, H.W.; Henins, I.; Park, J.; Selwyn, G.S. Decontamination of Chemical and Biological Warfare (CBW) Agents Using an Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Phys. Plasmas* 1999, 6, 2284–2289. [CrossRef]
25. Jeng, D.K.; Woodworth, A.G. Evaluation of a Peracetic Acid-Based Cold Sterilization System for Endoscopes. *Am. J. Infect. Control* 1990, 18, 244–250.
26. Tuttlebee, C.M.; O'Donnell, M.J.; Keane, C.T.; Russell, R.J.; Sullivan, D.J.; Falkiner, F.; Coleman, D.C. Effective control of dental chair unit waterline biofilm and marked reduction of bacterial contamination of output water using two peroxide-based disinfectants. *J. Hosp. Infect.* 2002, 52, 192–205. [CrossRef] [PubMed]

Leidėjo pastaba. Visuose leidiniuose pateikti teiginiai, nuomonės ir duomenys priklauso tik atitinkamiems autoriams ir bendraautoriams, o ne MDPI ir (arba) redaktoriams. MDPI ir (arba) redaktoriai neprisiima atsakomybės už žmonėms ar turtui padarytą žalą, atsiradusią dėl publikacijoje minimų idėjų, metodų, instrukcijų ar produktų.