

RAZVOJ AEROSOLIZATORJA ZA  
RAZKUŽEVANJE RADIOLOŠKIH NAPRAV IN  
PROSTOROV Z UPORABO STERIPLANT<sup>®</sup>N  
TER OCENA MOŽNE TOKSIČNOSTI

Robert Pintarič

**Doktorska disertacija**  
**Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana**  
**Ljubljana, Slovenija**

**Mentor:** prof. dr. Metka Filipič, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija  
**Somentor:** prim. dr. Jože Matela, Univerzitetni klinični center, Maribor, Slovenija

**Komisija za oceno doktorske disertacije:**

prof. dr. Aleš Lapanje, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija  
prof. dr. Tomaž Šeruga, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija  
dr. Matjaž Novak, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLomsKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA  
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Robert Pintarič

RAZVOJ AEROSOLIZATORJA ZA RAZKUŽEVANJE  
RADIOLOŠKIH NAPRAV IN PROSTOROV Z UPORABO  
STERIPLANT<sup>®</sup>N TER OCENA MOŽNE TOKSIČNOSTI  
**Doktorska disertacija**

DEVELOPMENT OF AEROSOLIZATOR FOR  
DISINFECTION OF RADIOLOGICAL DEVICES AND  
ROOMS USING STERIPLANT<sup>®</sup>N AND ASSESSMENT  
**Doctoral Dissertation**

**Mentor:** prof. dr. Metka Filipič

**Somentor:** prim. dr. Jože Matela

Ljubljana, Slovenija, oktober 2024



*Staršem*



# Zahvala

Za nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu in pisanju ter usmerjanju se zahvaljujem mentorici prof. dr. Metki Filipič.

Vsem ostalim, ki ste prispevali k izdelavi tega dela, se iskreno zahvaljujem.



# Povzetek

Magnetna resonanca (MR) je diagnostična metoda s širokim spektrom uporabe v diagnostiki. Uporabljamo jo pri hospitaliziranih in ambulantnih pacientih. Preiskave, ki jih opravljamo v diagnostičnih prostorih MR so zaradi velike frekvence preiskav potencialno rezervar za patogene mikroorganizme in posledično prenos infekcijskih obolenj na paciente in osebe. Prostor magnetne resonance je težko optimalno in standardno očistiti in razkužiti. Iz tega razloga je pomembno zagotoviti ustrezne higienske in dezinfekcijske procese. Na tržišču ni optimalnih, adekvatnih, hitro delujočih in varnih dezinficijensov in dezinfekcijskih procesov, ki bi jih lahko uporabili na MR. Pri MR diagnostičnih napravah je sam proces dezinfekcije še posebej otežen zaradi privlačne magnetne sile 3.0 Tesla (T), ki je ves čas prisotna v diagnostičnem prostoru. Večina materialov, ki jih uporabljamo pri razkuževanju je nekompatibilnih s feromagnetnim poljem. Za dezinfekcijo v zdravstvu večinoma priporočajo metode z ultravioletnimi (UV) lučmi in UV roboti. Uporaba številnih agresivnih kemikalij, ki ne smejo biti v stiku s specialno prevlečenimi tuljavami in površinami v diagnostiki MR, ni priporočena. Seveda tudi vsa razkužila na podlagi alkohola so nevarna zaradi nastajajočega radiofrekvenčnega (RF) impulza med preiskavo, ki lahko povzroči samovžig in opekline.

Na tržišču so se pojavili novi materiali in metode s katerimi lahko izvedemo ustrezno dezinfekcijo tudi v zahtevnih diagnostičnih prostorih.

Zahvaljujoč mehanizmu elektrolizirane oksidirajoče vode (EOV), ki je opredeljena kot biocid nove generacije z njo lahko opravimo ustrezno dezinfekcijo. Princip pridobivanja EOV je danes že poznan. V osnovi se EOV proizvaja z elektrolizo razredčene (0,05–1 %) raztopine soli (NaCl). Z enosmerno napetostjo na elektrodah nastaneta dve vrsti vodnih raztopin z različnimi lastnostmi. Na anodi, tj. pozitivni elektrodi, nastane kislina vodna raztopina, imenovana kislina EO, na katodi, tj. negativni elektrodi, pa alkalna vodna raztopina, imenovana alkalna EO. Kislina EO ima poleg nizkega pH tudi visok oksidacijski potencial, vsebuje hipoklorovno kislino (HOCl) in naj bi imela močno baktericidno delovanje na različne patogene in nepatogene mikroorganizme. To visoko baktericidno aktivnost je mogoče pripisati nevtralnemu naboju HOCl, ki mu omogoča, da zlahka prodre skozi bakterijske celične stene in prekine ključne presnovne dejavnosti. Seveda EO deluje z kar nekaj mehanizmi. Poglavitno je delovanje na elektrone v okolici in na membrani, patogenih celic. Hladno zamegljevanje je nova metoda dezinfekcije. Za metodo hladnega zamegljevanja z EO potrebujemo aerosolizator za posebne pogoje s posebnimi mikrošobami, stisnjen zrak in EO. EO, ki jo uporabljamo pri hladnem zamegljevanju je Steriplant<sup>®</sup> N (Pintarič, 2015). Leta 2013 smo naredili OPTI-JET CS MD 1 MR aerosolizator z mikrošobami, ki so omogočale velikosti aerosolov 20-30 mikronov. Učinkovitost smo potrdili v diagnostičnih prostorih MR s porabo 6-8ml/m<sup>3</sup> EO. Z natančno analizo pri določevanju še delujočega biocida, ki smo ga uporabili v prostoru na površinah in v zraku smo določili minimalno še uporabno mejo za Steriplant<sup>®</sup> N. Rezultate smo potrdili s metodo aerosolizacije v prostoru v kateri smo uporabili lastnosti aerosolov. Aerosoli so dvofazni sistemi, ki vsebujejo mikro delce in plin v katerem so prisotni. Aerosoli

zgrajeni iz biocida Steriplant® N s pomočjo nanošob in aplicirani v takšni obliki v zrak imajo prednost in tudi slabost, ker lahko delujejo obremenjujoče za medicinsko osebje.

Toksikološka obremenitev v inhaliranih delcih je odvisna predvsem od njihovih fizikalnih kot tudi kemičnih lastnosti. Za oceno obremenitve prostora z aerosolom je potrebno razumevanje lastnosti in specifično delovanje aerosolov. V ta namen smo pripravili posebno simulacijsko komoro v kateri smo simulirali pogoje in izpostavili celice pljučnih fibroblastov. Raziskavo smo opravili na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) Ljubljana. Dokazali smo tudi citotoksičnost in genotoksičnost aerosola EOVI na celicah fibroblastov v simulacijski komori, ki ne vpliva negativno na celice fibroblastov in je varna pri uporabi za dezinfekcijo diagnostičnih prostorov magnetne resonance. Z analizo pridobljenih podatkov in rezultatov v simulacijski komori smo razvili optimizirano metodo in jo prenesli aplikativno na diagnostični prostor magnetne resonance s čemer smo izboljšali hladno zamegljevanje tako po načinu in količini uporabljene EOVI. Z omenjenimi dosežki bomo pomembno doprinesli k učinkovitejšemu obvladovanju dezinfekcije radioloških diagnostičnih prostorov in s tem k zmanjšanju nevarnosti prenosa bakterijskih okužb v bolnišnicah.

# Abstract

Magnetic resonance imaging (MRI) is a diagnostic method that is used for broad range of hospitalized patient, emergency patients, chemotherapy treated and as well the patients that may have infectious diseases. Because the examinations of different patients are usually performed with the same equipment in the same environment, the surfaces of the equipment and examination rooms could represent a reservoir for pathogenic microorganisms and source of transmission of infections to patients and healthcare professionals. Therefore, it is of at most importance to assure efficient hygienic and disinfection procedures. However, modern electronic diagnostic equipment is difficult to disinfect quickly and successfully. The market does not offer an adequate, reliable, rapid and safe disinfection process for the complex diagnostic devices such as MRI. In MRI diagnostic rooms, the method of disinfection is problematic due to the gravity force of 3.0 Tesla, which is present all the time. Most material of disinfection equipment is incompatible with the ferromagnetic field. For disinfection in healthcare many manufacturers recommend methods such as UV lights and UV robots, and the use of certain aggressive chemicals that however should not be used in contact with specially adapted coils and their sensitive surfaces. The main factor of successful disinfection is time itself. Selection of a suitable disinfectant is largely dependent on the overall process of disinfection procedure.

Consequently, new approaches to disinfection procedures have been studied. Thanks to its mechanism of action, electrolyzed oxidizing water (EOW) has been considered as a promising biocide of the new generation. The principle of the EOW production has been known for some time now. Basically, the alkaline ionized water and acid oxidized ionized water are generated from diluted non-iodized cooking salt (NaCl solution), whereby the alkaline fraction reaches a pH of 11–12, while the acid one has a pH of 1–3. While the alkaline ionized water is considered to have a cleaning effect, the acid one has extremely biocidal effect. Mostly, the effect of the EOW action has been attributed to the pH change only. More detailed analysis has revealed that EOW works through several mechanisms. Among them, the most important ones for the biocidal effect are the redox potential, generated oxidized and super-oxidized ions, and to a smaller extent the produced chlorides, sodium hypochlorite and residual chlorine. Moreover, EOW is characterized by a marked deficiency of electrons due to which it has a tendency for electro-neutral environment that can be achieved only through the abstraction of electrons from the surrounding environment. If there are any micro-organisms in that environment, EOW abstracts the electrons from their membrane disrupting their balance and thereby causing their death. For the application in the air and on surfaces we use a cold fogging method. For the cold fog method we need a aerosolizator for special conditions with special nozzle, compressed air and EOW (Pintarič, 2015). In 2013, for the purpose of cold fogging on the 3T MRI, a modified OPTI-JET CS MD 1 MR was developed with the micronozzle witch gave us a range of 20-30 microns of droplet size. We demonstrated the efficiency and reliability of the hard-to-reach places of magnetic resonance. The amount of the Steriplant® N biocide was used in the air at 6-8 ml/m<sup>3</sup> was accurately analyzed. For a more precise analysis of the amount of biocide used in the air and on surfaces, we want to determine the maximum

load limit with the biocide Steriplant® N and improve the method of aerosolization. With this method we use the properties of aerosols. Aerosols are two-phase systems, consisting of the particles and the gas in which they are suspended. The aerosols applied in such way to air have some benefits but also some problems for the medical staff. Because the toxicity of inhaled particles depends on their physical as well as their chemical properties, an understanding of the properties of aerosols is required to evaluate airborne particulate hazards. The research was carried out on a chamber simulation model that was produced and used for the purpose of the test item (Steriplant® N) aerosols on the viability (cytotoxicity) and induction of DNA double-strand breaks in human alveolar epithelial cells A549 in vitro. The research on this chamber simulation model was carried out at the National Institute of Biology (NIB) in Ljubljana. For this research, testing and analysis of air flow and aerosolization we built a new aerosolizer OPTI JET MD 2ZE with a nano-sized nozzle. The droplet size is now 10-15 microns, which is a key point of the simulation. The obtained data will enable accurate calculation of the maximum amount and concentration of the use of biocide and its possible toxic effects on staff and patients. After completing the simulation analysis on the chamber simulation model, we will again perform the aerosolization in the MRI 3T space and check the effectiveness of the disinfection in difficult accessible locations, with the new aerosolizer OPTI JET MD 2ZE and parameters from the simulation chamber analysis.

The use of EOW with the aerosolization method is suitable for use in MRI rooms. After the disinfection no residuals are present on surfaces. Disinfection with aerosolization of the diagnostic equipment is possible after the procedure of each patient. However, due to the large number of procedures, the personnel can be exposed to increased aerosol inhalation. With an increased number of diagnostic aerosolizations we were prompted to optimize the method of aerosolization and analyse the potential toxicity of EOW aerosol.

# Kazalo

<b>Slike</b>	<b>xv</b>
<b>Tabele</b>	<b>xvii</b>
<b>Kratice</b>	<b>xix</b>
<b>1 Uvod</b>	<b>1</b>
1.1 Elektrolizirana oksidativna voda .....	1
1.2 Način pridobivanja EOv .....	1
1.3 Lastnosti EOv .....	3
1.3.1 Vpliv koncentracije prostega klora, pH in oksidacijsko redukcijskega potenciala na protimikrobne lastnosti EOv .....	5
1.3.2 Dejavniki, ki vplivajo na lastnosti EOv .....	5
1.3.3 Uporaba elektrolizirane oksidativne vode za razkuževanje v radiologiji....	6
1.3.4 Izhodišča za razkuževanje diagnostičnih prostorov .....	7
1.3.4.1 Novi biocid EOv Steriplant®N in uporaba na MR diagnostikah7	
1.3.4.2 Poti okužbe z MRSA v diagnostičnih sistemih MR in njen nadzor .....	8
1.3.5 Ocena učinkovitosti in potencialne toksičnosti aerosolizacije Steriplant® N za osebe in paciente .....	9
<b>2 Raziskovalni problem in hipoteze</b>	<b>11</b>
2.1 Utemeljitev raziskave.....	11
2.2 Toksičnost dezinfekcijskih sredstev za okolje in ljudi .....	14
2.3 Učinkovitost dezinfekcijskih sredstev na mikrobne mehanizme .....	16
2.4 Baktericidna sredstva na tržišču.....	18
2.5 Sinergijske mešanice EOv .....	18
2.6 Optimizirana dostava aktivnih snovi .....	19
2.7 Raziskovalni problem.....	19
2.7.1 Razvoj aerosolizatorja OPTI JET CS MD.....	19
2.7.2 Uporabnost aerosolizatorja v bolnišničnih diagnostičnih prostorih .....	27
2.8 Hipoteze.....	29
<b>3 Metode</b>	<b>31</b>
3.1 Metoda vzorčenja za določanje mikroorganizmov v zraku in na površinah .....	31
3.1.1 Pasivna metoda zbiranja vzorcev zraka .....	32
3.1.2 Aktivna metoda zbiranja vzorcev zraka .....	32
3.1.3 Določanje števila mikroorganizmov pri metodi vzorčenja zraka .....	34
3.2 Postopki hladnega zamegljevanja EOv .....	34
3.2.1 Aerosolisator OPTI JET CSC MD1MR.....	34
3.2.2 Aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE.....	35

3.2.3	Aerosolizacija zraka in uporaba EOVSteriplant <sup>®</sup> N .....	36
3.2.4	Določanje biocidnega delovanja EOVSteriplant <sup>®</sup> N .....	36
3.2.5	Opis materialov in metod za brisanje površin in vzorčenje zraka.....	37
3.2.5.1	Materiali .....	37
3.2.5.2	Opis tehnik vzorčenja .....	37
3.2.5.3	Opis zbiranja vzorcev površine .....	37
3.2.5.4	Opis izvedbe testov.....	38
3.2.5.5	Gojišče – agar za štetje plošč (PCA) .....	38
3.2.5.6	Gojišče – Baird-Parkerjevo gojišče s fibrinogenom z zajčjo plazmo na agarju (RPF) .....	40
3.2.6	Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti hladne megle Steriplant <sup>®</sup> N	41
3.2.6.1	Celična linija in mediji .....	41
3.2.7	Gojenje in obdelava celic .....	41
3.2.7.1	Simulacijska komora za hladno zamegljevanje.....	41
3.2.8	Priprava celic in izpostavljenost .....	42
3.2.9	Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti s pretočno citometrijo .....	43
<b>4</b>	<b>Rezultati</b>	<b>45</b>
4.1	Primernost elektrolizirane oksidativne vode za dezinfekcijo površin in opreme v radiologiji.....	45
4.1.1	Potek raziskave z rezultati.....	45
4.1.2	Sklepne ugotovitve.....	54
4.2	Rezultati vzorčenja diagnostičnih prostorov MR .....	54
4.2.1	Rezultati vzorčenja v diagnostičnem prostoru 3T MR primerjava OPTI-JET CSC MD1MR in OPTI-JET CS MD 2ZE .....	56
4.3	Rezultati potencialne toksičnosti aerosolizacije Steriplant <sup>®</sup> N za človeške alveolarne celice A459 <i>in vitro</i> .....	57
4.3.1	Rezultati viabilnosti celic po hladnem zamegljevanju s Steriplant <sup>®</sup> N .....	57
4.3.2	Analize nastajanja dvojnih prekinitev verig DNK (DSB) v človeških alveolarnih epitelijskih celicah A549 takoj po izpostavljenosti 50 % v/v hladni megli Steriplant <sup>®</sup> N .....	58
<b>5</b>	<b>Razprava</b>	<b>61</b>
5.1	Splošna razprava .....	62
5.2	Sklepne ugotovitve .....	70
<b>6</b>	<b>Zaključki</b>	<b>73</b>
	<b>Literatura</b>	<b>75</b>
	<b>Bibliografija</b>	<b>89</b>
	<b>Biografija</b>	<b>93</b>

# Slike

Slika 1: Shema EOv generatorja. (Hsu, 2005) .....	2
Slika 2: EOv vodni generator. (Pintarič, 2017) .....	2
Slika 3: OPTI JET CS IND VSS predvidena uporaba za industrijske objekte (Obisan, 2006) .....	20
Slika 4: Dvosistemske šobe. (Obisan, 2006).....	21
Slika 5: Aerosolizator denti. (Obisan, 2007) .....	21
Slika 6: Shema simulacije šobe na preiskovalni mizi MR 3T. (Obisan, 2011) .....	22
Slika 7: OPTI-JET CS MD 1, testiranje pravilnega kota dvosistemskih šob. (Pintarič, 2015) .....	22
Slika 8: OPTI-JET CS MD H. (Obisan, 2019).....	23
Slika 9: Graf relativne vlažnosti in temperature v diagnostičnem prostoru med hladnim zamegljevanjem. ....	25
Slika 10: Testo 454 elektronski merilec pretoka zraka. (Pintarič, 2015).....	26
Slika 11: Na zgornji sliki je prikazana odprtina (modra puščica) preko katere smo merili pretok zraka z merilcem za pretok zraka spodnja slika (rdeča puščica). (Pintarič, 2015)	26
Slika 13: Prikaz neposrednega stika dovoda zraka in tekočinski medij, ki ga uporabljamo pri vzorčenju. (Pintarič, 2015).....	27
Slika 12: Coriolis ciklonski vzorčevalnik zraka in neposreden dotok zraka iz prezračevalnega sistema. (Pintarič, 2015).....	27
Slika 14: OPTI-JETCSCMD1MR aerosolizator (rdeča puščica). (Pintarič, 2018) .....	28
Slika 15: OPTI-JET CSMD2ZE. (Pintarič, 2018) .....	29
Slika 16: Coriolis vzorčevalnik zraka (na preiskovalni mizi črna puščica). Aerosolizator OPTI-JET CSMD1MR (pod preiskovalno mizo rdeča puščica). (Pintarič, 2018).....	33
Slika 17: Simulacijska komora za hladno zamegljevanje pred uporabo v digestoriju. (Pintarič, 2018) .....	42
Slika 18: Skupno število mikroorganizmov in prisotnost mikroorganizmov pred in po aerosolizaciji s Steriplantom N. ....	45
Slika 19: Skupno število mikroorganizmov in prisotnost mikroorganizmov po aerosolizaciji s Steriplantom N (preračunano na log 10). ....	46
Slika 20: Skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih (absolutne vrednosti). .....	48
Slika 21: Skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih (preračunano na log10). ....	48
Slika 22: Skupno število mikroorganizmov, določeno s postopkom sedimentacije in vzorčenjem s ciklonsko metodo v diagnostičnih prostorih. ....	53
Slika 23: Analize dvoverižnih prelomov DNK (DBS) v človeških alveolarnih epiteljskih celicah A549 takoj po izpostavljenosti 50% v/v hladni megli Steriplant N (čas 0) ter po 1, 4 in 24 urah inkubacije. ....	59



# Tabele

Tabela 1: Sestavine za gojišče - agar za štetje plošč (PCA).....	39
Tabela 2: Sestavine za Baird-Parkerjev agar RPF (osnova).....	40
Tabela 3: Sestavine za dodatek RPF II.....	40
Tabela 4: Shapiro-Wilk test pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnost mikroorganizmov po aerosolizaciji .....	46
Tabela 5: Opisna statistika pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnost mikroorganizmov po aerosolizaciji s Steriplantom <sup>®</sup> N. ....	47
Tabela 6: Parni t-test pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnost mikroorganizmov po aerosolizaciji s Steriplantom <sup>®</sup> N .....	47
Tabela 7: Shapiro-Wilk test za skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih.....	49
Tabela 8: Opisna statistika skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih..	49
Tabela 9: Parni t-test skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih. ....	49
Tabela 10: Shapiro-Wilk test za skupno število mikroorganizmov, določeno s postopkom sedimentacije in vzorčenjem s ciklonsko metodo v diagnostičnih prostorih. ....	50
Tabela 11: Neparametrični Friedmanov test za metodo sedimentacije in ciklonsko vzorčenje.....	51
Tabela 12: Neparametrični Mann-Whitney U test. ....	52
Tabela 13: Neparametrični Mann-Whitney test (ekvivalent parametričnega .....	52
Tabela 14: Pregled povprečnih vrednosti CFU/m <sup>3</sup> po skupinah in različnih časovnih točkah. ....	53
Tabela 15: Vpliv vzorčenja zraka glede na čas. ....	54
Tabela 16: zmanjševanje števila mikroorganizmov/m <sup>3</sup> v prostoru za 3T MR z dezinfekcijo s hladnim zamegljevanjem Steriplant N z OPTI-JET CSC MD1MR (1.vzorčenje) in OPTI-JET CS MD 2ZE (2. vzorčenje). ....	56
Tabela 17: Viabilnost človeških alveolarnih epitelijskih celic A549 po izpostavljenosti hladni megli Steriplant <sup>®</sup> N (50 in 100 % v/v), določena s testom propidijevega jodida.....	57
Tabela 18: Viabilnost človeških alveolarnih epitelijskih celic tipa 2 A549 po izpostavljenosti hladni megli Steriplant <sup>®</sup> N (50 % v/v), izmerjena s pretočno citometrijo.....	58
Tabela 19: Analize nastajanja dvojnih prekinitev verig DNK (DSB) v človeških alveolarnih epitelijskih celicah A549 takoj po izpostavljenosti 50% v/v hladni megli Steriplant <sup>®</sup> N (čas 0) ter po 1, 4 in 24 urah inkubacije. ....	60



# Kratice

ACC	...	Available Chlorine Concentration (razpoložljiva koncentracija klora)
AcEW	...	Acidic electrolyzed water (kisla elektrolizirana voda)
AEV	...	Acidic electrolyzed water (kisla elektrolizirana voda)
AOPW	...	Acidic oxidative potential water (voda s kislim oksidativnim potencialom)
AOW	...	Acid oxidizing water (kisla oksidacijska voda)
BPD	...	Evropska direktiva o biocidnih izdelkih
CFU	...	Colony formed unit (enota oblikovana v koloniji)
DMEM	...	Dulbeccovo modificirano orlovo gojišče
DNK	...	Deoksiribonukleinska kislina
DSB	...	Double strand breaks (dvoverižni prelomi DNK)
EAS	...	Electrochemically activated solution (elektrokemično aktivirana raztopina)
EDTA	...	Etilendiaminotetraocetna kislina
EOV	...	Elektrolizirana oksidativna voda
EPA	...	Environmental Protection Agency
ESAAS	...	Electrolyzed strong acid aqueous solution (elektrolizirana vodna raztopina močne kisline)
FDA	...	Food and Drug Administration (Uprava za hrano in zdravila)
GIBCO	...	Osnova kancerogenih celičnih kultur
H2AX	...	Fosforiliran histon
HCl	...	Klorovodikova kislina
HOCl	...	Hipoklorova kislina
IMA	...	Indeks mikrobne onesnaženosti zraka
LiCl <sub>2</sub>	...	Litijev klorid
Log	...	Logaritem
MR	...	Magnetna resonanca
MRSA	...	Proti meticilinu odporen stafilokok aureus
NaCl	...	Natrijev klorid
NEW	...	Neutral electrolyzed water (nevtralna elektrolizirana voda)
NIB	...	Nacionalni Inštitut za Biologijo
NICNAS	...	National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme
NOW	...	Neutral oxidizing water (nevtralna oksidacijska voda)
OCl <sup>-</sup>	...	Hipoklorov ion
OIE	...	Organizacije za zdravje živali
ORP	...	Oksidacijsko-redukcijski potencial
OSHA	...	Occupational Health and Safety Administration (Uprava za varnost in zdravje pri delu)
PI	...	Propidijeva jodid

PBS	. . .	Phosphate Buffered Saline (fiziološka raztopina s fosfatnim pufrom)
PCA	. . .	Agar za štetje plošč
ppm	. . .	Part per milion (del na milijon)
ROS	. . .	Reaktivne kisikove vrste
RPF	. . .	Rabbit Plasma Fibrinogen (fibrinogen kunčje plazme)
SAEW	. . .	Strongly acidic electrolyzed water (močno kislja elektrolizirana voda)
T	. . .	Tesla
t-BOOH	. . .	<i>tert</i> -butil hidroperoksid
TCMO	. . .	Trans-cinnamate 4-monooxygenase (je encim, ki katalizira kemično reakcijo)
TSA	. . .	Tryptic Soy Agar
USEPA	. . .	United States Environmental Protection Agency
UV	. . .	Ultravijolično sevanje
UVC		Ultravijolično sevanje krajše valovne dolžine
VRE	. . .	Vancomycin Resistant Enterococcus (na Vankomicin odporen enterokok)
VWR	. . .	Koncern laboratorijske tehnike
$\gamma$ H2AX	. . .	Označevalci dvojnih prekinitev verig (DSB)





# Poglavje 1

## Uvod

### 1.1 Elektrolizirana oksidativna voda

Elektrolizirana oksidativna voda (EOV) se proizvaja z elektrolizo razredčene (0,05–1 %) raztopine soli (NaCl) v celici z inertnima pozitivno in negativno elektrodo, ki sta ločeni z membrano. Z enosmerno napetostjo na elektrodah nastaneta dve vrsti vode z različnimi lastnostmi. Na anodi, tj. pozitivni elektrodi, nastane kislina vodna raztopina, imenovana kislina EOVS, na katodi, tj. negativni elektrodi, pa alkalna vodna raztopina, imenovana alkalna EOVS.

Kislina EOVS ima poleg nizkega pH tudi visok oksidacijski potencial, vsebuje hipoklorovno kislino (HOCl) in naj bi imela močno baktericidno delovanje (Kim, 2000b; Len, 2000; Venkitanarayanan, 1999) na različne patogene in nepatogene mikroorganizme. Alkalna EOVS ima po drugi strani visok redukcijski potencial, ki ima pomembno vlogo pri redukciji prostih radikalov v bioloških sistemih.

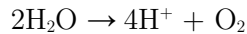
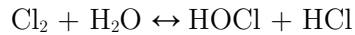
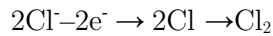
EOVS v svoji kisli, alkalni in nevtralni obliki ima toliko imen, kolikor raziskovalcev se je ukvarjalo z njo. Kislina EOVS se imenuje elektrolizirana vodna raztopina močne kisline (electrolyzed strong acid aqueous solution – ESAAS) (Tanaka, 2000; Hayashi, 1997), kislina oksidativna voda (acid oxidizing water – AOW) (Shimada, 2000), kislina voda z oksidativnim potencialom (acidic oxidative potential water – AOPW) (Matsumoto, 2002), močno kislina elektrolizirana voda (strongly acidic electrolyzed water – SAEW) (Sakurai, 2002) in kislina elektrolizirana voda (acidic electrolyzed water – AeEW) (Koseki, 2001). Ko se pH kisline EOVS nevtralizira na približno (5–6,5), se imenuje nevtralna oksidativna voda (neutral oxidizing water – NOW) (Shimada, 2000), nevtralna elektrolizirana voda (neutral electrolyzed water – NEW) (Deza, 2003) in elektrokemično aktivirana raztopina (electrochemically activated solution – EAS) (Yang, 1999).

### 1.2 Način pridobivanja EOVS

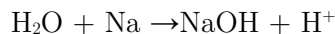
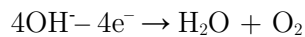
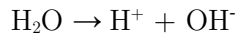
EOVS pridobivajo z vnosom razredčene raztopine soli v elektrolitsko celico s pozitivno in negativno inertno elektrodo, ki sta ločeni s polprepustno membrano. Ko na elektrodi priključimo enosmerno napetost (8–10 V), ioni v celici z razredčeno raztopino soli prehajajo skozi polprepustno membrano do ustreznih elektrod. Ioni v raztopini soli so Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup> in njihove kombinacije. Med elektrolizo ioni Na<sup>+</sup> in H<sup>+</sup> prehajajo na katodo, ioni Cl<sup>-</sup> in OH<sup>-</sup> pa na anodo. Posledica več reakcij teh ionov je nastanek različnih molekul in ionov na obeh straneh celice, ki so posledično odgovorni za lastnosti kisline in alkalne

EOV, ki nastane na anodi oziroma katodi. Osnovne kemijske reakcije, ki potekajo v elektrokemijski celici, so zapletene (Gordon, 1998) in vključujejo vsaj nekatere od naslednjih reakcij.

Na anodi:



Na katodi potekajo naslednje reakcije:

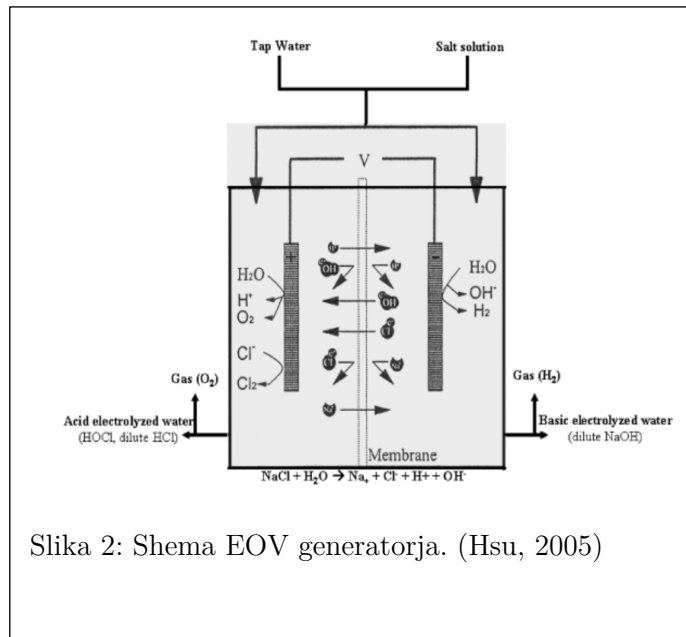


Na anodi kloridni ioni oddajajo elektrone ( $e^-$ ) in tvorijo kloridne radikale, ki skupaj tvorijo plinasti klor. Nastali plinasti klor se združuje z vodo in tvori hipoklorovo kislino (HOCl) in klorovodikovo kislino (HCl). Pri reakcijah, ki potekajo na anodi, nastaja tudi plinasti kisik. Natrijevi ioni, ki prehajajo na katodo, sprejmejo elektrone in burno reagirajo z vodo ( $\text{H}_2\text{O}$ ), pri čemer nastane NaOH in plinasti vodik ( $\text{H}_2$ ).

Med delovanjem generatorja EOV (slika 1) se polarnost elektrod periodično spreminja, da se prepreči odlaganje vodnega kamna, ki lahko sčasoma povzroči zamašitev polprepustne membrane, ki ločuje elektrodi (slika 2), kar zmanjša elektrolitsko učinkovitost (Anon, 1997).



Slika 1: EOv vodni generator.  
(Pintarič, 2017)



Slika 2: Shema EOv generatorja. (Hsu, 2005)

Vodni kamen, ki vsebuje kalcijeve in magnezijeve soli ter silikate iz vodovodne vode in soli, uporabljene pri proizvodnji EOv, se odlaga na katodi, vendar ga kislina zlahka raztopi. Pri preprečevanju težav zaradi odlaganja vodnega kamna pomagata tudi obdelava vode iz pipe, ki se dovaja v generator in uporaba prečiščene soli.

### 1.3 Lastnosti EOVS

**Anolit** je elektrolit na anodni strani elektrokemijske celice, ki je razdeljena na predele. Anolit je komercialno na voljo kot nevtralna elektrolizirana voda (NEW), ki se proizvaja na kraju samem. Anolit je zelo močno razkužilo proti bakterijam, virusom in algam, tudi če ga razredčimo v vodi ali razpršimo po zraku.

**Elektrolit** je kemična spojina (sol, kislina ali baza), ki ob raztapljanju v topilu disociira v električno nabite ione. Nastala raztopina elektrolita (ali elektrolitska raztopina) je ionski prevodnik elektrike. Zelo pogosto se tako nastala raztopina imenuje preprosto »elektrolit«. Tudi staljene soli in raztopine staljenih soli se pogosto imenujejo »elektrolit«, kadar se uporabljajo v elektrokemijskih celicah, glejte ionsko tekočino.

**Kisli anolit** se lahko uporablja povsod, kjer je treba razkuževati ali sterilizirati in kjer pH ni pomemben in ni nevarnosti korozije. Kisli anolit je močna oksidativna raztopina s pH ~2,0 – 4,0 in ima oksidacijsko-redukcijski potencial (ORP) >1000 z vsebnostjo aktivnega klora približno ~50 – 500 ppm.

**Nevtralni anolit** ima pH ~6,0 – 7,0 vsebnost aktivnega klora ~50 – 500 ppm in ORP >900mV. Uporablja se povsod, kjer je pomemben pH (korozija) in kjer se ni mogoče izogniti izhlapevanju aktivnega klora. Nevtralni anolit je zelo učinkovit proti bakterijam in virusom in se večinoma uporablja za razkuževanje bazenov, pitne vode ali drugih vodnih virov. Poleg tega se nevtralni anolit pogosto uporablja za razkuževanje predmetov (tal, prostora, sten, orodja itd.).

**Katolit** je stranski proizvod, ki se prav tako proizvaja na kraju samem. Katolit ima ORP ~ – 800 do – 900mV. Katolit je alkalen s pH od ~ 10,0 do 13,0. Katolit nima sterilizacijskih lastnosti, lahko pa se uporablja za flokulacijo (npr. težkih kovin), koagulacijo, pranje in ekstrakcijo. Katolit se lahko uporablja za izpiranje ran (namesto uporabe joda) in povsod, kjer je treba povečati pH obdelovane vode.

**Alkalna in kislina elektrolizirana voda** se proizvajata z elektrolizo običajne vode iz vodovoda v prisotnosti določene količine soli, običajno natrijevega klorida.

**Kislina elektrolizirana voda** je močna oksidativna raztopina, ki ima tipičen razpon pH od 3,5 do 8,5 in oksidacijsko redukcijski potencial (ORP) od + 600 do +1200 mV. Vsebuje tudi hipoklorovo kislino, ki prispeva k njenim bakteriocidnim lastnostim. Uporablja se predvsem kot razkužilo, saj je učinkovito proti bakterijam, glivicam, plesnim, sporam in drugim mikroorganizmom v kratkem kontaktnem času. Uporablja se lahko kot tekočina, megla ali led. Kislinska elektrolizirana voda je znana tudi kot: AEV, Anox, Suprox, EOVS, Anostel, Anodox, kisli anolit ali A-Anolit.

**Alkalna elektrolizirana voda** ima razpon pH od 11,2 do 11,4 in oksidacijsko redukcijski potencial do – 850 mV. Ta frakcija je lahko uporabna kot antioksidativni aditiv za živila. Alkalna elektrolizirana voda je znana tudi kot: AV, Cathox, EOVS ali katolit.

**Nevtralna elektrolizirana voda (NEV)** je popolnoma naravna, organska, nestrupena, nedražeča, okoljsko in ekološko varna raztopina za razkuževanje in dezinfekcijo. Proizvedena je z elektrokemično reakcijo preproste vode, soli in elektrike. Uporaba te

tehnologije je neskončna in vključuje vse postopke, ki zahtevajo sterilizacijo, razkuževanje, čiščenje ali čiščenje vode.

Lastnosti EOVS, ki se običajno spremljajo, so: pH, ORP in koncentracija klora. V nekaterih primerih se spremlja tudi količina raztopljenega kisika. Ugotovljeno je bilo, da imajo pH, ORP in koncentracija klora zelo pomembno vlogo pri inaktivaciji bakterij (Kim, 2000a; Len, 2000). Kisla EOVS, ki se proizvaja na anodni strani generatorja EOVS, ima nizek pH približno 2,5, medtem ko ima alkalna EOVS, ki se proizvaja na katodni strani generatorja, visok pH približno 11. Bakterije na splošno lahko preživijo med pH od 4 do 9, vendar jih večina najbolje raste pri pH okoli 7,0 (6,6 – 7,5) (Jay, 2000). pH kisle EOVS ne spada v območje, v katerem lahko preživi večina bakterij, zato se ta voda uporablja za njihovo inaktivacijo.

ORP raztopine je na splošno opredeljen kot hitrost, s katero raztopina izgublja ali pridobiva elektrone. Kadar spojina izgublja elektrone, pravimo, da je oksidirana, medtem ko substrat, ki pridobi elektrone, postane reducirana. Ko se elektroni prenesejo z ene spojine na drugo, nastane potencialna razlika med obema spojinama, ki se ustrezno meri kot ORP in izraža v mV. Močno oksidirana snov ima bolj pozitiven potencial, medtem ko ima močno reducirana snov bolj negativen potencial. Kisla EOVS ima močan oksidacijski potencial (ORP ~ 1100 mV), medtem ko ima alkalna EOVS močan redukcijski potencial (ORP ~ 800 mV). Na splošno aerobne bakterije za rast potrebujejo pozitiven potencial, medtem ko anaerobi za rast potrebujejo reducirane pogoje. Poleg nizkega pH in visokega ORP vsebuje kislina EOVS tudi klor. Razpoložljivi klor, izmerjen v kisli EOVS, je lahko v treh oblikah: hipoklorov kislina (HOCl), hipoklorov ion (OCl<sup>-</sup>) in plinasti klor (Cl<sub>2</sub>). Vse te tri oblike so lahko v različnih razmerjih v EOVS, odvisno od njenega pH, in se zlahka pretvorijo druga v drugo z reverzibilnimi reakcijami. Izmed teh treh ima HOCl največji baktericidni učinek (Len, 2000; White, 1999).

Koncentracija klora v EOVS je odvisna od koncentracije soli, hitrosti pretoka in jakosti električnega toka, pri kateri se proizvaja. Povečanje koncentracije soli in jakosti toka ter zmanjšanje pretoka povzroči povečanje koncentracije klora (Hsu, 2005; Ezeike in Hung, 2004). Len s sodelavci je v svoji raziskavi o vplivu pH na proste oblike klora v EOVS poročal, da povečanje pH EOVS povzroči zmanjšanje koncentracije HOCl in povečanje koncentracije OCl<sup>-</sup> zaradi disociacije HOCl na H<sup>+</sup> in OCl<sup>-</sup> (Len, 2000). Ugotovili so tudi, da je bila največja koncentracija HOCl v kisli EOVS dosežena pri pH 4, pri čemer so zabeležili tudi največjo logaritemsko redukcijo pri bakteriji *Bacillus cereus*, obdelani z EOVS (Len, 2000). White s sodelavci navaja, da je baktericidna učinkovitost HOCl 80-krat večja od učinkovitosti OCl<sup>-</sup>. To visoko baktericidno aktivnost je mogoče pripisati nevtralnemu naboju HOCl, ki mu omogoča, da zlahka prodre skozi bakterijske celične stene in prekine ključne presnovne dejavnosti. Po drugi strani pa OCl<sup>-</sup> zaradi svojega negativnega naboja potrebuje visoko aktivacijsko energijo, da lahko prodre skozi bakterijsko celično steno (White, 2010). Kot potencialni vir dezinfekcije v raztopinah z elektrolizo je bila omenjena tudi prisotnost stabilnega stanja ostankov prostih radikalov (Gordon, 1998). Vendar je te vmesne produkte zaradi hitrih reakcij in interakcij težko izolirati in identificirati.

Ena od najpomembnejših prednosti uporabe kisle EOVS je dejstvo, da jo je mogoče proizvesti kot uporabnik preprosto z NaCl in da odpravlja potrebo po velikih količinah in visokih koncentracijah nevarnih kemikalij, ki se uporabljajo pri proizvodnji drugih kloriranih raztopinah. Ugotovljeno je bilo tudi, da je dokaj stabilna. V pogojih skladiščenja se je klor (~ 60ppm) v kisli EOVS popolnoma izgubil po 30 urah pri mešanju in 100 urah pri skladiščenju brez mešanja (Len, 2002). V teh pogojih osvetlitev skladišča ni dodatno vplivala na izgubo klora. Len, 2002 je poročal, da se je v zaprtih pogojih ob prisotnosti razpršene svetlobe po 1400 h izgubilo približno 60 % klora, medtem ko se je v temnih pogojih izgubilo približno 40 % klora. Glede na isto raziskavo je pH kisle EOVS med skladiščenjem ostal nespremenjen in čeprav se je ORP med skladiščenjem v odprtih pogojih

zaradi izgube oksidativnega klora zmanjšal, se je v zaprtih pogojih ne glede na osvetlitev ali mešanje le rahlo zmanjšal.

### 1.3.1 Vpliv koncentracije prostega klora, pH in oksidacijsko redukcijskega potenciala na protimikrobne lastnosti EOV

Na protimikrobno učinkovitost EOV močno vplivajo ORP, koncentracija klora ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{OCl}^-$ , in  $\text{HOCl}$ ) in pH (Len, 2000). Pri EOV ima pH pomembno vlogo zlasti pri nastajanju različnih oblik klora. Klor je najmočnejši v obliki  $\text{HOCl}$  in ima 80-krat večjo razkuževalno moč kot  $\text{OCl}^-$ , kadar je pH raztopine od 5,0 do 6,5 (Cao, 2009). Vendar pa  $\text{HOCl}$  pri visokem pH disociira v hipokloritne ione ( $\text{OCl}^-$ ), pri nizkem pH pa v plinasti klor ( $\text{Cl}_2$ ).  $\text{HOCl}$  prodira skozi membrane mikroorganizmov saj proizvaja hidroksilne radikale, ki delujejo protimikrobno z oksidacijo, in vpliva na ključne presnovne procese (Huang, 2008). Ugotovljeno je bilo, da se ORP in koncentracija prostega klora (Available Chlorine Concentration – ACC) EOV znatno zmanjšata s povečanjem pH s kislega (pH 2,5) na bazično območje (pH 9,0). Ko je pH dosegel vrednost 9,0, se je zmanjšala sposobnost inaktivacije vseh testiranih organizmov (Rahman, 2010a).

AEV ima nizek pH, za katerega je znano, da je odgovoren za zmanjšanje razmnoževanja bakterij in za to, da so bakterije bolj občutljive na prosti klor, saj je njihova zunanja plast bolj dovzetna za  $\text{HOCl}$  (Park, 2004). Park s sodelavci je preučil vpliv klora in pH AEV pri inaktivaciji bakterije *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ter bakterije *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7). Pokazalo se je, da je AEV izjemno učinkovit pri inaktivaciji teh organizmov v širokem razponu pH (od 2,6 do 7,0), če so na voljo ustrezne količine prostega klora ( $> 2 \text{ mg/L}$ ). Nekaj raziskovalcev trdi, da je visok ORP glavni dejavnik, ki določa protimikrobno delovanje AEV (Kim, 2000b; Liao, 2007; Huang, 2008). Zaradi visokega ORP AEV lahko pride do oksidacije, ki poškoduje različne plasti celic, povzroči oksidacijo sulfhidrilnih mešanic na celičnih površinah in moti presnovne poti v bakterijski celici. To lahko povzroči inaktivacijo bakterijskih celic (Liao, 2007). Načeloma nizka vrednost pH in visok ORP AEV delujeta sinergijsko s  $\text{HOCl}$  pri inaktivaciji patogenih bakterij (Park, 2002b, 2004; Bari, 2003; Liao, 2007). Poleg tega so (Stevenson, 2004) ugotovili popolno izgubo baktericidnega delovanja, ko se ORP zmanjša na manj kot 848 mV.

Ugotavljajo tudi Rahman s sodelavci da se število patogenih bakterij zniža za  $5,0 \log_{10}$  CFU/mL če se jih je izpostavilo delovanju EOV z ORP med 500 do 700 mV (Rahman, 2012a). Vendar pa je Koseki s sodelavci opozoril, da ORP ni glavni dejavnik, ki vpliva na proces dezinfekcije, saj ozonirana voda z višjim ORP ni pokazala večjega protimikrobnega učinka v primerjavi z AEV z nižjim ORP (Koseki, 2001a). Poleg tega so poročali, da prosti klor v AEV (predvsem v obliki  $\text{HOCl}$ ) proizvaja  $\text{OH}^-$  ki ima močan učinek na mikroorganizme.

### 1.3.2 Dejavniki, ki vplivajo na lastnosti EOV

Kot je bilo že omenjeno, se EOV proizvaja z elektrolizo raztopine natrijevega klorida ( $\text{NaCl}$ ), ki je edina kemična snov. Zaradi svoje kemične sestave in skoraj nevtralnega pH ima manj škodljivih učinkov na zdravje ljudi in okolje (Kim, 2000; Ding, 2015a, 2015b). Najmočnejša oblika klora je  $\text{HOCl}$ , ki ima 80-krat večjo inaktivacijsko učinkovitost kot  $\text{OCl}^-$  v enakovredni koncentraciji, ko je njegovo pH območje od 5,0 do 6,5 (Cao, 2009).  $\text{HOCl}$  se pri alkalnem pH spremeni v  $\text{OCl}^-$ , medtem ko pri nizkih vrednostih pH disociira v  $\text{Cl}_2$ . Preprosto uhajanje  $\text{Cl}_2$  iz raztopine zmanjšuje njeno protimikrobno učinkovitost.

Zato pH EOv določa relativne deleže oblik klora v raztopini (Par, 2004). Poleg tega je bilo dokazano, da je klorova spojina eden najpomembnejših dejavnikov, ki so odgovorni za inaktivacijsko učinkovitost EOv (Hao, 2012). Nadalje je nekaj poročil pripisalo inaktivacijsko delovanje ORP EOv (Kim, 2000; Liao, 2007; Ding, 2016; Tkhawkho, 2017).

Ding s sodelavci je določil dezinfekcijsko učinkovitost SAEV na *S. aureus* v primerjavi z učinkovitostjo natrijevega hipoklorita ( $\text{NaClO}$ ) in klorovodikove kisline ( $\text{HCl}$ ). Rezultati so pokazali, da visok ORP vpliva na nekatere znotrajcelične encimske sisteme s spremembo elektronskega toka v celicah. Drugo poročilo je pokazalo, da visok ORP EOv uniči plasti bakterij, moti presnovne poti in oksidacijo sulfhidrilnih mešanic celic. To lahko povzroči hitrejšo inaktivacijo bakterijskih celic (Liao, 2007). Zato osnovne lastnosti EOv, vključno z ACC ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{OCl}$  in  $\text{HOCl}$ ), pH in ORP, neposredno vplivajo na njeno učinkovitost razkuževanja, medtem ko naj bi različni elektrolitski parametri, kot so tok, hitrost pretoka, koncentracija soli, elektrolit, materiali elektrod, temperatura vode, trdota vode in okolje shranjevanja, neposredno vplivali na lastnosti EOv.

### 1.3.3 Uporaba elektrolizirane oksidativne vode za razkuževanje v radiologiji

Sodobne radiološke slikovne preiskave zagotavljajo podrobne, hitre in zanesljive postopke, ki dajo največ diagnostičnih podatkov, obenem pa čim manj obremenijo bolnika. Z vedno večjim številom diagnostičnih preiskav se povečuje tudi možnost kontaminacije trdih površin s patogeni mikroorganizmi okuženih bolnikov. Take površine lahko predstavljajo vir okužb za druge bolnike in medicinsko osebje (Aubert, 1991; Baffoy-Fayard, 2003; Balonov, 1999). Eden od ključnih dejavnikov uspešnega postopka razkuževanja je čas izpostavljenosti razkužilu. Vendar izbira razkužila ni enostavna naloga. Osnovna zahteva je hitro delovanje brez ostankov na površinah. Danes je znanih približno 250 snovi, ki imajo biocidni učinek. Uporabljajo se samostojno ali v kombinaciji z drugimi biocidi. Izpostavljena težava postane toliko večja, če upoštevamo naraščanje števila bolnišničnih okužb, kot je denimo proti Meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vse večje število bolnikov, okuženih s povzročitelji nalezljivih bolezni (Blythe, 1998; Boyce, 1997; Boyce, 2002; Buerke, 2012; Chaljub, 2001; Cowan, 1993).

Ob upoštevanju vse večjega obsega elektronske opreme, vgrajene v diagnostične naprave, so površine brez ostankov biocida ključnega pomena. Več kot je opreme, večja je možnost, da korozivno delovanje povzroči poškodbe vitalnih delov naprave, zlasti če upoštevamo, da imajo nekateri biocidi na bazi alkohola sami korozivni učinek. Nadzorni moduli na dotik pri angiografskih diagnostičnih naprav so na primer izjemno občutljivi na različna čistila in razkužila, ki vsebujejo alkohol in druge snovi z jedkim učinkom. Dodatno težavo predstavlja dostopnost za čiščenje. Ležišča za bolnike v napravah za računalniško tomografijo (CT) in slikanje z MR so zelo težko dostopna za čiščenje in razkuževanje na klasičen način z brisanjem površine z alkoholom in podobnimi klasičnimi biocidi (Delaney, 2005; Dietze, 2001). Zato so bili preučeni novi pristopi s postopki razkuževanja. Zaradi svojega mehanizma delovanja je bila EOv obravnavana kot možen biocid nove generacije. Načelo proizvodnje EOv je znano že od leta 1960. V osnovi se alkalna ionizirana voda in kislina oksidirana ionizirana voda proizvajata iz razredčene nejonirane kuhinjske soli (raztopina  $\text{NaCl}$ ), pri čemer alkalna frakcija doseže pH 11 - 12, kislina pa pH 1 - 3. Alkalna ionizirana voda ima čistilni učinek, kislina pa izjemno biocidni učinek.

Učinek delovanja EOv se večinoma pripisuje samo spremembi pH. Vendar je podrobnejša analiza pokazala, da ima elektrooksidirana voda več mehanizmov delovanja. Med njimi so za biocidni učinek najpomembnejši redoks potencial, nastali oksidirani in superoksidirani ioni ter v manjši meri nastali kloridi, natrijev hipoklorit in preostali klor.

Poleg tega je za EOVS značilno izrazito pomanjkanje elektronov, zaradi česar teži k elektronevtralnemu okolju, ki ga je mogoče doseči le z odvzemom elektronov iz okolice (Hsu, 2004). Če so v tem okolju mikroorganizmi, EOVS odvzame elektrone iz njihove membrane, s čimer poruši njihovo ravnovesje in povzroči njihovo destabilizacijo in posledično smrt. Nastajanje oksidiranih in superoksidiranih ionov uvršča EOVS med biocidna sredstva, ki oddajajo kisik. Pomembna značilnost te skupine sredstev je hitro delovanje in ekološko sprejemljivi razgradni produkti kot posledica reakcije. Slaba stran so burna reakcija z vsemi obstoječimi organskimi snovmi, posebne zahteve za skladiščenje (posebne posode z ventili za odvajanje zraka, ki sproščajo presežni tlak v posodi), korozivnost in draženje dihalnega sistema ter jedkost pri večji koločini skladiščenega sredstva. Zgoraj navedene snovi nastajajo med elektrolizo in se uvrščajo med biocidne snovi. Nastajajo v zelo majhnih količinah, ki niso nevarne ljudem in živalim (Hsu, 2004).

Eden ključnih dejavnikov pri razkuževanju z EOVS je kislost, pri čemer je pH med 1 - 3 zelo kisel in ima biocidni učinek. Ne smemo pa pozabiti, da nizke vrednosti pH izpostavljajo površine korozivnemu delovanju (Grabsch, 2006; Hardy, 2006; Kaye, 2004). Zaradi svojega mehanizma delovanja ima EOVS širok spekter delovanja. Izkazal se je kot zelo dobro sredstvo uničevanju biofilmov v boju proti patogenim mikrobom (napad na celično membrano mikroba z raztapljanjem biofilma zaščitne membrane) (Landa-Solis, 2005; Lankford, 2006). Številni članki navajajo široke možnosti uporabe EOVS na različnih področjih, na primer v rastlinski proizvodnji (Martinez, 2003), prašičereji (preventivna dezinfekcija), perutninski in živilskopredelovalni industriji (Meakin, 2012). Še posebej dobre rezultate je pokazal pri hladnem zamegljevanju prostorov, uvrsti pa se lahko tudi v program razkuževanja v primeru izbruha katere koli epizootske bolezni. V humani medicini se uporablja za razkuževanje kirurških instrumentov, kot so endoskopi, in za čiščenje površin v bolnišnicah (Nikitin, 1965).

### 1.3.4 Izhodišča za razkuževanje diagnostičnih prostorov

Število preiskav in posegov pri bolnikih z MR diagnostiko se povečuje, čas, potreben za razkuževanje površin, prostorov in opreme, pa se skrajšuje. Posledica tega je večja mikroba obremenitev površin in zraka, zato so bolniki in zdravstveno osebje bolj izpostavljeni bakterijski in virusni kontaminaciji, vključno z odpornimi sevi mikroorganizmov. Številne študije so izpostavile problem hitrega in uspešnega razkuževanja sodobne diagnostične elektronske opreme (Aubert, 1991; Baffoy-Fayard, 2003; Balonov, 1999; Buerke, 2012). Trg ne ponuja ustreznega, zanesljivega, hitrega in varnega postopka razkuževanja naprav za 3T MR. Glavni dejavnik uspešnega razkuževanja je čas. Izbira ustreznega razkužila je v veliki meri odvisna od celotnega poteka postopka razkuževanja. Ko želimo taka sredstva uporabiti na površinah v bolnišnih prostorih za bolnišnične okužbe, kot so MRSA in druge okužbe se soočamo z izbiro pravilne metode (Bibbolino, 2009; Boyce, 1997; Salgado, 2006; Zhang, 2011). Ležišča za bolnike v skenerjih za CT in MR so zelo težko dostopna za čiščenje in razkuževanje (Kim, 2012). Zato so bili preučeni novi pristopi k postopkom razkuževanja.

#### 1.3.4.1 Novi biocid EOVS Steriplant<sup>®</sup>N in uporaba na MR diagnostikah

Zaradi svojega mehanizma delovanja velja Steriplant<sup>®</sup>N za biocid nove generacije (Landa-Solis, 2005; Meakin, 2012; Rahman, 2011; Vorobjeva, 2004; Wu, 2008). Postopek proizvodnje EOVS je znan že nekaj časa. V osnovi se alkalna ionizirana voda in kislina oksidirana ionizirana voda proizvajata iz razredčene nejodirane kuhinjske soli (raztopina NaCl), pri čemer alkalna frakcija doseže pH 11 - 12, kislina pa pH 1 - 3. Alkalna ionizirana

voda ima čistilni učinek, kislina pa izjemno biocidni učinek. Učinek delovanja EOVS se večinoma pripisuje samo spremembi pH. Vendar je podrobnejša analiza pokazala, da ima EOVS več mehanizmov delovanja (Zeng, 2010).

Pri večini bolnikov z resnimi okužbami se med zdravljenjem običajno opravi kakšen slikovni postopek. Radiološki oddelki in ambulantni centri za slikanje morajo sprejeti ustrezne ukrepe, s katerimi zagotovijo, da njihova MR diagnostika ni žarišče mikroorganizmov, ki lahko povzročijo nalezljive bolezni. V diagnostičnih prostorih za slikanje z MR pogosto ni najosnovnejših zaščitnih ukrepov proti okužbam. Zaradi edinstvenega okolja (močen privlak magnetnega polja, statika...) je izredno težko izvajati in vzdrževati učinkovito politiko obvladovanja okužb (Chaljub, 2001; Pintarič, 2015). Zaradi nevarnosti, ki jo povzročajo izjemno močna magnetna polja, kar se je pokazalo ob odmevni smrti bolnika zaradi nesreče v MR, je večini čistilne opreme in čistilnemu osebju običajno prepovedan vstop v diagnostične prostore za MR. Problem pomanjkanja temeljitega čiščenja in razkuževanja enote MR je bil jasno prikazan v študiji z Irske, v kateri so poročali o izolaciji MRSA v diagnostičnih prostorih MR (Shelly, 2011).

#### 1.3.4.2 Poti okužbe z MRSA v diagnostičnih sistemih MR in njen nadzor

Bakterija MRSA je bila prvotno ugotovljena leta 1961 in je zdaj zelo razširjena v zdravstvenih ustanovah, tako bolnišničnih kot ambulantnih (Vorobjeva, 2004). Najpogostejši vir prenosa MRSA je neposreden ali posreden stik z osebami, ki so okužene z njo ali so asimptomatski prenašalci. Leta 1972 je MRSA predstavljala le 2 % vseh okužb s *S. aureus*, zdaj pa je odgovorna za 50 do 70 % teh okužb (Vorobjeva, 2004). MRSA spada med mikroorganizme, ki jih pogosto imenujemo »superbakterije«. Obolevnost in umrljivost zaradi teh bakterij je velika. V povprečju je hospitalizacija zaradi zdravljenja MRSA v primerjavi z drugimi okužbami približno trikrat daljša in trikrat dražja. Poleg tega je tveganje smrti pri bolnikih, okuženih z MRSA, od 3 - 5 krat večje kot pri bolnikih, okuženih s *S. aureus*, občutljivim na meticilin (Wu, 2008).

Glavna skrb centrov za slikanje je, da lahko MRSA prenašajo asimptomatske osebe. Po ocenah je po vsem svetu do 53 milijonov ljudi asimptomatskih prenašalcev MRSA (Martinez, 2003; Scanlon, 2006); ocenjuje se, da jih 2,5 milijona živi v Združenih državah Amerike. Približno 1 % prebivalstva ZDA je okuženo z MRSA (Whitby, 2001). Okuženi bolniki enako pogosto kontaminirajo svoje okolje (Whitby, 2001). Zato je lahko vsak bolnik, ki leži na preiskovalni mizi za diagnostično slikanje, prenašalec, ki lahko kontaminira površine v radiološkem prostoru. MRSA in drugi patogeni lahko preživijo na neživih površinah, vključno z običajnimi blazinicami za fiksacijo in imobilizacijo preiskovancev na preiskovalnih mizah in ležiščih, tudi več mesecev (Blythe, 1998; Dietze, 2001; Hardy, 2006). Največji izziv pri preprečevanju prenosa MRSA in drugih okužb v radiologiji nedvomno predstavlja prostor za MR. Zaradi visokega magnetnega polja, ki predstavlja nevarnost za osebe in poškodbe samega aparata MR, ter zaradi upoštevanja priporočil Ameriškega kolegija za radiologijo (Blythe et. al., 1998) v številnih samostojnih centrih za slikanje in bolnišnicah čistilne ekipe ne smejo vstopiti v prostore za MR. Zato so ti prostori za MR le redko, če sploh kdaj, ustrezno očiščeni. To predstavlja tveganje za osebe in bolnike, saj se MRSA lahko prenaša s stikom z okuženimi površinami, kot so podloge za ležišča (Blythe, 1998; Boyce, 2002).

Dokazano je, da lahko MRSA preživi na površinah, kot so namizne plošče in tablice, do 11 - 12 dni (Huang, 2006). Podobno je na oblazinjenem, pohištvu in stenskih oblogah v sedmih dneh preživel 50 % na vankomicin odpornih enterokokov (VRE) in so se zlahka prenesli z dotikanjem okuženih površin (Lankford, 2006). Ob kontaminaciji okolja je povečano tveganje za okužbo z VRE/MRSA pri bolnikih ocenjeno na 5,1 % za MRSA in 6,8 % za VRE (Huan, 2006; Kaye, 2004; Martinez, 2003). Pri bolnikih, ki so sprejeti v sobo,

v kateri je pred tem bival bolnik, koloniziran z MRSA, obstaja večje tveganje za okužbo z MRSA (Huang, 2006). V številnih centrih za magnetno resonanco obstaja napačno prepričanje, da bo zgolj namestitve čiste rjuhe na podlogo preiskovalne mize ali ležišča, ne da bi jo dejansko očistili, preprečila širjenje povzročiteljev okužb. Najbolj zaskrbljujoče je, da le redki centri za magnetno resonanco čistijo podloge vsaj enkrat na dan, še manj pa po vsaki opravljeni preiskavi. Čiščenje podlog med delovnim časom ima običajno zelo nizko prioriteto, saj je zamudno, zmanjšuje pretočnost in s tem produktivnost centra, ter negativno vpliva na finančno stanje centra. Poleg tega so bili inženirji za MR, zlasti tisti, ki so se izobraževali v sedemdesetih in osemdesetih letih prejšnjega stoletja, slabo usposobljeni za nadzor okužb ali pravilne postopke čiščenja. S povprečno MR lahko pregledamo od 3.000 do 5.000 bolnikov na leto. S CT skenerji lahko običajno skeniramo dvakrat ali trikrat toliko. Obstaja verjetnost, da je vsaj 50 - 100 teh bolnikov okuženih z MRSA ali drugimi okužbami, povezanimi z zdravstveno oskrbo (Cosgrove, 2006), veliko več pa je prenašalcev.

Drugo področje možne izpostavljenosti povzročiteljem okužb je uporaba kontrastnega sredstva za CT in MR, ki ga apliciramo intravenozno (i.v.), ki znatno poveča tveganje okužbe krvi. Že preprosto odstranjevanje i.v. kanala z bolnikove roke in njeno odlaganje v zabojnik za ostre predmete predstavlja veliko tveganje. Kri lahko kaplja iz igle ali iz vbodne rane na podloge, mizo in tla. Te krvi medicinsko osebje, ki izvaja postopek, pogosto ne opazi, kar povzroči tveganje kontaminacije. Neredko se zgodi, da v prostoru za slikanje najdemo posušeno kri, ki je odlično gojišče za MRSA. Obstaja tudi nevarnost širjenja nalezljivih bakterij z neposrednim ali posrednim stikom med osebjem za slikanje in bolniki na oddelku ali centru za slikanje. Osebje se lahko okuži z MRSA s preprostim urezom ali drugo poškodbo kože, ki je med napornim dnevom morda sploh ne opazi. Zato je ključnega pomena umivanje rok med pacienti in uporaba razkužil za roke za celotno osebje (Boyce, 1997; Delaney, 2005). Kar zadeva mobilne MR, je zagotavljanje ustrezne higiene še težje.

### 1.3.5 Ocena učinkovitosti in potencialne toksičnosti aerosolizacije Steriplant<sup>®</sup> N za osebje in paciente

Zaščita bolnikov pred bolnišničnimi okužbami je zelo pomembna. Razkuževanje prostorov za MR je zaradi njihovih edinstvenih lastnosti in okolja še posebej težavno. Razvili smo aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE za razkuževanje prostora za slikanje z MR z uporabo biocida Steriplant<sup>®</sup>N na osnovi EO. Razkuževanje prostora za MR s tem sistemom je zmanjšalo število kolonij (CFU)/m<sup>3</sup> zraka za 87 % in 96 % v 6 oziroma 15 minutah razkuževanja.

Študije o možnosti uporabe EO za razkuževanje radiološke opreme in prostorov so se začele leta 2012 v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor, na Oddelku za radiologijo. V prejšnji študiji smo dokazali, da smo površino 3 T MR skenerja GE Signa HDxt učinkovito razkužili z EO Steriplant<sup>®</sup>N (Inštitut za biotehnične vede Obisan, Slovenija) z uporabo hladnega zamegljevanja s sistemom OPTI-JET CSC MD1 MR (Swiss Steriplant AG, Švica, in modifikacija Obisan, Slovenija) (Pintarič, 2015). Učinkovito zmanjšanje skupnega števila mikroorganizmov (78-92%) na površinah je bilo doseženo s samo 6–8 ml raztopine biocida/m<sup>3</sup> v 12 min. Zato ga je mogoče uporabiti za razkuževanje aparatov in prostorov med posameznimi diagnostičnimi ali operativnimi postopki ali celo med njihovim potekom. Za prilagoditev posebnemu okolju v 3T MRI smo zdaj razvili aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE s posebnimi šobami (10-15 mikronov) za hladno zamegljevanje, ki so združljive z 3T MRI (Pintarič, 2015). Aerosolizator je ves čas nameščen v prostoru za MR, tako da je mogoče razkuževanje izvajati med posameznimi pregledi bolnikov. Vendar je treba za

uporabo hladnega zameglevanja med prisotnostjo medicinskega osebja ali bolnikov zagotoviti ustrezno pogoje dela.

## Poglavje 2

# Raziskovalni problem in hipoteze

### 2.1 Utemeljitev raziskave

S študijo, ki je potrdila možnost, da diagnostični prostor za MR predstavlja rezervoar za MRSA zaradi velikosti odprtine aparata (gentry), ki jo je težko očistiti in razkužiti (Shelly, 2011) so opravili na Irskem. Ustrezno čiščenje je mogoče doseči z neposrednim vstopom v odprtino ali z uporabo ščetk z dolgimi ročaji. To vzbuja veliko skrb, saj gre za območje, ki se redko, če sploh, ustrezno očisti, je pa v zelo tesnem stiku z bolniki. Ročno čiščenje in razkuževanje imata pomembno vlogo pri zmanjševanju patogenov v zdravstvenem okolju in zmanjševanju tveganja prenosa okužb. Vendar pa so študije pokazale, da ročno čiščenje ni predvidljivo in pogosto neoptimalno. Odvisno je od opravljenega dela čistilnega osebja in količine ter uporabe razkužil. Prejšnje zdravstvene študije so pokazale, da je le 47 % površin ustrezno razkuženih (Ariza-Heredia, 2018). Študije, ki so pokazale, da lahko izboljšane strategije razkuževanja, vključno z dodatnimi tehnologijami „brez dotika“ (med katere spada tudi hladno zamegljevanje), pomagajo doseči celovitejše zmanjšanje biološke obremenitve okolja (Rutala, 2019, Weber, 2016). Za reševanje težave dostopnosti in optimalnega razkuževanja smo razvili aerosolizator OPTI-JET CSC MD1 MR in biocid EO V (Steriplant<sup>®</sup>N), ki je skladen z zahtevami MR, ter preizkusili njegovo učinkovitost razkuževanja.

Učinkovitost postopkov zdravljenja v bolnišnici je v sodobni medicini odvisna tudi od prostorov, v katerih se izvaja diagnostične, laboratorijske preiskave, posege na pacientih, kooperativno nego pacientov (Aubert, 1991; Baffoy-Fayard, 2003; Balonov, 1999; Buerke, 2012; Chaoui, 1995; Grabsch, 2006). Obremenitve prostorov se povečujejo, saj se povečuje število pregledov in posegov pri pacientih, hkrati pa se skrajša čas, potreben za dezinfekcijo površin, prostorov in opreme. Z večjimi obremenitvami so mikrobne kontaminacije čedalje večje. Posebej izpostavljamo možnost kontaminacije zračnega prostora v bolnišničnih sistemih. Kljub preventivnim ukrepom in zamenjavi ustreznih filtrov v samem sistemu so v večini neučinkoviti za preprečevanje kontaminacije. V diagnostičnem prostoru so poleg površin in zraka tudi pomembna prisotnost bioaerosolov, ki vplivajo na učinkovitost posegov zlasti zaradi možnih infekcijskih kooperativnih zapletov. Bioaerosoli so opredeljeni kot majhni mikrobiološki delci v zraku, vključno s patogenimi ali nepatogenimi bakterijami, virusi, glivami, sporami ali drugimi delci (Kim, 2018). Sestavljeni so lahko tudi iz cvetnega prahu, drugih organskih snovi, toksinov in njihovih stranskih produktov, kot so alergeni z visoko molekularno maso, endotoksini in mikotoksini, po naravi pa so lahko živi ali neživi (Cox, 2020).

Nadaljnjo težavo predstavljajo še vedno rezistentni sevi mikroorganizmov (npr. na meticilin odporni *S. aureus* in drugi), ki dodatno otežujejo postopke dezinfekcije (Chan, 2012; Guerini, 2012; Kim, 2012; Martinez, 2003; Cabanis, 2009; Ramli, 2009; Bibbolino,

2009; Astagneau, 1999; Garcin, 1998; Cowan, 1993). Od biocidov, ki jih v humani medicini uporabljamo za razkuževanje prostorov in opreme, zahtevamo hitro in zanesljivo delovanje proti širokemu spektru patogenov v prisotnosti organskih snovi (slina, kri), brez ostankov na površinah po razkuževanju, da niso jedki za površino in diagnostično opremo, ter so varni za medicinsko osebje, bolnike in površine. EOv je dezinfekcijsko sredstvo nove generacije, ki deluje predvsem po fizikalnem in kemičnem načinu delovanja na mikroorganizme. Je biocid, ki s svojim delovanjem elektrone umika iz bakterijskih membran, jih destabilizira in tako uniči. Njegova moč in hitra zmogljivost sta pomembni, brez vpliva na evkariontske celice (brez citotoksičnega učinka v celični kulturi ali škodljivega učinka na piščančji zarodek (Bialka, 2004), po dezinfekciji na površinah ne ostane residuum EOv (Meakin, 2012; Meakin, 2011; Wu, 2008; Landa-Solis, 2005; Vorobjeva, 2004). Ena od prvih uporab EOv je bila 1960 v Rusiji za sterilizacijo kirurških instrumentov (Nikitin, 1965).

Uporaba EOv z metodo zamegljevanja je relativno nova metoda. Z modeli zamegljevanikov OPTI JET smo začeli predvsem v prehrabeni industriji in veterini. Leta 2011 smo prvič objavili na radiološkem kongresu na Dunaju, učinek razkuževanja površin na MR dignostiki (Pintarič, 2011). EOv je produkt pridobljen s pomočjo postopka elektrolize. Kisla frakcija, ki pri tem nastane ima pomanjkanje elektronov, kar se izkorišča kot biocidno sredstvo. Lahko rečemo, da je frakcija v metastabilnem stanju s težnjo, da pridobi elektrone iz okolice in se vrne v stabilno stanje. Med proizvodnjo nastajajo tudi druge biocidne spojine kot stranski produkti elektrolize, vendar v zelo nizkih koncentracijah. Vse to omenjam zato, da bi izpostavil glavno biocidno lastnost delovanja EOv pomanjkanje elektronov in težnjo biocidne raztopine EOv, da se vrne v stabilno stanje. Zaradi te lastnosti je zelo pomemben način aplikacije biocida. Med samo aplikacijo ne sme nastajati elektrostatični naboj pri pretokih biocidne raztopine, saj bi se s tem lahko znatno zmanjšala biocidna učinkovitost ali bi se celo izničila. Zato je pomemben poleg uporabe EOv tudi način aplikacije za uspešno biocidno delovanje, kar pri drugih skupinah biocidnih sredstev ni pomembno. EOv deluje biocidno na prokariotske celice, na kar nakazujejo ugotovitve baktericidne učinkovitosti. Večina biocidov deluje škodljivo tudi na višje razvite evkariontske celice, kar omejuje možnost uporabe neposredno na tkivih ljudi in živali. Prav ta ugotovitev v mojem delu nakazuje na možnost uporabe biocida hladne aerosolizacije, da lahko delujemo na prisotne patogene oz. površinsko mikrobnobno floro ob prisotnih pacientih in osebju v zaprtih prostorih, za katere je takšno okolje neškodljivo. In prav to smo želeli potrditi z našim postopkom simulacije v nadzorovanih pogojih. Za uspešno delovanje so potrebne majhne količine biocidne raztopine. Z odvzemom vzorčnih površin bomo preizkusili zanesljivost postopkov EOv, hladno zamegljevanje radiološkega oddelka, ki nam omogoča uporabo metod dezinfekcije na površinah in v zraku (Pintarič, 2015, Pintarič, 2021). Kot EOv smo uporabili Steriplant<sup>®</sup>N, ki ga proizvaja Inštitut za biotehnoške vede Murska Sobota.

Poznamo različne vrste okoljskih aerosolov, ki jih človek vdihava in vnaša skozi dihalne poti. Okoljski aerosoli lahko pridejo v stik s površino dihalnih poti in povzročijo zdravstvene težave. Razmerje med velikostjo delcev aerosolov in bronhialnimi boleznimi je bilo obsežno raziskano. V zadnjih 25 letih so v drugih raziskavah preučevali nevarnosti aerosolov za zdravje in vzroke zgodnje smrti. Izpostavljenost onesnaženemu zunanjemu zraku povečuje obolevnost in umrljivost ter je glavni dejavnik svetovnega bremena bolezni. Raziskovali so prostorske in časovne trende umrljivosti, ki jih je mogoče pripisati onesnaženosti zunanjega zraka. (ICRP, 1994; Cohen, 2017; Heal, 2012; Lelieveld, 2015). Ti delci imajo premer manj kot 0,1  $\mu\text{m}$  in so prispevali k onesnaženosti zraka. Izpušni plini (5 do 500 nm) (Kumar in Goel, 2016), dim (140 do 500 nm) (Kittelson, 1998; Bernstein, 2004) in radionuklidi (2 do

200 nm) (Keith, 1982) so zavedeni kot aerosoli. V teh študijah so raziskovali sposobnost aerosolov da se odlagajo v dihalnih poteh. V drugih študijah (Kan, 2007; Chen, 2012, 2011; Men, 2013; Breitner, 2011; Li, 2016) so preučevali, koliko delcev se je odložilo v pljučih ljudi v državah z najbolj onesnaženim zrakom. Pri uporabi Steriplant<sup>®</sup>N z metodo hladnega zamegljevanja je posledično tudi do 100 ppm klora v prostoru. Pri opisanih študijah s klorom so primerljive vrednosti, ki jih imamo tudi pri vsakodnevnem razkuževanju prostorov. Razlika je da so diagnostični prostori večji in imajo večji dotok zraka preko klimatskega sistema. Vendar so pogoji in metode za uporabo razkužil vedno bolj specifično določeni tudi zaradi koronavirusa. Klor je eno najbolj znanih razkužil in se uporablja v različnih koncentracijah, ker je klor kot plin nevaren, povzroča lahko respiratorne simptome že pri vrednostih 15 ppm in je lahko smrtonosen pri 430 ppm v 30 minutah vdihavanja (Chauhan, 2008).

Ko klor pride v stik s površinami sluznice in dihalnimi potmi, proizvaja različne kisle oblike in vrsto zelo reaktivnih oksidantov (White in Martin 2010). V raziskavi, ki so jo opravili Elwekeel s sod. je pojasnjeno, kako se delci klora obnašajo v dihalnih poteh človeka, ko je masni delež klora 10 % (120 ppm), 15 % (180 ppm) in 20 % (240 ppm). Glede na to, da je klor nevaren za človeške dihalne poti, omenjena raziskava prikaže učinke masnega deleža klora in velikosti kapljic na človeške dihalne poti. Učinke preučujejo pri masnih razmerjih klora 2 % (24 ppm), 10 % (120 ppm), 15 % (180 ppm) in 20 % (240 ppm), kot tudi pri premerih delcev klora 10 nm, 20 nm, 30 nm in 50 nm ter tri stopnje vdihavanja (15 l/min, 30 l/min in 60 l/min). Rezultati kažejo, da ko je masni delež klora 2 % in je stopnja vdihavanja nizka, se volumski delež klora zmanjša. Poleg tega pri 2 % klora in hitrem dihanju delci klora pospešeno uidejo v pljuča. Delci pospešeno uidejo v bronhialne cevi pri visokem dihalnem pretoku 60 l/min, odvisno od premera klorovih delcev (10 nm, 20 nm, 30 nm in 50 nm) in masnega deleža klora (Elwekeel, 2022). V študiji (Chuang, 2008) v kateri so testirali učinkovitost razkuževanja z uporabo razprševanja z brezmembransko elektrolizirano vodo so jo uporabili proti dvema sevoma v zraku, *S. aureus* in aerosolom virusa  $\lambda$ , v komori, kjer so simulirali pogoje bolnišničnih prostorov. Hitrost izmenjave zraka v komori je bil nadzorovana v časovnem 5 minutnem intervalu v katerem so uporabili koncentracijo 50 in 100 ppm prostega razpoložljivega klora.

Pri vdihavanju v razkuženem prostoru z Steriplant<sup>®</sup> N je zaznati blagi vonj klora. Prvi pomislek je da je razkužilo katerega uporabljamo toksično in da ne smemo v takšen prostor. Steriplant<sup>®</sup> N kot komercialna oblika izdelka vsebuje natrijev hipoklorit, klorat, klorov dioksid in ozon. Pri vsebnosti 110 ppm klora v prostoru človek zazna vonj klora (Elwekeel, 2022). Dnevna uporaba Steriplant<sup>®</sup> N kot razkužilo v diagnostičnih prostorih v katerih dela osebe osem ur dnevno in so prisotni preiskovanci v prostoru tudi do 40 minut so bili razlogi da podrobno analiziramo potencialno škodljive učinke izpostavitve. V tej raziskavi smo proučili morebitno citotoksično in genotoksično delovanje hladnega meglenja s Steriplant<sup>®</sup>N. Pri tem citotoksičnost pokaže takojšnje škodljivo delovanje, medtem ko ugoravljenje genotoksičnosti pokaže potencial povzročanja poškodb DNA, ki lahko vodijo do mutacij in dolgoročno do povečanega tveganja za nastanek raka in nekaterih drugih degenerativnih bolezni.

Glede na to, da uporabljamo metodo hladnega meglenja in s tem vplivamo na kakovost zraka v prostoru smo se odločili smo se za metodo dokazovanja citotoksičnosti in genotoksičnosti *in vitro* na modelu z alveolarnimi človeškimi celicami A459, ki predstavljajo tarčo delovanja morebitnim ostankom Steriplant<sup>®</sup>N. Da smo lahko celice

izpostavili v *in vitro* pogojih kakršnim bi lahko bili izpostavljeni ljudje smo dizajnirali in izdelali simulacijsko komoro. Da smo lahko izpostavili alveolarne celice smo izdelali simulacijsko komoro v kateri smo pripravili enake pogoje kot so v prostoru diagnostike, kjer so izpostavljeni pacienti in osebe med delom. V simulacijski komori smo v *in vitro* pogojih izvedli učinkovitost hladnega megljenja. Pri opravljeni simulaciji na celicah A459, gojenih v enem sloju v petrijevki, ki so bile neposredno izpostavljene hladni megli Steriplant® N, proizvedeni v simulacijski komori smo zaradi občutljivosti celic morali prilagoditi parametre hladnega zamegljevanja. Prilagojene parametre smo nato uporabili tudi pri izdelavi novega zamegljevalnika OPTI JET CS MD 2 ZE.

## 2.2 Toksičnost dezinfekcijskih sredstev za okolje in ljudi

Okoljska varnost porabljenih mikroboicidov je vprašanje, ki ni splošno prepoznano saj naj bi uporaba takih kemikalij koristila ljudem. Vendar se je zdaj, ko so mikroboicidi vključeni v številne potrošniške izdelke, izpostavljenost ljudi in okolja tem kemikalijam že precej povečala. Večina mikroboicidov vsebuje tudi detergente in inertne sestavine, ki lahko okrepijo njihovo delovanje in povečajo njihovo toksičnost. Neposrednih dokazov o tem je malo, ker ni bilo predmet obsežnega in sistematičnega preučevanja, vendar vse bolj začenjamo razumeti, da kompleksne kemične mešanice predstavljajo posebno velika tveganja za okolje, tudi če so posamezne kemikalije morda pod svojim priznanim pragom toksičnosti (Pomati, 2006). Žal je toksičnost aktivnih sestavin mikroboicidov in njihovih stranskih proizvodov v ustreznih pogojih slabo raziskana.

Uredba o biocidnih pripravkih 528/2012, ki velja v državah Evropske unije, ureja aktivne snovi, ki jih vsebuje sestava biocidnih pripravkov, ki se uporabljajo za zaščito ljudi, živali, materiala ali blaga pred bakterijami in drugimi škodljivimi organizmi, ter načela glede dajanja teh izdelkov v promet in njihove uporabe (Eastmond, 2009). Namen tega pravnega predpisa je zagotoviti visoko raven varstva ljudi in okolja. Delovanje biocidnega pripravka je povezano z dejansko učinkovitostjo aktivnih snovi, ki jih vsebuje njegova sestava. Zato je treba aktivne sestavine v vseh biocidnih pripravkih odobriti vnaprej.

Pri uporabi dezinfekcijskih sredstev, ki jih imamo na razpolago v zdravstvu jih večina vsebuje kvarterne amonijeve soli, triklosan in formaldehid. Kvarterne amonijeve spojine so dražilne snovi, ki povzročajo preobčutljivost še posebej na koži. Zaradi prisotnosti amonija lahko povzročijo prebavne in nevrološke težave, pri osebju, ki izvaja dezinfekcijske postopke lahko povzročijo tudi astmo (Rosenberg, 2000). Najdemo jih tudi v medicinskih pripravkih in v produktih za osebno higieno. S testi genotoksičnosti določimo koliko je določeni agens sposoben poškodovati DNA in povzročiti mutacije in druge genetske spremembe v celicah živih organizmov. Na osnovi testov izdelamo oceno genotoksičnosti, ki je ključni dejavnik pri oceni varnosti katere koli snovi. Genotoksične snovi lahko na DNA delujejo direktno ali pa vplivajo na celične organele ki zagotavljajo natančno podvajevanje DNA (niti delitvenega vretena, topoizomerozo, DNA polimerozo). Spremembe, ki jih povzročajo genotoksični agensi so genske mutacije, spremembe v strukturi in številu kromosomov (Eastmon, 2009).

Genotoksičnost kvarternih amonijevih spojin so dokazovali na modelu alge (Pérez, 2009) in na sistemih vodnih bolh (Lavorgna, 2016). Eksperimentalni model na osnovi katerega smo proučili genotoksičnost biocida Steriplant®N so bile človeške alveolarne epitelijske celice A549, pridobljene iz pljučnega karcinoma tipa II s testom. Z omenjenim pristopom lahko ovrednotimo potencialno genotoksičnost omenjenega na osnovi katerega lahko sklepamo kakšna je nevarnost omenjenega biocida za ljudi.

Triklosan kot dezificiens se že desetletja, od zgodnjih 1940-ih, uporablja kot fungicid in konzervans v različnih izdelkih, tekstilstvu, gospodinjstvu, medicinskih materialih in kozmetiki (Iacopetta, 2021). Učinkovit je proti številnim različnim bakterijam, pa tudi proti nekaterim glivam in praživalim, saj zavira sintezo maščobnih kislin in s tem povzroča motnje celovitosti membrane (Shrestha, 2020). Dermalna uporaba izdelkov za osebno nego je glavni način izpostavljenosti človeka triklosanu, čeprav lahko pride v človeško telo tudi z uporabo zobne paste, ustnimi vodami in zobozdravstvenimi sredstvi. Posledično so ga odkrili v človeških vzorcih, kot so kri (Zhang, 2022, Pycke, 2014, Wei, 2017) materino mleko (Toms, 2011, Kim, 2020) urin (Asimakopoulos, 2014, Iyer, 2018, Li, 2018) lasje in nohti (Tian, 2023, Yin, 2016).

V EU je v skladu z veljavno uredbo o kozmetičnih izdelkih št. 1223/2009 je dovoljeno uporabljati Triklosan kot konzervans v kozmetičnih izdelkih z največjo koncentracijo 0,3 % v zobni pasti, milih za roke, milih za telo/gelih za tuširanje. Poleg tega je dovoljen v ustnih vodah z največjo koncentracijo 0,2 %. Evropska agencija za kemikalije (ECHA) je razvrstila triklosan kot negenotoksičnega (Heidemann, 1990).

Genotoksičnost triklosana je bila dokazana s številnimi standardi in testi genotoksičnosti, vključno s testi bakterijske reverzne mutacije, in vitro testom genske mutacije celic sesalcev, in vitro testi kromosomskih aberacij sesalcev in testom kromosomskih aberacij kostnega mozga sesalcev. Po poročanju FDA (angl. Food and Drug Administration) prevladujoči podatki kažejo, da triklosan ni genotoksičen. NICNAS (angl. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme) je prišel do podobnega zaključka. EPA (angl. Environmental Protection Agency) je zagotovila podroben pregled sedmih testov genotoksičnosti. Povzetek poročila je, da so bili vsi testi, razen enega (in vitro citogenetski test s pljučnimi fibroblasti kitajskega hrčka), negativni (Heidemann, 1990). Zato je soglasje o tehtnosti dokazov o genotoksičnosti triklosana, da ni genotoksičen in rakotvoren.

Formaldehid se uporablja kot razkužilo v tekočem in plinastem stanju. Formaldehid se prodaja in uporablja predvsem kot raztopina na vodni osnovi, imenovana formalin, ki vsebuje 37 % formaldehida glede na maso. Vodna raztopina se uporablja kot baktericid, tuberkulocid, fungicid, virucid in sporicid (Klein, 1963, Rubbo, 1967, Favero, 1991, Rutala, 2024). Formaldehid deluje na način da inaktivira mikroorganizme z alkiliranjem amino in sulfhidralnih skupin proteinov in obročnih dušikovih atomov purinskih baz (Favero, 1991). Mikrobicidno delovanje formaldehida je opisano z različnimi koncentracijami vodnih raztopin formaldehida, ki uničijo širok spekter mikroorganizmov. Za inaktivacijo poliovirusa v 10 minutah je bila potrebna 8% koncentracija formalina, vsi drugi testirani virusi pa so bili inaktivirani z 2% formalinom (Klein, 1963). Tuberkulocidno sredstvo, ki vsebuje 4% formaldehida, inaktivira  $10^4$  M. tuberculosis v 2 minutah (Rubbo, 1967) in 2,5 % formaldehida inaktiviranega približno  $10^7$  Salmonella Typhi v 10 minutah v prisotnosti organske snovi (McCulloch, 1936). Sporicidno delovanje formaldehida je bilo počasnejše od delovanja glutaraldehida v primerjalnih testih s 4% vodnim formaldehidom in 2% glutaraldehidom proti sporam B. anthracis (Rubbo, 1967, Rutala, 2024). Raztopina formaldehida zahteva 2 uri stika, da bi dosegel inaktivacijski faktor  $10^4$ , medtem ko je glutaraldehid potreboval le 15 minut.

Uprava za varstvo pri delu je navedla, da je treba s formaldehidom ravnati na delovnem mestu kot s potencialno rakotvorno snovjo, in določila standard izpostavljenosti zaposlenih za formaldehid, ki omejuje 8 urno časovno določeno povprečno koncentracijo izpostavljenosti 0,75 ppm (OSHA, 2002.) Standard vključuje drugo dovoljeno mejo izpostavljenosti v obliki mejne vrednosti kratkotrajne izpostavljenosti 2 ppm, ki je največja dovoljena izpostavljenost v 15-minutnem obdobju (OSHA, 2002). Zaužitje formaldehida je lahko usodno, dolgotrajna izpostavljenost nizkim količinam v zraku ali na koži pa lahko povzroči astmi podobne težave z dihanjem in draženje kože, kot sta dermatitis in srbenje. Zaradi teh razlogov bi morali imeti zaposleni omejene neposredne stike s formaldehidom, ti pomisleki pa omejujejo njegovo vlogo v postopkih sterilizacije in dezinfekcije. Ključne določbe standarda uprave za varstvo pri delu, ki ščiti delavce pred izpostavljenostjo formaldehidu, so navedene v predpisih uprave za varstvo pri delu del 1910.1048 (in enakovrednih predpisih v državah z državnimi načrti, ki jih je odobrila uprava za varstvo pri delu) (OSHA, 1993).

## 2.3 Učinkovitost dezinfekcijskih sredstev na mikrobne mehanizme

Številne aktivne sestavine v mikrobicidih neposredno vplivajo na nukleinske kisline in beljakovine (vključno z encimi). Zato lahko na različne načine vplivajo na podvajanje DNK, vključno z neposrednim povzročanjem mutacij (Sakagami, 1988, Zeiger, 2005). Več kemikalij v mikrobicidih je opredeljenih tudi kot rakotvorne snovi (Zeiger, 2005; Brusick, 2005). Poleg tega se je izkazalo, da nekatere sestavine povzročajo hormonske motnje (Fang et. al., 2003). Subletalna izpostavljenost mikroorganizmov mikrobicidom vedno vodi do selekcije organizmov z zmanjšano občutljivostjo na uporabljeni pritisk. Izraza "toleranca" in "odpornost", ki se v nadaljevanju uporabljata za opis sprememb občutljivosti na kemikalije, ne označujeta posebnih mehanizmov in sta zgolj opisna izraza za opažene pojave. Čeprav lahko mutageni učinek mikrobicidnih kemikalij enako povzroči seve z manjšo toleranco na uporabljeni stresor, so slednji neizogibno selekcionirani, če se selekcijski pritisk izvaja večkrat ali neprekinjeno.

Zmanjšana občutljivost lahko nastane zaradi mutacij, ki vplivajo na vdor toksina v celico na ravni membrane. Čeprav je mogoče pričakovati, da so taki mehanizmi "zadržanja" razmeroma pogosti, pa so lahko take celice v konkurenčno slabšem položaju in ne uspevajo, če je hkrati oslABLJENA prepustnost membrane za molekule hranil in druge koristne kemikalije. Vendar imajo bakterijske celice vgrajene tudi mehanizme za spopadanje z okoljskimi toksini, ki vključujejo črpalke za izločanje, ki lahko hitro izločijo vrsto kemikalij iz celic. Opazovani mehanizmi odpornosti na mikrobicide pogosto vključujejo take črpalke za izločanje (McGowan, 2006; Piddock, 2006; DeRossi, 2006). Ker veliko mikrobicidov reagira s številnimi znotrajceličnimi kemikalijami, je za celico težko ali nemogoče spremeniti več tarč hkrati; kljub temu je spreminjanje tarč strategija, ki jo lahko gram-negativne bakterije uporabijo proti bolj specifičnim protimikrobnim spojinam, vključno z antibiotiki (Janna in Deb, 2006; Cherepenko in Hovorun, 2005).

Drug mehanizem, s katerim se mikrobi spopadajo s toksini, je proizvodnja presežka spojin, ki lahko reagirajo s strupenimi snovmi, s čimer postanejo neškodljive. To se lahko

zgori znotraj celice in tudi z izvažanjem takih metabolitov v zunanost celice. Tako funkcijo lahko delno opravljajo sekundarni metaboliti, ki se izvažajo iz bakterijskih celic v stacionarni fazi ali iz zunajceličnega matriksa v biofilmih. Razpon strategij, ki jih lahko mikrobi uporabijo proti strupenim kemikalijam, pa je omejen, zato se lahko toleranca na en toksin razširi na druge. Najbolj zaskrbljujoče je, da lahko povečana odpornost na okoljske kemikalije, kot so subletalne koncentracije mikrobicidov, privede do zmanjšane občutljivosti na antibiotike pri izpostavljenih sevih. Triklosan je kemikalija, za katero je največ dokazov o navzkrižni odpornosti (Aiello in Larson, 2003; Aiello, 2004; Ledder, 2006), pri čemer je bil kot glavni cilj naveden en sam encimski sistem (McMurry, 1998), čeprav je bilo to nedavno ovrženo kot preveč poenostavljeno. Escalada s sodelavci v svoji študiji predstavi učinke triklosana proti številnim mikroorganizmom na različnih stopnjah njihove faze rasti populacije. Nizke koncentracije triklosana so vplivale na rast več bakterij, medtem ko so bile višje koncentracije baktericidne ne glede na bakterijsko fazo rasti populacije. Predstavili so dokaze, da je interakcija triklosana z bakterijsko celico zapletena in njegove smrtnosti ni mogoče razložiti zgolj z zaviranjem presnovnih poti v bakterijski celici (Escalada, 2005).

Navzkrižno odpornost je mogoče zlahka laboratorijsko dokazati za *Escherichia coli* in na drugih vrstah bakterij (Ledder, 2006), vendar še ni bila ustrezno dokazana. Tudi če so izbrani odporni kloni, njihov pomen v širšem ekološkem kontekstu ni jasen (Aiello, 2004; Gilbert, 2002). Kljub temu pa ne bi smel biti zaskrbljujoč le triklosan, temveč tudi hipermutabilne regije bakterijskih genomov, ki so lahko občutljive na spremembe zaradi različnih dejavnikov, vključno z mikrobicidi in mutagenimi ostanki razkuževanja in obstajajo vsi razlogi za domnevo, da bi lahko, čeprav so taki dogodki razmeroma redki, njihova selekcija v ustreznih okoljskih pogojih privedla do njihove prevlade. Izpostavljenost kvarternim amonijevim spojinam na ima realno možnost, da pri okoljskih izolatih privede do odpornosti proti antibiotikom zaradi visoke sočasne selekcije integronov razreda 1 z odpornostjo proti kvarternim amonijevim spojinam (Gaze, 2005). Dokazi za in proti bolj razširjeni navzkrižni odpornosti so omejeni. Po eni strani nekatere študije niso dokazale povezave med odpornostjo proti antibiotikom in toleranco na okoljske kemikalije (Cole, 2003), po drugi strani pa druge študije kažejo, da do nje prihaja (Gaze, 2005; Braoudaki in Hilton, 2004).

V nekaterih primerih so pri bakterijah v čisti kulturi vidni rezultati, ki se morda ne bodo ponovili v naravnih populacijah (Mc Bain, 2004). Dobljeni rezultati so odvisni od uporabljenega eksperimentalnega sistema in metod, uporabljenih za presejanje izolatov. Ker so naključne mutacije za zmanjšano občutljivost nizkofrekvenčne, se bodo sevi, ki imajo lastnosti za prenašanje izpostavljenosti različnim kemikalijam, verjetno redko pojavili v populaciji. Zato so študije, ki uporabljajo le majhno število izolatov, lahko vnaprej predvidene proti navzkrižni odpornosti, medtem ko študije, ki preučujejo veliko število izolatov, lahko bolj verjetno dokažejo njeno pojavnost. Poleg tega je manj verjetno, da bo uporaba mikrobicidov na ravneh zmanjševanja ali blizu njih povzročila navzkrižno odpornost, kot uporaba mikrobicidov, ki delujejo, preden se pojavi inhibicija, in so zato usmerjeni na največje populacije, ki delujejo na izpostavljene bakterije dlje časa. V lastnih študijah so pregledali več kot 27.000 izolatov divjega tipa *E. coli* (K-12) in izogenih mutatornih sevov za povečanje odpornosti proti antibiotikom s stalno izpostavljenostjo razkužilom za pitno vodo ali brez nje (Springthorpe et. al., 2006). Ni presenetljivo, da je mutatorski sev ob izpostavljenosti pokazal večjo pogostost odpornosti na več antibiotikov. Obstoj bakterijskih celic v okolju (Sniegowski, 1997; Kotewicz, 2003) dodatno povečuje možnost spremenjenih odzivov na toksične stresorje in morebitne povezave z odpornostjo proti antibiotikom. Poleg tega so lahko mutatorni sevi pogostejši med patogenimi izolati *E. coli* in drugih bakterij (Denamur, 2002).

## 2.4 Baktericidna sredstva na tržišču

Aktivnost biocidnega izdelka se lahko močno poveča tudi s kombinacijami in izvajanjem uporabe biocida, ki se uporablja za dezinfekcijo ali sterilizacijo. To je mogoče doseči z uporabo toplote, mehanskega dela ali elektromagnetne energije v sistemu. Biocidna spojina, ki se vse pogosteje uporablja kot razkužilo za v prostorih in površinah je hipoklorova kislina. Ugotovljeno je bilo, da je biocidna aktivnost hipoklorove kisline močno odvisna od količine nedisociirane hipoklorove kisline v vodni raztopini (Rideal in Evans, 1921; Johens, 1934). Razlika v aktivnosti med raztopinama z različnima pH je lahko precej velika; na primer, pri pH 6 bo 15 ppm raztopina hipoklorita v 8,5 min dosegla enako učinkovitost kot raztopina pri pH 8 v 42 min. To je posledica koncentracije nedisociirane hipoklorove kisline; v prvem primeru pri pH 6 znaša 96,5 % hipoklorovega aniona v obliki nedisociirane kisline, medtem ko je pri pH 8 nedisociirane le 21 % hipoklorove kisline (Sheltmire, 1962). Problem, ki preprečuje široko uporabo raztopin z nizkim pH, so predvsem težave zaradi hidroliznega razkroja pri skladiščenju in prevozu.

Obstajata dva zanimiva komercialna sistema, ki jima je uspelo zaobiti to težavo z ustvarjanjem hipoklorove kisline na mestu uporabe. Prvi pristop temelji na elektrolizi razredčene raztopine natrijevega klorida. Primer komercialnega sistema je sistem, ki ga proizvaja in prodaja podjetje PuriCore (prej Sterilox). Drugačen, a preprostejši pristop k pridobivanju hipoklorove kisline *in situ* je reakcija v vodi topnega anorganskega halogenida (kot je natrijev klorid) z oksidantom, kot je kalijev monosulfat, kot je opisal Auchincloss. Auchinclossov sistem je osnova za komercializirano različico podjetja DuPont (Virkon S), ki je na voljo v obliki tablet ali prahu. Podjetje DuPont je objavilo podatke o njihovem komercializiranem izdelku v ZDA, ki ima baktericidne in virucidne lastnosti, ki jih je odobril United States Environmental Protection Agency (USEPA) leta 2022. Izdelek se je v veliki meri tržil v kmetijskem in veterinarskem sektorju kot fungicid.

## 2.5 Sinergijske mešanice EOVS

Pri uporabi in načrtovanju biocidnih sinergijskih mešanic je omogočena ponovna uporaba enega najstarejših znanih protimikrobnih sredstev, vodikovega peroksida. Vodikov peroksid kljub širokemu spektru delovanja ter prednostim na področju varnosti pri delu in okolja ni postal splošno priljubljen kot razkužilo. Razlog za to je, da so pogosto potrebne visoke koncentracije in dolgi kontaktni časi, če se uporablja samostojno v vodni raztopini. Na primer, 3-odstotna raztopina vodikovega peroksida potrebuje približno 15 minut, da šestkrat zmanjša število vitalnih bakterij *S. aureus* v suspenziji (Du pont 2022).

Predstavljena je primerjava med biocidno učinkovitostjo karbonatne in kloridne različice in kaže, da je karbonatna kvarterna amonijeva različica približno petkrat učinkovitejša, če se uporablja proti vegetativnim bakterijam v suspenziji izredno trde vode (1400 ppm). Rezultat raziskav v Evropi sta dve zelo zanimivi peroksidni spojini, ki sta bili priglašeni v evropski direktivi o biocidnih izdelkih (BPD) za različne načine uporabe kot razkužilo.

## 2.6 Optimizirana dostava aktivnih snovi

V zadnjih desetih letih je bilo opravljenih veliko raziskav o izboljšanju biocidne učinkovitosti znanih protimikrobnih spojin z absorpcijo celic ali prekinitve membrane s formulacijo v obliki kapljic ali suspendiranih delcev nano velikosti. Hamouda in Baker sta raziskala uporabo površinsko aktivnih lipidnih emulzij za inaktivacijo širokega spektra organizmov, vključno z gram-pozitivnimi in gram-negativnimi bakterijami, bakterijskimi endosporami in virusi (Hamouda, 1999). Ena od preučevanih učinkovin je sestavljena iz emulzije vode iz sojinega olja z oktilfenol etoksilatom kot topnim sredstvom. Sestava ima povprečno velikost kapljic med 400 in 800 nm in naj bi bila stabilna vsaj eno leto. Sestava deluje proti gram-pozitivnim bakterijam in ovojcicam virusov pri 1-odstotni razredčitvi v vodi in naj bi imela dober toksikološki profil (Hamouda, 2000). Prednost v zvezi z registracijo je dejstvo, da obe tehnologiji temeljita na znanih protimikrobnih vrstah, vendar se njuna učinkovitost močno poveča z novimi tehnikami za njihovo dostavo v celico.

## 2.7 Raziskovalni problem

### 2.7.1 Razvoj aerosolizatorja OPTI JET CS MD

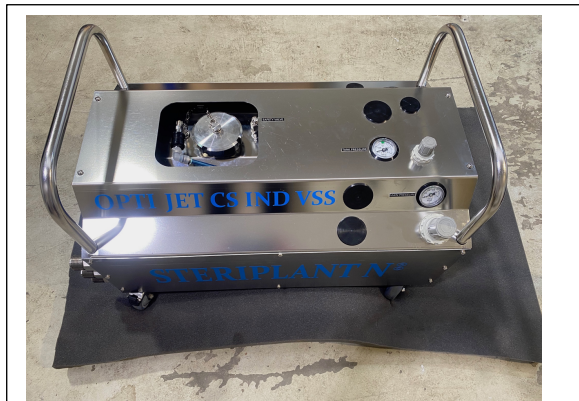
Razvoj aerosolizatorja smo začeli na Inštitutu za Biotehnične vede Murska Sobota ulica Ivana Regenta. Prve modele smo začeli razvijati za potrebe veterine in farm. Takratno povpraševanje po dezinfekciji in razkuževanju prostorov in zraka je bilo veliko. Ideja razkuževanja z biocidom, ki ima lastnosti hitrega učinkovanja, takojšnjega vstopa v prostor in nemotenega delovanja, brez residuuma oz. ostankov na površinah je bila kompleksna.

V grobem smo jo razdelili na:

- izbor pravilnega biocida;
- pravilna aplikacija v prostoru in zraku,
- način aplikacije biocida,
- vzorčenje v prostorih,
- vzorčenje v zraku,
- testiranje,
- razvoj za določene diagnostike v zdravstvu.

Kot ustrezen biocid smo uporabili (EOV) Steriplant<sup>®</sup> N, ki smo ga začeli uporabljati na farmah za razkuževanje površin. Nanos Steriplanta<sup>®</sup>N na površine smo začeli z navadnimi nahrbtnimi pršilniki. Kmalu zatem smo začeli z razvojem in z izbiro in testiranjem primernih šob za pršenje Steriplanta<sup>®</sup>N po prostoru. Kot metodo vzorčenja smo uporabili pasivno metodo ali metodo sedimentacije.

Glede na dosežek nanosa Steriplanta<sup>®</sup>N na površinah smo se odločili da opravimo prvo aerosolizacijo prostora in površin z visokim učinkom delovanja biocida na površino in zrak v prostoru.



Slika 3: OPTI JET CS IND VSS predvidena uporaba za industrijske objekte (Obisan, 2006)

Uporabljen Steriplant<sup>®</sup>N je izdelan s pomočjo membrane elektrolize. Problematika pri Steriplant<sup>®</sup>N se je pojavila pri aplikativnih metodah zamegljevanja. Za Steriplant<sup>®</sup>N ni bilo primerno kakršnokoli vmesno delovanje črpalk na osnovi centrifugalnih sil ali spreminjanja agregatnega stanja tekočine prav tako tudi ne ultrazvočno delovanje na Steriplant<sup>®</sup>N. Steriplant<sup>®</sup>N sestavlja tudi ogromno mikromehurčkov, ki vsebujejo tudi biocidno delujoče plinaste komponente, ki so potrebne za optimalno delovanje. Iz tega razloga smo se odločili da sestavimo prvi aerosolizator leta 2006 (Slika 3).

Aerosolizator je sestavljen iz rezervaja za tekočino, kompresorja in šob. Prvi aerosolizator smo uporabljali v industrijskih prostorih in pri razkuževanju velikih prostorov. Aerosolizator takrat ni vseboval elektronike. V razmišljanju pravilne aplikativne možnosti smo prišli na idejo šob, ki se uporabljajo pri delovanju s pomočjo stisnjene zraka in tekočine. Pri tem se količina in hitrost zraka primerno nastavljata in z mešanico Steriplant<sup>®</sup>N nastane megla, ki ima velikost kapljic od 5 mikronov in več, kar je tudi z vidika toksičnosti zelo pomembno pri vdihavanju.

Vse omenjene parametre smo upoštevali pri razvoju aparatov za zamegljevanje in pri izbiri šob. Za naše potrebe smo uporabili najbolj primerne dvosistemske šobe (slika 4). Poznamo več različnih tipov dvosistemskih šob, ki zahtevajo različne sisteme dovajanja zraka, kar smo s testi preverjali in merili parametre aplikacije Steriplanta<sup>®</sup>N na površini in v zraku. Dvosistemske šobe omogočajo neodvisen nadzor finosti in pretoka atomizacije nastale hladne megle. Pri vseh variantah se pretok uravnava preko obstoječega diferenčnega tlaka tekočine.

Materiali iz katerih so lahko sestavljene dvosistemske šobe so: nerjaveče jeklo, odporno na kisline, nerjaveče jeklo, odporno na vročino, medenina, plastika, tantal, titan.



Slika 4: Dvosistemske šobe. (Obisan, 2006)

Prvi aerosolizator za diagnostične prostore (slika 5) je deloval na principu metode stisnjenega zraka, ki smo ga dovajali iz jeklenk. Pri prvih uporabah smo uporabili velik tlak cca 8 barov s katerim smo s pritokom Steriplanta<sup>®</sup>N iz rezervarja s količino (20 ml/s) uspeli narediti hladno meglo s katero smo zameglili celoten prostor. Šobe so se izkazale za ključni element pri nastajanju hladne megle.

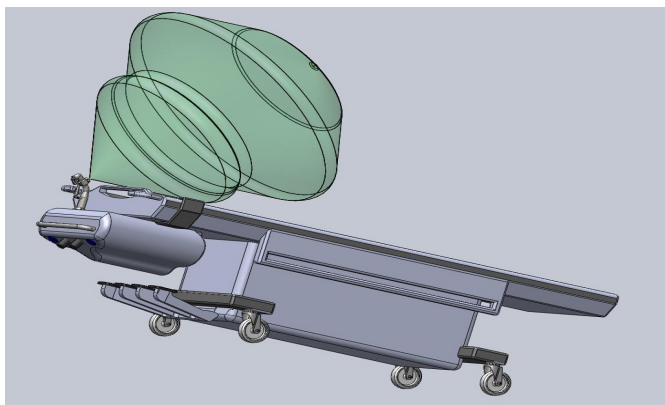


Slika 5: Aerosolizator denti. (Obisan, 2007)

Glede na čas delovanja in velikost prostorov smo ugotovili, da je primerneje uporabljati stisnjen zrak iz obstoječih napeljav, kjer je to mogoče predvsem v zdravstvenih ustanovah.

Vendar so se pokazale potrebe v bolnišnicah po izjemno hitri zameglitvi prostora, saj je čas za dezinfekcijo predvsem med preiskavami omejen. Po določenih testiranjih smo se odločili za uporabo več šob na enem samem aparatu, ki bi omogočile zelo hitro zameglitev in aplicirano ustrezno količino Steriplanta<sup>®</sup>N, ki učinkovito deluje na mikroorganizme in jih uničuje v predpisanih logaritemskih stopnjah.

Enakomerno širjenje biocidne megle v prostor je zelo pomembna fizikalna lastnost megle, ki je odvisna od velikosti kapljic v megli in od potisne hitrosti megle v prostor, kar je bil poseben izziv pri konstrukciji aparatov (slika 6).



Slika 6: Shema simulacije šobe na preiskovalni mizi MR 3T. (Obisan, 2011)

Razvoj aerosolizatorjev smo prilagajali tudi potrebam bolnišnic v različnih diagnostičnih prostorih.

Za MR 3T smo razvit aparat, ki je v večini iz umetnih mas in reguliran pretežno s pnevmatskimi regulatorji in gibajočimi deli, zaradi močnega delovanja megnetnega polja.



Slika 7: OPTI-JET CS MD 1, testiranje pravilnega kota dvosistemskih šob. (Pintarič, 2015)

Soočiti pa smo se morali s premajhno količino stisnjenega zraka/ $m^3$  v minuti, ki smo jo imeli na razpolago v bolnišničnih napeljavah. Pomembno je tudi kje v objektu se nahaja preiskovalni prostor in koliko je odmaknjen od centralnega voda napeljave saj s tem

upada moč stisnjenega zraka. Veliko količino stisnjenega zraka potrebujemo predvsem za dvosistemske šobe. Kot rešitev smo poiskali na tržišču najmanjši in zmogljiv kompresor. Zahteve, ki smo jih morali upoštevati glede izbire kompresorja so bile sledeče:

- da je njegovo delovanje tiho in s tem ne moti okolice predvsem v bolnišničnih prostorih,
- kompresor mora biti brezoljen,
- dovolj močen pretok zraka/m<sup>3</sup>
- dimenzije kompresorja glede na tip in model zamegljevalnika

V razvoju zamegljevalnikov smo v končni fazi uporabili tri šobe (slika 8), kolikor jih je prinesla potreba za prostore v bolnišnicah za hitro izvedbo dezinfekcije prostorov.



Slika 8: OPTI-JET CS MD H.  
(Obisan, 2019)

Začetni aerosolizatorji so bili preveliki in nerodni za premikanje kljub temu da so kompresorji v njih mali. Kompresorje je bilo potrebno umestiti v konstrukcijo, ki je ustrezala premikanju po bolnišnicah in ergonomično so morali aparati biti tudi prilagojeni uporabnikom.

Za zagotovitev ustrezne kakovosti in varnosti električne opreme, namenjene uporabi v določenih napetostnih mejah, je bilo potrebno opredeliti posebne zahteve. Te so določene v direktivi EMC (elektromagnetna združljivost), tj. Evropski direktivi 2014/35/EU.

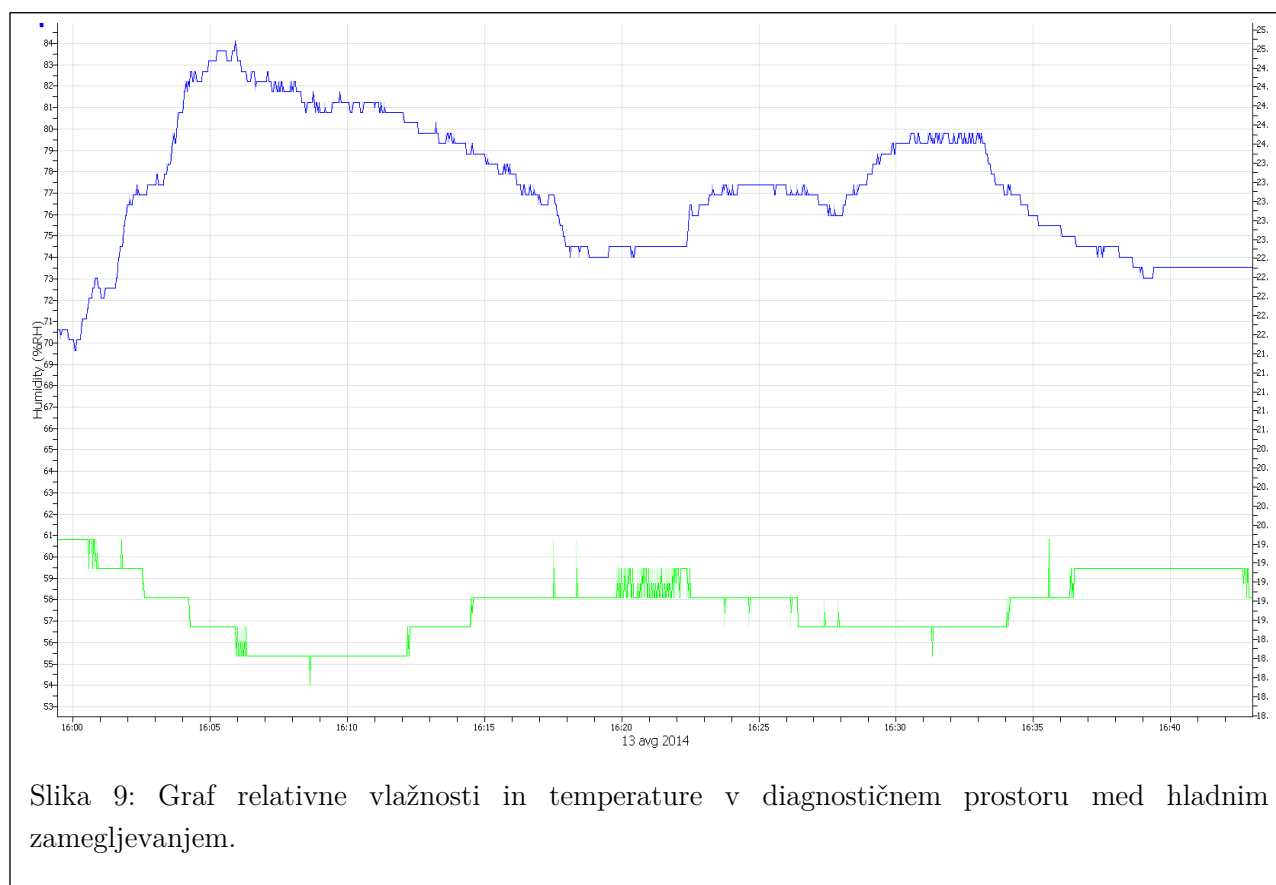
Upoštevali smo tudi sledeče direktive:

- direktiva 2014/30/EU določa bistvene zahteve glede elektromagnetne združljivosti za električno in elektronsko opremo,
- direktiva 2014/29/EU v zvezi z dostopnostjo enostavnih tlačnih posod na trgu.
- direktiva 2006/42/ES o strojih in spremembi direktive 95/16/ES (prenovitev),

- direktiva 2014/35/EU o usklajevanju zakonodaje držav članic v zvezi z dostopnostjo električne opreme, namenjene za uporabo v določenih napetostnih mejah, na trgu,
- direktiva 2014/30/EU v zvezi z elektromagnetno združljivostjo,
- direktiva 2014/29/EU v zvezi z dostopnostjo enostavnih tlačnih posod na trgu,
- uredba komisije (ES) št. 2023/2006 z dne 22. decembra 2006 o dobri proizvodni praksi za materiale in izdelke, namenjene za stik z živili,
- uredba komisije (EU) št. 10/2011 z dne 14. januarja 2011 o plastičnih materialih in izdelkih, namenjenih za stik z živili,
- uporabili smo tudi načela ISO 12100:2010 varnost strojev – splošna načela za načrtovanje – ocena in zmanjšanje tveganja,
- ISO 13857:2008 varnost strojev – varnostne razdalje za preprečevanje doseganja nevarnih območij z zgornjimi in spodnjimi okončinami,
- ISO 60204-1:2006+A1:2009 ta del standarda IEC 60204 velja za uporabo električne, elektronske in programabilne elektronske opreme in sistemov na strojih, ki jih med delom ni mogoče prenašati ročno, vključno s skupino strojev, ki delujejo skupaj na usklajen način,
- EN 1037:1995+A1:2008 standard določa vgrajene varnostne ukrepe, namenjene preprečevanju nepričakovanega zagona stroja, da se omogočijo varni človeški posegi v nevarna območja,
- EN ISO 13849-1:2008 ta del standarda ISO 13849 podaja varnostne zahteve in smernice o načelih za načrtovanje in integracijo z varnostjo povezanih delov krmilnih sistemov, vključno z načrtovanjem programske opreme,
- EN ISO 13850:2006 določa funkcionalne zahteve in načela oblikovanja za funkcijo zaustavitve v sili na strojih, neodvisno od vrste energije, uporabljene za krmiljenje funkcije.

Izdelali smo aerosolizator za hospitalne sisteme po opisanih normativih in standardih. Dobili smo CE certifikat, ki je bil izdan leta 2021 za vse OPTI JET CS MD aerosolizatorje. V prostrih se nahajajo tudi različni zračni pretoki zaradi močnega prezračevalnega sistema katere smo upoštevali pri naših naslednjih meritvah in izboljšavah.

V prostorih smo se tudi soočali z optimizirano relativno vlago, ki smo jo tudi pred testiranjem merili. Relativna vlažnost je pomembna pri optimalnem delovanju aparature MR 3T. Na sliki 9 je v 40 minutnem časovnem intervalu razvidno nihanje relativne vlažnosti med 70 in 84 % (modra krivulja) pri določeni temperaturi med 18,4 in 19 °C (zeleno krivuljo). Najvišja relativna vlažnost 84% je bila po šestih minutah zamegjevanja. Temperatura je v tem času padla za 0,6 °C. Med samim zamegjevanjem v prostorih MR 3T smo hkrati izvedli tudi aktivno vzorčenje zraka.

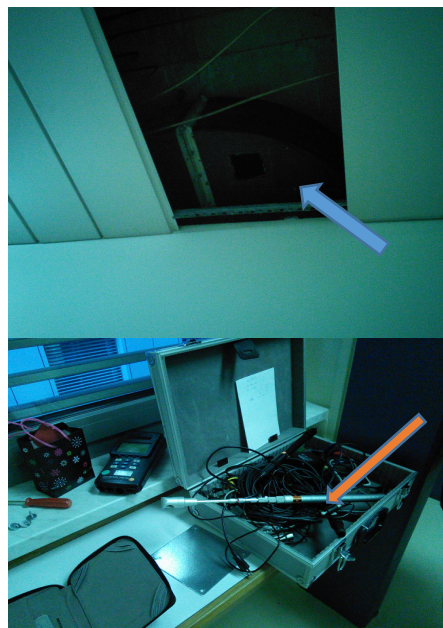


Slika 9: Graf relativne vlažnosti in temperature v diagnostičnem prostoru med hladnim zamegljevanjem.

Merili smo tudi lamilarni pretok zraka v prezračevalnih sistemih (na petih točkah). Z meritvijo smo določili pretok zraka, ki je znašal 0,34 m/s (slika 10 in 11).

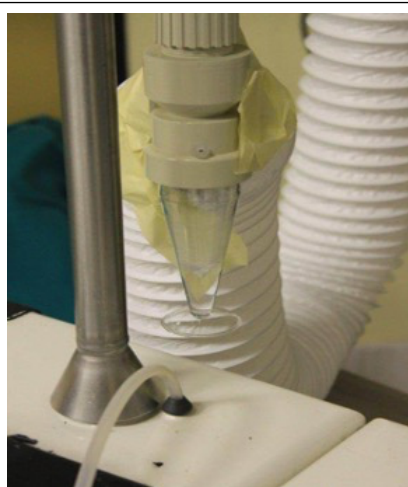


Slika 10: Testo 454 elektronski merilec pretoka zraka. (Pintarič, 2015)



Slika 11: Na zgornji sliki je prikazana odprtina (modra puščica) preko katere smo merili pretok zraka z merilcem za pretok zraka spodnja slika (rdeča puščica). (Pintarič, 2015)

Določili smo tudi koliko prinese prezračevalni sistem mikroorganizmov v diagnostični prostor kljub filtriranju, ki ga izvajajo po bolnišničnih standardih. Zajem klimatskega zraka neposredno ko je prišel v diagnostične prostore je prikazan na sliki 12. Uporabljali smo aktivno tehnologijo zajemanja zraka. Na ta način smo točno določili koliko vpliva klimatski sistem, ki je povezan z bolnišničnim prezračevalnim sistemom na kakovost zraka v diagnostičnih prostorih.



Slika 12: Prikaz neposrednega stika dovoda zraka in tekočinski medij, ki ga uporabljamo pri vzorčenju. (Pintarič, 2015)



Slika 13: Coriolis ciklonski vzorčevalnik zraka in neposreden dotok zraka iz prezračevalnega sistema. (Pintarič, 2015)

Leta 2018 smo pri preiskusu na NIB Ljubljana uporabili simulacijsko komoro (slika 17). Takrat smo tudi uporabili posebne šobe 10 -15 mikronov. Na osnovi predhodnega testiranja in rezultatov porabe stisnjene volumna in količino Steriplant<sup>®</sup>N, smo uporabili omenjene šobe pri aerosolizatorju OPTI JET CS MDZE (slika 15). OPTI JET CS MDZE model aerosolizatorja je bil prvi s posebnimi šobami, ki smo jih uporabljali na nivoju tri šobne tehnologije aerosolizatorjev in jih uporabljamo v diagnostičnih prostorih v zdravstvenih ustanovah.

## 2.7.2 Uporabnost aerosolizatorja v bolnišničnih diagnostičnih prostorih

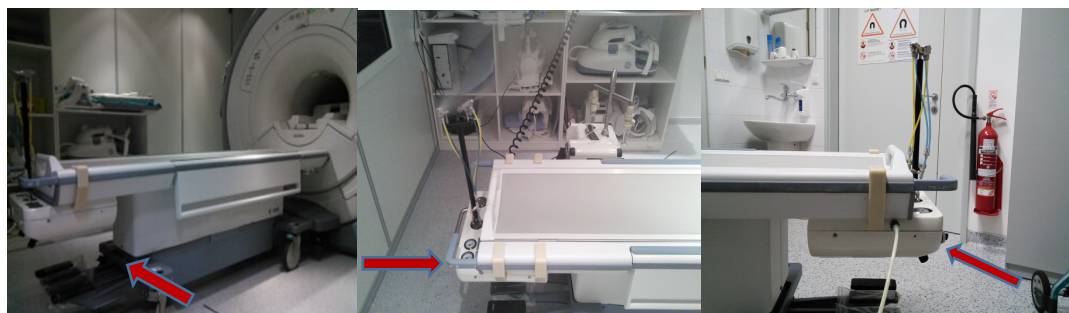
Učinkovitost postopkov zdravljenja v bolnišnicah je v sodobni medicini odvisna tudi od prostora, v katerem deluje diagnostika, laboratorijske preiskave, posegi na bolnikih in pooperativna oskrba bolnikov, ter drugih podpornih objektov (Aubert, 1991; Baffoy-Fayard, 2003; Balonov, 1999; Buerke, 2012; Chaoui, 1995; Grabsch, 2006). Obremenitve prostorov se povečujejo, saj se povečuje število pregledov in posegov pri bolnikih, čas, potreben za razkuževanje površin, prostorov in opreme, pa se krajša.

Z večjimi obremenitvami so posledično tudi bolj izpostavljeni mikrobiološki kontaminaciji površine bolnikov in tudi zdravstvenega osebja. Še posebej je poudarjena možnost kontaminacije zračnega prostora v prezračevalnih bolnišničnih sistemih. Kljub preventivnim ukrepom in zamenjavi ustreznih filtrov v samem sistemu bo preprečevanje kontaminacije neučinkovito. Poleg površin in zraka v diagnostičnem območju je pomembna tudi prisotnost bioaerosolov, ki pomembno vplivajo na učinkovitost posegov pri bolnikih zaradi mogočih pooperativnih zapletov. Dodatne težave še vedno predstavljajo odporni sevi mikroorganizmov (npr. *S. aureus*, odporen na meticilin, in drugi), ki dodatno otežujejo postopke razkuževanja (Chan, 2012; Guerini, 2012; Kim, 2012; Martinez, 2003; Cabanis &

Chouard, 2009; Ramli, 2009; Bibbolino, 2009; Astagneau, 1999; Garcin, 1998; Cowan, 1993).

Biocidi, ki se uporabljajo v humani medicini za razkuževanje prostorov in opreme, morajo torej hitro in zanesljivo delovati proti širokemu spektru patogenov v prisotnosti organskih snovi (slina, kri), brez ostankov na površinah po razkuževanju. Ne smejo biti korozivni za površine in diagnostično opremo, ter morajo biti prijazni do izvajalca razkuževanja in varni za zdravstveno osebje in bolnike. EOJ je razkužilo nove generacije, ki ima predvsem fizikalni in kemični način delovanja na mikroorganizme. Je biocid, ki odstrani elektrone iz bakterijskih membran in jih tako destabilizira ter uniči. Njegova moč in hitro delovanje sta izjemna, ne vpliva na evkariontske celice (nima citotoksičnega učinka v celični kulturi ali škodljivega učinka na piščančji zarodek), po razkuževanju na površinah ni nobenih ostankov (Meakin, 2012; Meakin, 2011; Wu, 2008; Landa-Solis, 2005; Vorobjeva, 2004). Z odvzemom vzorčnih površin smo preverili zanesljivost postopkov z EOJ, hladno zamegljevanje v osnovi klimatskega sistema na radiološkem oddelku, ki nam omogoča uporabo razkuževalnih metod na površinah in v zraku.

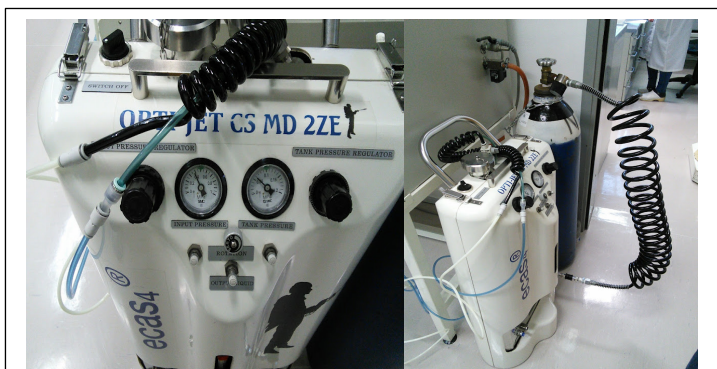
Študije o možnosti uporabe EOJ za razkuževanje radiološke opreme in prostorov so se začele v UKC Maribor, na Oddelku za radiologijo. V eni od prejšnjih študij smo dokazali, da smo površino 3.0 Tesla (T) magnetne resonance (MR) GE Signa HDxt učinkovito razkužili z EOJ Steriplant<sup>®</sup>N (Inštitut za biotehnoške raziskave Obisan, Slovenija) z uporabo hladnega zamegljevanja z aerosolizacijskim sistemom OPTI-JET CSC MD1MR (Pintarič, 2015). Učinkovito zmanjšanje bakterijskega bremena na površinah je bilo doseženo s samo 6–8 ml raztopine biocida/m<sup>3</sup> v 12 min.



Slika 14: OPTI-JETCSCMD1MR aerosolizator (rdeča puščica). (Pintarič, 2018)

Zato ga je mogoče uporabiti za razkuževanje aparaturne in prostora med posameznimi diagnostičnimi ali operativnimi postopki ali celo med njihovim potekom. Za prilagoditev v posebnemu okolju na 3T MR smo zdaj razvili aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE (slika 15) s posebnimi šobami za hladno zamegljevanje, ki so združljive s 3T MR (Pintarič, 2015).

Aerosolizator je ves čas nameščen v prostoru za MR diagnostiko, tako da je mogoče razkuževanje izvajati med posameznimi pregledi bolnikov (slika 14). Vendar je treba za uporabo hladnega zamegljevanja med prisotnostjo medicinskega osebja ali bolnikov zagotoviti ustrezno varnost z normativi in protokolom izvajanja hladnega zamegljevanja.



Slika 15: OPTI-JET CSMD2ZE. (Pintarič, 2018)

Ocenili smo učinkovitost hladnega zamegljevanja Steriplant<sup>®</sup>N za razkuževanje zraka ter njegovo potencialno citotoksičnost in genotoksičnost za človeške alveolarne epiteljske celice A549 *in vitro*. Učinkovitost razkuževanja smo preučevali na kraju samem v prostoru za 3T MR na Oddelku za radiologijo z določanjem števila mikroorganizmov pred in po hladnem zamegljevanju. Citotoksičnost in genotoksičnost sta bili določeni pri pogojih izpostavljenosti, ki simulirajo pogoje v diagnostičnem prostoru MR med zamegljevanjem. Za ta namen je bila zasnovana in izdelana simulacijska komora, ki simulira pogoje izpostavljenosti v diagnostičnem prostoru za 3T MRI na Oddelku za radiologijo. Celice A459, gojene v monosloju v petrijevki, so bile neposredno izpostavljene hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N, proizvedeni v simulacijski komori. Citotoksičnost je bila določena s testom absorpcije propidijevga jodida, genotoksičnost pa z merjenjem tvorbe fosforiliranega histona H2AX, ki je pokazatelj tvorbe dvoverižnih prelomov DNK.

## 2.8 Hipoteze

Poglavitno raziskovalno vprašanje je kako uporabiti EOVS Steriplant<sup>®</sup>N v diagnostičnih prostorih med delovnim procesom, brez negativnih učinkov na diagnostično opremo, paciente in osebje.

Raziskovalno vprašanje smo razdelili na tri dele:

1. Analizni del dosedanje uporabe EOVS v radiologiji in MR diagnostikah.
2. V tehničnem delu je zlasti pomemben razvoj izboljšane aerosolizatorja.
3. Toksikološki del v katerem analiziramo vpliv EOVS na človeške celice.

Iz raziskovalnega vprašanja smo postavili naslednje hipoteze:

1. Dokazati želimo da z obstoječim aerosolizatorjem OPTI JET CS MD1 MR in s šobami 20-30 mikronov dosežemo dezinfekcijo v zraku na radioloških in MR diagnostikah s pomočjo aerosolov.

2. Predvidevamo da bomo z uporabo izboljšane aerosolizatorja OPTI JET CS MD 2 ZE s posebnimi 10-15 mikronskimi šobami za hladno zamegljevanje dosegli izboljšavo pri kakovosti samega zamegljevanja z aerosoli in dosegli manjšo uporabo EO.V.

3. Predvidevamo da aerosol Steriplant<sup>®</sup>N pri pogojih zamegljevanja, ki simulirajo pogoje v MR prostorih med razkuževanjem ne povzroči citotoksičnih in genotoksičnih učinkov pri človeških alveolarnih epiteljskih celicah A549 *in vitro*.

## Poglavje 2

# Metode

V metodološkem delu so predstavljeni trije metodološki deli, ki so združeni. Tu predstavljamo tudi vse metode, ki so bile uporabljene v doktorski nalogi.

### 3.1 Metoda vzorčenja za določanje mikroorganizmov v zraku in na površinah

Na Oddelku za radiologijo Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Maribor smo se v iskanju možne rešitve odločili, da bodo testirali vzorce zraka in vzorce, odvzetih s preskusnih površin različnih vrst diagnostične opreme, da bi ugotovili dejansko stanje in obseg prisotnosti mikroorganizmov v zraku ter njihov pomen za kontaminacijo površin. Študija je bila prijavljena kot interni raziskovalni projekt IRP-2012/01-16. Etična komisija Republike Slovenije je študijo odobrila pod zaporedno številko 110/05/11. Poleg tega je bila preizkušena možnost aerosolizacije zraka z EOVS. Natančneje, testiran je bil izdelek Steriplant<sup>®</sup>N, ki ga proizvaja Obisan Inštitut za biotehnološke raziskave in razvoj iz Murske Sobote v Sloveniji. Komercialna oblika izdelka vsebuje natrijev hipoklorit, klorat, klorov dioksid in ozon. Njegova pH vrednost je med 6 in 8, redoks potencial pa je  $+800 \pm 100$  mV. V raziskavo je bilo vključenih 6 diagnostičnih prostorov, od tega dva za angiografijo, dva za CT in dva za MR. Namen raziskave je bil ugotoviti učinkovitost biocidnega delovanja uporabljenega Steriplant<sup>®</sup>N na prisotni bioaerosol. Za ugotavljanje stopnje kontaminacije je bila izvedena identifikacija prisotnosti mikroorganizmov v zraku in na površinah, da bi lahko določili pomen zmanjšanja števila mikroorganizmov, prisotnih v zraku, z aerosolizacijo Steriplant<sup>®</sup>N.

Začeli smo s preskusi vzorcev zraka in vzorcev, odvzetih s preskusnih površin različnih vrst diagnostične opreme, da bi ugotovili dejansko stanje in obseg prisotnosti mikroorganizmov v zraku ter njihov pomen za kontaminacijo površin. Po standardu ISO 146441:2015 lahko kvalitativno in kvantitativno ocenjujemo aerosolizirane delce. Gre za metodologijo za katero je značilna visoka ponovljivost in natančnost, vendar rezultati slabo korelirajo z mikrobno obremenitvijo, zaradi česar je težko oceniti tveganje za okužbe, povezane z zdravstveno oskrbo (Hofmann, 2003; Landrin, 2003). Z mikrobiološkimi metodami dobimo rezultate, ki najbolj realno predstavljajo mikrobno kontaminacijo in s tem tveganje za pacienta. Načela in osnovna metodologija tega nadzora biokontaminacije so formalizirani v ISO 14698-1:2003. Biokontaminacija je vnos nalezljivih materialov, kot so virusi, bakterije, plesni, glive, prioni, kvasovke, praživali ali njihovi stranski produkti, na sicer čista, sterilna ali varna okolja/površine, kjer jih ne bi smeli najti, in v dovolj visokih koncentracijah, npr. da so lahko škodljivi za naše zdravje in varnost/učinkovitost zdravil (ISO 14698-1:2003). Poleg tega je bila preizkušena možnost aerosolizacije zraka z EOVS Steriplant<sup>®</sup>N, ki jo

proizvaja Inštitut za biotehnološke raziskave Obisan, Murska Sobota. Na začetku smo vključili 6 diagnostičnih prostorov z opremo, od tega dva za angiografijo, dva za CT in dva za MRI. S podatki, zbranimi v raziskavi, želimo ugotoviti učinkovitost biocidnega delovanja uporabljenega Steriplant<sup>®</sup>N na prisotni bioaerosol. Za ugotavljanje stopnje kontaminacije je bila izvedena identifikacija prisotnosti mikroorganizmov v zraku in na površinah, da bi lahko določili pomen zmanjšanja števila mikroorganizmov, prisotnih v zraku, z aerosolizacijo Steriplant<sup>®</sup>N (Pintarič, 2015).

### 3.1.1 Pasivna metoda zbiranja vzorcev zraka

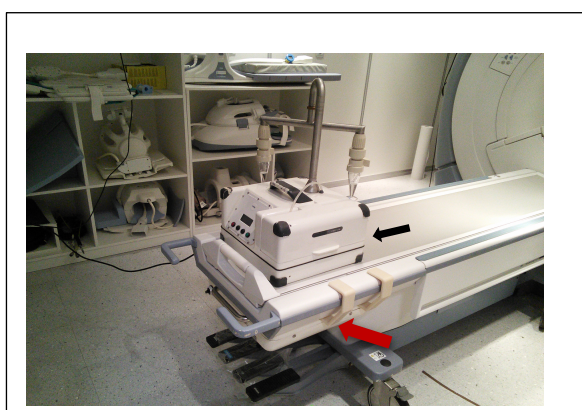
Pri pasivni metodi zbiranja vzorcev ali sedimentaciji smo uporabili ISO standard 14698-1:2003, ki vsebuje dva dela. Prvi del standarda ISO 14698 določa načela in osnovno metodologijo formalnega sistema nadzora biokontaminacije (formalni sistem) za ocenjevanje in nadzor biokontaminacije, kadar se v ta namen uporablja tehnologija čistih prostorov. Določa metode, potrebne za dosledno spremljanje območij tveganja in za uporabo nadzornih ukrepov, ki ustrezajo stopnji vključenega tveganja. Na območjih, kjer je tveganje nizko, se lahko uporablja kot vir informacij. Drugi del standarda ISO 14698 podaja smernice o metodah za vrednotenje mikrobioloških podatkov in oceno rezultatov, dobljenih z vzorčenjem živih delcev na območjih tveganja za nadzor biokontaminacije. Kjer je primerno, ga je treba uporabljati v povezavi z ISO 14698-1. Za ugotavljanje prisotnosti mikroorganizmov smo uporabili metodo sedimentacije mikroorganizmov neposredno na površini pripravljenega gojišča, ki spada med pasivno metodo vzorčenja. Pasivno vzorčenje zraka je najbolj dostopna in ekonomična metoda vzorčenja bioaerosolov (Amato, 2017, Tolabi, 2019). Obstaja samo ena metoda pasivnega vzorčenja to je metoda sedimentacije, pri kateri so odprte plošče agarja (petrijevke) nekaj časa izpostavljene v prostoru – ISO 14698-1. Po izpostavitvi se usedalne plošče pokrijejo in inkubirajo pri izbrani temperaturi. Petrijevke (premera 9,0 cm) postavimo na stolček na višini 1 m nad tla, pri čemer mora biti razdalja vsaj 1 m od fizičnih ovir, kot so zidovi, okna in vhodna vrata ali druge ovire v okolju, vzorčenje pa naj traja 1 uro (Fu Shaw, 2018). Pred več kot 20 leti je Pasquarella pomembno prispeval k standardizaciji pasivnega vzorčenja zraka in interpretaciji rezultatov z indeksom mikrobne onesnaženosti zraka (IMA). Opredeljeni so bili razredi kontaminacije in najvišje sprejemljive vrednosti za različna tveganja okužbe ali kontaminacije (Pasquarella, 2000). Določenih je bilo pet razredov IMA, ki predstavljajo različne, naraščajoče stopnje kontaminacije: 0–5 zelo dobro; 6–25 dobro; 26–50 zadostno; 51–75 slabo; in >76 zelo slabo (Pasquarella, 2000). Metoda sedimentacije temelji na usedanju bakterij na izpostavljeno gojišče, tako da so rezultati izraženi v stopnji usedanja v entoh za oblikovanje kolonij na kvadratni meter na uro (CFU/m<sup>2</sup>/h) (Viani, 2020, Pasquarella, 2000). Rezultate je mogoče podati na veliko različnih načinov, kar oteži primerjavo – poleg CFU/m<sup>2</sup>/h so lahko rezultati izraženi tudi kot CFU/dm<sup>2</sup>/h, CFU/cm<sup>2</sup>/h, CFU/ploščo ali celo CFU/m<sup>3</sup>, če se uporablja formula Omelyanskyja (Viani, 2020). Stopnja sedimentacije bakterij je veliko višja kot pri plesni, ker lahko lebdijo in se gibljejo v zraku dalj časa. Zato je tudi občutljivost sedimentacijske metode za dokazovanje bakterij boljša, vsaj pri vzorčenju v čistih prostorih (Fernstorm, 2013). Po eni uri smo petrijevke z zbranimi mikroorganizmi prepeljali v laboratorij.

### 3.1.2 Aktivna metoda zbiranja vzorcev zraka

Druga metoda zbiranja vzorcev zraka je aktivna metoda. Aktivno vzorčenje zraka se izvaja z volumetričnimi metodami, pri katerih se znana prostornina zraka usmeri in trči

na trdne ali tekoče medije v različne tekočine ali na polikarbonatne membranske filtre (Amato, 2017). Izkazalo se je, da so volumetrične metode bolj občutljive od sedimentacijskih metod v čistih prostorih, saj zaznavajo tudi mikroorganizme z nizko hitrostjo sedimentacije (Napoli, 2012).

Pri vzorčenju z impaktorjem (naprava, ki vzorči lebdeče delce v ozračju s pomočjo trkov) se zrak aspirira neposredno na plošče z agarjem ali polikarbonatne filtrirne membrane, medtem ko se pri vzorčenju z impingerjem (naprava, ki deluje na principu pralne steklenice ali tako imenovana plinska steklenica) zrak vsesava v specifično tekočino, ki se lahko uporabi za inokulacijo plošč z agarjem ali za študije molekularne biologije (Chang, 2019). Poznamo različne tipe vzorčevalnikov za vzorčenje z impaktorjem in impingerjem, ki se razlikujejo glede na pretok zraka, prostornino zbranega zraka, število nosilcev agar plošče/membrane itd. Uporabljali smo Coriolisov vzorčevalnik zraka na sliki 16 (proizvajalec Coriolis, Francija) z uporabo ciklonske tehnologije. Z vrtnčastim gibanjem



Slika 16: Coriolis vzorčevalnik zraka (na preiskovalni mizi črna puščica). Aerosolizator OPTI-JET CSMD1MR (pod preiskovalno mizo rdeča puščica). (Pintarič, 2018)

medija in s pomočjo centrifugalne sile so bili vzorci zbrani v bioaerosol in pripravljani za nadaljnjo obdelavo. Pri hitrosti pretoka zraka 300 litrov na minuto je v 4 minutah zbiranja skozi medij tekočega zbiralnika prešlo skupaj 1.200 litrov zraka. Kot tekoči medij je bila uporabljena sterilna fiziološka raztopina, v kateri je bil zbran bioaerosol iz zraka. Pri vzorčenju zraka moramo upoštevati, da je zrak zelo kompleksen vzorec, katerega mikrobiološka sestava je odvisna od številnih dejavnikov, kar je povezano z nizko ponovljivostjo (Chinn, 2003; Borges, 2021; Chang, 2019). Količina zbranega zraka je zato ključnega pomena za poročanje in interpretaciji rezultatov, ki so odvisni predvsem od stopnje čistosti vzorčenega prostora (Meheust, 2014). Večjo reprezentativnost vzorca dosežemo z večjim volumnom, zato težimo k vzorčenju čim večjega volumna (Meheust, 2014). V literaturi so podane različne prostornine za isti tip prostora, kar otežuje oblikovanje skupnih smernic. Za operacijske dvorane je na primer priporočljivo vzorčiti 0,25 do 2,0 m<sup>3</sup> zraka (Meheust, 2014) ali pa teh priporočil sploh ni (Sandle, 2022). Medtem ko se običajno uporabljajo 0,5 m<sup>3</sup> ali 1,0 m<sup>3</sup> (Pasquarella, 2012; Napoli, 2012; Fu, 2018; Squeri, 2019). Omejitve prostornine določajo tudi same metode – z udarnimi vzorčevalniki ne moremo zbirati vzorcev več kot 10 minut ali več kot 1000 L; sicer bo gojišče preveč dehidriralo (Hoffman, 2002, Meheust, 2014, Chang, 2019). Tega problema nimamo z impinger vzorčevalniki zraka, saj lahko vsaj teoretično zberemo več kot 10 m<sup>3</sup> (Chang,

2019). Glavna pomanjkljivost impingerjevih vzorčevalnikov je, da med vzorčenjem izhlapi veliko tekočine, do 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  pri 20 °C in 60 % relativni vlažnosti, kar vodi v ponovno aerosolizacijo že vzorčenih mikroorganizmov in s tem lažno nižje koncentracije mikrobov (Chang, 2019).

Glavna prednost volumetričnih metod je njihova visoka občutljivost, ki jo omenjajo nacionalne smernice, in uveljavljene mejne vrednosti v  $\text{CFU}/\text{m}^3$  za različne vrste operacijskih dvoran (Chinn, 2003; Napoli, 2012; Sandle, 2022). Monitoring zraka temelji na aktivnem in pasivnem vzorčenju, metodah, ki sta še posebej primerljivi v okoljih s pričakovano večjo mikrobno obremenitvijo. V operacijskih dvoranah je aktivno vzorčenje zraka vodilna metoda, predvsem zaradi svoje visoke občutljivosti. Znotraj aktivnega vzorčenja najdemo številne metode, ki temeljijo na uporabi udarnih vzorčevalnikov. Načela metode vzorčenja so formalizirana v standardu ISO 14698-1:2003.

### 3.1.3 Določanje števila mikroorganizmov pri metodi vzorčenja zraka

Skupno število mikroorganizmov je bilo določeno v skladu s standardi ISO EN ISO 4833-1: 2013/Amd.1:2022(E) («Mikrobiologija prehranske verige – Horizontalna metoda za določanje števila mikroorganizmov – 1. del: Število kolonij pri 30 °C s tehniko nalitih plošč»). Na kratko, iz zbranih vzorcev smo pripravili razredčitve v razmerju 1:10 v raztopini peptona/soli. 1 ml vzorca smo prenesli v prazno petrijevko, v katero smo dodali 12–15 ml rastnega gojišča (kvasni agar (Biolife, Italija 4021882)), segretega na 47 °C, ga nežno premešali in pustili, da se strdi. Plošče smo nato 72 ur  $\pm$  3 ure inkubirali v aerobnih pogojih pri 30 °C  $\pm$  1 °C. Po inkubaciji smo število mikroorganizmov določili s štetjem zraslih kolonij na ploščah. Rezultati so bili izračunani in izraženi v skladu s standardom ISO 7218: 2007/A1: 2013 (Mikrobiologija živil in živalske krme – splošne zahteve in navodila za mikrobiološke preiskave).

## 3.2 Postopki hladnega zamegljevanja EOVS

Glede na specifično okolje pri delovanju MR naprave menimo, da je treba uvesti, prilagoditi in nadgraditi ustrezno spremenjeno opremo, ki se lahko uporablja v okolju s 3T MR in tako omogočiti njeno delovanje. Za ta namen smo razvili aerosolizator OPTI JET CSC MD1MR s posebnimi šobami za hladno zamegljevanje, ki so združljive z energijo 3T. Aerosolizator smo nastavili kot del opreme naprave 3T MR ob upoštevanju navodil proizvajalca za magnetno resonanco. Razvili smo tudi nov aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE s posebnimi šobami za hladno zamegljevanje v simulacijski komori in v 3T MR. S pomočjo metode vzorčenja zraka smo preverili zanesljivost postopka hladnega zamegljevanja, vključno z dezinfekcijo zraka in površin.

### 3.2.1 Aerosolisator OPTI JET CSC MD1MR

Z namestitvijo aerosolizatorja OPTI JET CSC MD1MR bo omogočena nemotena uporaba EOVS v prostoru naprave za 3T MR. Pri redni aerosolizaciji smo enkrat mesečno ali po potrebi večkrat vzorčili zrak in površine v 3T MR. Z jemanjem vzorcev v prostoru bomo preverili zanesljivost postopkov hladnega zamegljevanja EOVS, ki omogočajo razkuževanje površin, vključno z razkuževanjem zraka. Aerosolizator uporablja mikro-šobo, ki nam omogoča razpon velikosti kapljic od 20 do 30 mikronov. Dokazali smo učinkovitost in zanesljivost pri težko dostopnih mestih magnetne resonance. Natančno smo analizirali

količino biocida Steriplant<sup>®</sup>N, ki je bila uporabljena v zraku pri 6–8 ml/m<sup>3</sup> pri 12 minutah. Za preverjanje učinkovitosti razkuževanja zraka bomo opravili ciklonsko vzorčenje zraka. Pomen hladnega zamegljevanja in možnost praktične uporabe spremenjenega modela OPTI JET CS MD1MR (Pintarič, 2015) je v tem, da je aerosolizator ves čas nameščen v diagnostičnem prostoru za 3T MR. Za določitev učinkovitosti razkuževanja zraka je treba opraviti ciklonsko vzorčenje zraka. Hladno zamegljevanje je prikazano kot izbirna metoda, s katero se naenkrat razkuži in doseže površine v diagnostičnem prostoru MR, površino MR naprave in tunela (Gentry) ter zraka v diagnostičnem prostoru MR. Na Oddelku za radiologijo UKC Maribor so se v iskanju možne rešitve odločili, da bodo testirali vzorce zraka in vzorce, odvzetih s preskusnih površin različnih vrst diagnostične opreme, da bi ugotovili dejansko stanje in obseg prisotnosti mikroorganizmov v zraku ter njihov pomen za kontaminacijo površin. Poleg tega je bila preizkušena možnost aerosolizacije zraka z EOVS.

V raziskavi (možnost uporabe elektrolizirane oksidativne vode – EOVS), ki smo jo leta 2012 izvedli na Oddelku za radiologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, smo prišli do pomembnih ugotovitev, da je potrebno hitro in zanesljivo razkuževanje. Glede na specifično okolje pri delovanju naprave MR smo razmišljali o uvedbi, prilagoditvi in nadgradnji postopka razkuževanja z ustrežno spremenjeno in prilagojeno opremo, ki se lahko uporablja v okolju s 3T MR med delovnim procesom.

Za ta namen smo razvili aerosolizator OPTI-JET CSC MD1 MR s posebnimi šobami za hladno zamegljevanje (slika 14), ki so združljive z energijo 3T. Aerosolizator je bil nastavljen kot del programske opreme naprave 3T MR ob upoštevanju navodil proizvajalca za magnetno resonanco. Uporaba aerosolizatorja OPTI-JET CSC MD1 MR omogoča nemoteno uporabo EOVS v diagnostičnem prostoru naprave MR. S pomočjo metode ciklonskega vzorčenja zraka smo preverili zanesljivost postopka hladnega zamegljevanja, vključno z dezinfekcijo zraka in površin. Pomembna prednost hladne megle in možnosti praktične uporabe spremenjenega modela OPTI-JET CS MD1 MR je v tem, da je aerosolizator ves čas nameščen v diagnostičnem prostoru za MR (slika 14).

### 3.2.2 Aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE

V osnovi je OPTI JET CS MD 2 ZE nov model OPTI JET CSC MD1MR s posebno nano-šobo (slika 15). Nano-šoba lahko ustvari kapljice aerosola velikosti 10–15 mikronov. To nam pomaga pri začetku simulacije v simulacijski komori, medtem ko uporabljamo celični material na petrijevki. Aerosoli velikosti 10–15 mikronov ne poškodujejo površine celic (Santrapia, 2023). S temi parametri lahko v petih minutah s 5 ml raztopine Steriplant<sup>®</sup>N aerosoliziramo 1 m<sup>3</sup> zraka. Pri samem razvoju aerosolizatorja smo upoštevali posebnosti diagnostičnih prostorov. Pomembno je kako se prilagodit klimatskemu pretoku zraka, ki ni vedno v vseh prostorih na enak. Diagnostični prostori so tudi različno zasnovani glede na vrsto dignostične naprave, ki je v prostoru. Diagnostične naprave imajo tudi svoj pretok zraka (hlajenje), ki se razlikuje glede na vrsto aparature.

Pri zasnovi in postavitvi aerosolizatorja v prostoru smo upoštevali lokacijo, kjer ga bomo postavili in način aerosolizacije ali bomo opravljali pred med ali po preiskavah. Namestitev šob s katerimi lahko naredimo aerosol velikosti 10-15 mikronov ima svoje prednosti in slabosti.

Namestitev šob na aerosolizator vključuje možnost rotacije šob v poljubnih kotnih stopinjah. Ker imamo poseben diagnostični prostor 3T magnetno resonanco je težava kako bomo izvedli rotacijo šob. S pomočjo elektronike, ki se ponavadi nahaja v aerosolizatorjih za druge diagnostične prostore si nismo mogli pomagati. Uporabili smo tlak s katerim s pomočjo biocida Steriplant<sup>®</sup>N v šobi ustvarimo aerosol. Tlak smo preusmerili v mehanski

rotor, kateri zasučne šobe v določeno smer. Proces rotacije se izvaja ciklično. S tem smo dosegli optimalno porazdelitev aerosolizacije v prostoru. Izognili smo se točkasti aplikaciji aerosolizacije, ki povzroči časovno podaljšanje doseganje cilja dezinfekcije prostora. Točkasta aplikacija povzroči tudi prekomerno nabiranje biocida na določenem delu prostora.

Z optimalnim tlakom, ki ga imamo v jeklenkah zraka lahko naredimo še bolj učinkovito količino aerosolov v krajšem času med samo aerosolizacijo. V bolnišničnih diagnostičnih prostorih smo že zadovoljni s 6-8 barov stisnjenega zraka. Glede na jakost tlaka se lahko tudi podaljša aerosolizacija oz. je ne moremo s takšnim aerosolizatorjem izvesti.

Aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE nov model s 10-15 mikronskimi šobami smo razvili za potrebe radiologije. Aerosolizator je prvenstveno bil uporabljen na energiji 3T kjer smo ga kot predhodno uporabljen aerosolizator OPTI JET CSC MD1MR uporabili fiksno na določeni razdalji glede na magnetne silnice v prostoru (slika 14). Z uporabo drugačnega razmerja tlak/šobe smo lahko uporabili tudi drugačne kote rotiranja šob in s tem tudi časovno izboljšavo. Na osnovi tega smo lahko postavili aerosolizator čisto na rob prostora, kjer smo dosegli ustrezne rezultate in ga lahko premikamo mimo določenih silnic, ki so definirane na 3T energiji.

Posledično smo aerosolizator OPTI JET CS MD 2 ZE nov model s 10-15 mikronskimi šobami dodelali. Opremilimo ga s kolesčki, ki nam omogočajo nemoteno premikanje in postavitve, vgradili smo elektromagnetne ventile, ki so krmiljeni s pomočjo elektronike, ki se nahaja v omenjenem aparatu. Vsi deli so iz visokokakovstnega inoxa in plastike. S tem smo zmanjšali privlak sile, ki deluje na feromagnetne snovi v magnetnem polju. Opremljen je s hitrimi spojki za zrak in tekočino, merilniki tlaka in količine biocida.

### 3.2.3 Aerosolizacija zraka in uporaba EOVSteriplant<sup>®</sup>N

S hladno meglo lahko razkužimo in dosežemo vse površine aparatov in zrak v prostoru magnetne resonance. Na Oddelku za radiologijo Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Maribor so se v iskanju možne rešitve odločili, da bodo testirali vzorce zraka in vzorce, odvzetih s preskusnih površin različnih vrst diagnostične opreme, da bi ugotovili dejansko stanje in obseg prisotnosti mikroorganizmov v zraku ter njihov pomen za kontaminacijo površin. Poleg tega je bila preizkušena možnost aerosolizacije zraka z EOVSteriplant<sup>®</sup>N. Natančneje, testiran je bil izdelek EOVSteriplant<sup>®</sup>N.

### 3.2.4 Določanje biocidnega delovanja EOVSteriplant<sup>®</sup>N

V raziskavi je bil uporabljen prostor 3T MR na Oddelku za radiologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor (UKC). Raziskava je bila prijavljena kot interni raziskovalni projekt pod številko IRP-2015/01-14. Namen raziskave je bil ugotoviti in oceniti učinkovitost delovanja uporabljenega biocidnega sredstva EOVSteriplant<sup>®</sup>N z aerosolizacijo z aerosolizatorjem OPTI-JET CSC MD1 MR.

Za ugotavljanje stopnje kontaminacije je bila izvedena identifikacija prisotnosti mikroorganizmov v zraku in na površinah, da bi lahko ocenili učinkovitost zmanjšanja števila mikroorganizmov, prisotnih v zraku, z aerosolizacijo EOVSteriplant<sup>®</sup>N. Za zbiranje vzorcev zraka smo uporabili Coriolisov vzorčevalnik zraka (proizvajalec Coriolis, Francija) z uporabo ciklonske tehnologije (slika 16). Z vrtničastim gibanjem medija in s pomočjo centrifugalne sile so bili vzorci zbrani v bioaerosol in pripravljani za nadaljnjo obdelavo.

Pri hitrosti pretoka zraka 300 litrov na minuto je v 4 minutah zbiranja skozi medij tekočega zbiralnika prešlo skupaj 1.200 litrov zraka. Kot tekoči medij je bila uporabljena sterilna fiziološka raztopina, v kateri je bil zbran aerosol iz zraka. Vsi zbrani vzorci so bili odvzeti pri vključeni klimatski napravi in sistemu 3T MR. V laboratorij za nadaljnjo analizo so bili prepeljani pri temperaturi 4 °C. Vzorci zraka, zbrani v suspenziji fiziološke raztopine, so bili najprej razredčeni in nato posejani na gojišče. Nato smo vzorce pripravili na gojišču agarskega gela v skladu z ISO 4833/2003, kjer smo po  $72 \pm 3$  urah pri  $30 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  določili skupno število mikroorganizmov. Rezultate smo izrazili kot število enot, ki tvorijo kolonije (CFU), v  $\text{m}^3$  zraka.

### 3.2.5 Opis materialov in metod za brisanje površin in vzorčenje zraka

#### 3.2.5.1 Materiali

##### *Klasična vatirana palčka*

Klasična vatirana palčka pomeni sterilno PVC-cevko, ki je zaprta z zamaškom, na katerega je nalepljen zvit bombaž (Kavčič, d. o. o.).

##### *Lonček za vzorčenje zraka*

V plastičnem lončku za vzorčenje z napravo Coriolis je 15 ml fiziološke raztopine. Meritev je natančna na ml.

#### 3.2.5.2 Opis tehnik vzorčenja

Vzorčenje površine se izvaja v skladu z mednarodnim standardom ISO 18593 »Horizontalne metode za tehnike vzorčenja s površin z uporabo kontaktnih plošč in tamponov«.

#### 3.2.5.3 Opis zbiranja vzorcev površine

Za brisanje suhe površine uporabimo običajno vatirano palčko, v katero smo predhodno dodali pepton fiziološko raztopino 5 ml raztopine za redčenje. Če se izvaja zbiranje vzorcev z vlažnih površin, se uporabi suha vatirana palčka, ki se ji pred začetkom iste preiskave doda raztopina.

Pri kiretaži, čistosti epruvete zrahljamo zamašek, dvignjemo vato na palčki nad tekočino in jo rahlo odtisnemo ob steno epruvete. Tampon z vzporednimi vodoravnimi potegi v navpičnici (navpično v vodoravnici – tako da se obriše celotno preiskovano območje) obriše površino velikosti  $20 \text{ cm}^2$  (4 x 5 cm). Pri tem se tampon počasi vrti, tako da je vsak del bombažne tkanine v stiku s površino. Po vzorčenju tampon vstavimo nazaj v epruveto in jo pretresemo. Vzorce v hladilni škatli prepeljejo v laboratorij.

### 3.2.5.4 Opis izvedbe testov

#### *Določanje aerobnih mezofilnih bakterij (TCMO)*

Metoda določanja skupnega števila mikroorganizmov je bila izvedena v skladu s standardi ISO EN ISO 4833-1: 2013 («Mikrobiologija prehranske verige – Horizontalna metoda za določanje števila mikroorganizmov – 1. del: Število kolonij pri 30° C s tehniko nalitih plošč»), razlaga rezultatov pa v skladu s standardom ISO 7218: 2007/A1: 2013 (Mikrobiologija živil in krme – splošne zahteve in navodila za mikrobiološke preiskave).

#### **Načelo:**

Izbrano količino začetne razredčitve vzorca in decimalne razredčitve prenesemo v prazno petrijevko, jo obarvamo s tekočim gojiščem in premešamo. Sledi inkubacija v aerobnih pogojih in pri temperaturi 30 °C za 72 ur. Število mikroorganizmov smo izračunali iz števila zraslih kolonij na Petrijevih ploščah z manj kot 300 kolonijami.

#### **Instrumenti in dodatki:**

- mešalnik za epruvete, tehtnica Vibromix 10,
- vodna kopel, nastavljiva na 44 °C do 47 °C,
- inkubator, nastavljen na 30 °C ± 1 °C, Kambič, d. o. o.,
- naprava za štetje kolonij Scan 100, Interscience,
- suhi sterilizator ali avtoklav,
- gorilnik,
- sterilne rokavice,
- razmaz (paličica z bombažem),
- graduirana pipeta s prostornino 1 ml,
- bučka,
- petrijevka s premerom 90 do 100 mm,
- epruveta, bučka ali steklenica ustrezne prostornine,
- posebno pisalo.

#### **Reagenti:**

- raztopina peptona/fiziološka raztopina,
- agar za štetje plošč – agar za kvasovke (Biolife).

### 3.2.5.5 Gojišče – agar za štetje plošč (PCA)

Uporaba komercialno pripravljene agarja Kvasni agar (Biolife, Italija 4021882), pripravljen v skladu z navodili proizvajalca.

Tabela 1: Sestavine za gojišče - agar za štetje plošč (PCA).

Kazein (encimski)	5 g
Izvleček kvasa	2,5 g
Brezvodna glukoza (C6H12O6)	1 g
Agar (odvisno od želirnih lastnosti agarja)	9–18 g
Destilirana voda	1000 ml

### Priprava

Sestavine ali dehidrirano sestavljeno gojišče raztopimo v vodi in po potrebi segrejemo. Dobro premešamo in pustimo stati nekaj minut. Nastavimo opozorilo za pH, ko je potrebno, da je po avtoklaviranju  $7,0 \pm 0,2$  pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Gojišče se razdeli v bučko ali steklenico, da prostornina ne presega 500 ml. Steriliziramo z avtoklaviranjem pri  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  za 15 minut. Takoj po mešanju uporabimo gojišče, pred uporabo ga ohladimo v vodni kopeli pri  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Če ga ne potrebujemo takoj, ga hranimo v temi pri 3 do  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v pogojih, ki ne dopuščajo sprememb sestave ali lastnosti, vendar ne dlje kot 3 mesece. Pred začetkom mikrobiološke preiskave se gojišče popolnoma raztopi v vreli vodni kopeli, nato pa se tudi v vodni kopeli ohladi na  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Cepitev in inkubacija vzorca površine

Preiskava vzorca se opravi neposredno in v razredčitvi  $10^{-1}$ . Za pripravo dodatnih razredčitev osnovne raztopine v epruveto s pipeto odmerimo 1 ml vzorca in 9 ml raztopine peptona/solne raztopine in dobro premešamo z mešalnikom, da dobimo razredčitev  $10^{-1}$ . Pripravimo sterilne petrijevke in jih označimo s potrebnimi podatki (oznaka vzorca, trans-cinnamate 4-monooxygenase (TCMO)), datum in stopnja razredčitve). V petrijevke s pipeto odmerimo 1 ml vzorca iz epruvete z vatirano palčko in iz vsake razredčitve ter nalijemo 12 do 15 ml kvasnega agarja (ohlajenega na  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Premešamo in pustimo, da se gojišče strdi. Tako pripravljene petrijevke smo inkubirali pri  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  72 ur  $\pm 3$  ure. Po treh dneh preštejemo kolonije na ploščah.

### Cepitev in inkubacija vzorcev zraka

Preiskava vzorca se opravi neposredno in v razredčitvi – odvisno od pričakovanih rezultatov. Nadaljnji postopek je enak, kot je opisan v razdelku 3.2.

### Štetje kolonij in izračun rezultatov

Po končani inkubaciji preštejemo zrasle kolonije in izrazimo rezultate v skladu s standardom ISO 7218: 2007/A1: 2013.

### Interpretacija rezultatov – površina razmaza

Dobljeno število kolonij pomnožimo s 5 (prostornina tekočine v epruveti). Če je bil vzorec odvzet s površine  $20\text{ cm}^2$ , rezultat delimo z 20 in dobimo rezultat števila bakterij – CFU/cm<sup>2</sup>. Če je bil vzorec vzet iz brisov celotnega preiskovanega območja, se izračunano

število kolonij samo pomnoži s 5, rezultat pa je število kolonij – CFU/skupna površina (C.P.).

### Interpretacija rezultatov – vzorec: zrak

Število kolonij dobimo z množenjem prostornine tekočine v lončku. Določanje koagulaza-pozitivnih stafilokokov (*S.aureus*) Preiskava vzorcev števila bakterij *S. aureus* se opravi v skladu s standardom ISO 6888-2: 1999.

#### 3.2.5.6 Gojišče – Baird-Parkerjevo gojišče s fibrinogenom z zajčjo plazmo na agarju (RPF)

Uporabimo osnovno gojišče Baird-Parkerjev agar (baza) (npr. Biocare DIAGNOSTIC ali drug proizvajalec), ki mu dodamo dodatek RPF II (npr. Biocare DIAGNOSTIC ali drug proizvajalec).

#### Baird-Parkerjev agar RPF (osnova)

Tabela 2: Sestavine za Baird-Parkerjev agar RPF (osnova).

Tripton	10 g
Izвлеček mesa	5 g
Izвлеček kvasovk	1 g
Na-piruvat	10 g
Glicin	12 g
LiCl <sub>2</sub>	5 g
Bakteriološki agar	15 g
Destilirana voda	950 ml

#### Priprava:

V 950 ml destilirane ali deionizirane vode raztopimo 58 g agarja v prahu. Med mešanjem segrevamo, dokler se agar popolnoma ne raztopi. Avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C (pH 7,0 ± 0,2).

#### Dodatek RPF II

Hranimo ga pri temperaturi 28 °C.

Tabela 3: Sestavine za dodatek RPF II.

Inhibitor tripsina	2,5 mg
Zajčja plazma, Etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA)	2,5 mg
Kalijev telurit	2,5 mg
Goveji fibrinogen	0,5 g

Dodatek Fibrinogen z zajčjo plazmo (RPF) raztopimo v 50 ml destilirane vode, ki jo segrejemo na 37 °C. Pripravljen prehranski dodatek hranimo do 3 ure na sobni temperaturi. Priporočljivo je, da lahko topni liofilizirani vsebini najprej sterilno dodamo 30 ml destilirane vode in dobro premešamo z mešalnikom. Pred dodajanjem medija za vlivanje dodamo preostalih 20 ml destilirane vode. Vsebino smo dodali 450 ml pripravljenega, raztopljenega,

na 47 °C ohlajenega Baird-Parkerjevega agarja (osnova). Vsebino dobro premešamo in takoj porabimo.

### **Cepitev in inkubacija vzorcev**

Drugi postopek mikrobiološkega testiranja je enak poteku preiskave, ki je opisan v TCMO.

### **Štetje kolonij in izračun rezultatov**

Drugi postopek mikrobiološkega testiranja je enak poteku preiskave, ki je opisan v TCMO.

## **3.2.6 Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti hladne megle Steriplant<sup>®</sup>N**

### **3.2.6.1 Celična linija in mediji**

Človeške alveolarne epitelijske celice A549, pridobljene iz pljučnega karcinoma tipa II, so bile pridobljene iz Evropske zbirke celičnih kultur, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Združeno kraljestvo (86012804). Omenjene celice smo izbrali zaradi okolja v katerem poteka raziskava. Zanimalo nas je koliko vpliva Steriplant<sup>®</sup>N med uporabo dezinfekcije zraka v prostoru na dihala pri osebjem, ki dela dnevno v razkuženih prostorih. Celice A549 so bile gojene v DMEM (Dulbeccovo modificirano orlovo gojišče), Sigma, D5921, Lot: RNBF2063, dopolnjenem s 5 % FBS (fetalni goveji serum), GIBCO, 10500, Lot: 08Q3161K, penicilinom/streptomycinom, Sigma, P0781, Lot: 125M4780V in L-glutaminom (200 mM), Sigma, G7513, Lot: RNBD9302 pri  $37 \pm 1$  °C in  $5 \pm 1$  % CO<sub>2</sub> v vlažnem ozračju.

## **3.2.7 Gojenje in obdelava celic**

### **3.2.7.1 Simulacijska komora za hladno zamegljevanje**

Citotoksičnost in genotoksičnost hladne megle Steriplant<sup>®</sup>N smo preučevali v pogojih izpostavljenosti, ki simulirajo razmere na Oddelku za radiologijo UKC Maribor. Prostor za skener MR 3T je pravokotne oblike in ima prostornino 72 m<sup>3</sup>. Pretok zraka skozi prezračevalno napravo, ki je na stropu prostora s skenerjem v zgornji tretjini, je 1,5 do 2,0 m/s in je turbulenten.

Glede na parametre in meritve smo zasnovali in izdelali simulacijsko komoro (slika 17), v kateri smo lahko vzpostavili pogoje pretoka zraka in časovne razlike, kot so v diagnostičnem prostoru 3T MR. Pri gradnji simulacijske komore smo uporabili modelno teorijo na področju prezračevanja in variacij gostote tekočine. Razmerje med simulacijsko komoro in prostorom za slikanje je 1 : 360 glede na prostornino. Komora je izdelana iz akrilnega stekla z dimenzijami 1000 mm dolžine, 350 mm širine in 550 mm višine. Prostornina je 0,192 m<sup>3</sup>, dogovorili pa smo se, da za izračune uporabimo 0,2 m<sup>3</sup>. Nameščena sta bila dva mini ventilatorja, ki sta simulirala gibanje zraka v klimatiziranem prostoru. Z mini ventilatorjema smo lahko spreminjali parametre kroženja zraka v simulacijski komori.



Slika 17: Simulacijska komora za hladno zamegljevanje pred uporabo v digestoriju. (Pintarič, 2018)

Fotografija simulacijske komore za hladno zamegljevanje prikazuje uporabo šobe (bela puščica), tekočinsko lestvico (rdeča puščica), poseben ventilator za dotok zraka (zelena puščica), poseben ventilator za odtok zraka, ventilator je na steni za odstranjevanje (modra puščica).

Aerosolizacija je bila izvedena z novimi šobami, ki smo jih razvili in prilagodili na novem aerosolizatorju OPTI JET CS MD 2ZE, Oprema je bila izdelana v Inštitutu Obisan Murska Sobota. Velikost kapljic je bila 10–15 mikronov.

Pred izpostavljanjem celic v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo Ljubljana, na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka, smo simulacijsko komoro razkužili in jo priključili na dovod stisnjenega zraka. Simulacijska komora je bila nameščena v digestorij, kjer je bila nastavljena natančna temperatura 23 °C. Stisnjen zrak je bil uporabljen za razpršitev tekočine Steriplant<sup>®</sup>N v šobi, v kateri je bil pretok nastavljen na 5 ml/min pri tlaku 6 barov.

### 3.2.8 Priprava celic in izpostavljenost

Celice smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Costar, Corning) pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> v vlažnem ozračju. Ko so celice dosegle subkonfluentno gostoto, so bile odlepljene od podlage s tripsin-EDTA (0,25 % (1x), Gibco, Ref: 25200-056, Lot: 1741302), preštete in ponovno suspendirane v svežem gojišču ter nasajene v na petrijevke za gojenje celičnih kultur Easy-Grip (Falcon, 353004, premer 60 mm) z gostoto 800.000 celic/posodico. Celice smo inkubirali približno 24 ur (~ 1 celični cikel) pri 37 ± 1 °C in 5 ± 1 % CO<sub>2</sub> v vlažnem ozračju, da so se pritrdile in oblikovale subkonfluentni monosloj. Nato smo odstranili rastno gojišče in celice oprali s 1x PBS. Posodice s celicami smo postavili v komoro, kjer smo jih izpostavili hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N.

Zamegljevanje se je izvajalo 6 minut z 20 mL Steriplant<sup>®</sup>N s koncentracijo 50 ali 100 v/v%. Po izpostavitvi je bilo v vsako posodico z obdelanimi celicami dodano sveže gojišče in inkubirano 1, 4 in 24 ur. V vseh poskusih so bile za vsak čas inkubacije (0 - takoj po dodatku svežega medija, 1, 4 in 24 ur) vključene enako pripravljene kontrolne celične kulture, ki niso bile izpostavljene aerosolom. Te celice so bile pred dodajanjem gojišča enako dolgo (6 minut) brez gojišča kot celice med hladnim zamegljevanjem. Izvedeni so bili trije

neodvisni poskusi s 50 v/v % in eden s 100 v/v % Steriplant<sup>®</sup>N. Da bi zagotovili, da hranjenje celičnih monoslojev brez gojišča ne vpliva na njihovo sposobnost preživetja, smo monosloje pripravili, kot je opisano zgoraj, in jih pred dodajanjem gojišča pustili brez gojišča različno dolgo, do 30 minut. Viabilnost celic je bila določena po 3 urah inkubacije v rastnem gojišču s testom povprečne rasti. Rezultati so pokazali, da ohranjanje celičnih monoslojev brez gojišča do 30 min ne vpliva na njihovo viabilnost (podatki niso prikazani).

### 3.2.9 Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti s pretočno citometrijo

Takoj po dodajanju svežega gojišča izpostavljenim celicam ali po 1, 4 in 24 urah inkubacije smo gojišče s plavajočimi celicami prestavili v centrifugo in celice oprali z 1x PBS. Pritrjene celice smo odstranili s tripsin-EDTA (0,25 % (1x), GIBCO, Ref: 25200-056, Lot: 1741302 3 min inkubacija pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), in centrifugirali pri 300 g 5 minut skupaj z gojiščem in plavajočimi celicami. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, pelete celic pa smo ponovno suspendirali v 4 ml 1x PBS. V epruveto za pretočno citometrijo smo prenesli 200 µl celične suspenzije, ki smo ji dodali 2 µl propidijevega jodida (PI; Miltenyi 130-093-233, 5170803355). S PI obarvane celice smo analizirali s pretočnim citometrom MACSQuant Analyzer 10. V poskus je bila vključena tudi pozitivna kontrola s 1 % oksidirajočim agensom *tert*-butil hidroperoksidom (t-BOOH) v rastnem mediju.

Preostala celična suspenzija je bila uporabljena za analizo tvorbe fosforiliranega H2AX ( $\gamma$ H2AX). Celično suspenzijo smo centrifugirali pri 300 g 5 minut, supernatant smo odstranili, pelete smo ponovno suspendirali v 0,5 mL 1x PBS in med stresanjem dodali 1,5 mL ledeno hladnega absolutnega etanola. Pred analizo smo fiksirane celice centrifugirali pri 1300 vrtljajih na minuto 10 minut. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, pelete celic pa smo ponovno suspendirali v 5 ml hladnega 1x PBS. Ta korak smo ponovili dvakrat. Na koncu smo celični suspenziji dodali 10 µl protitelesa  $\gamma$ -H2AX (Miltenyi, 130-107-584, 5170608434). Po 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo vzorce analizirali s pretočnim citometrom MACSQuant Analyzer 10. Celični ostanki so bili iz analize izključeni na podlagi razpršenih signalov, analizirane pa so bile le posamezne celice.



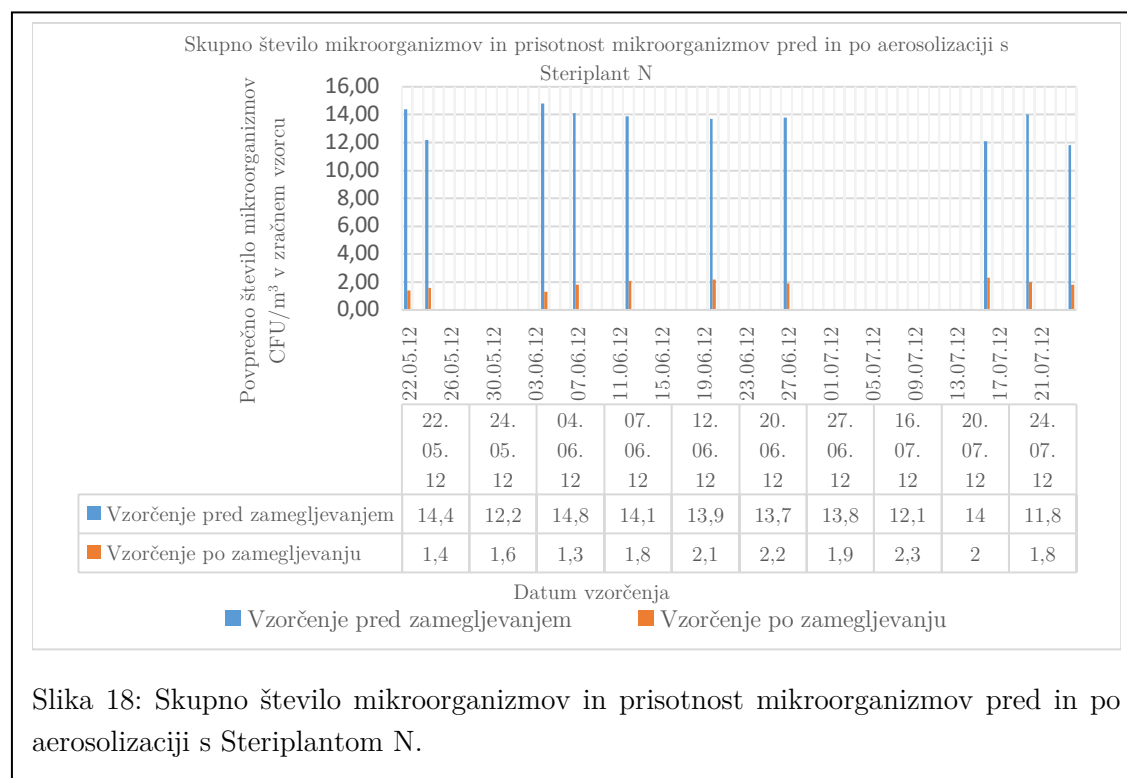
## Poglavje 4

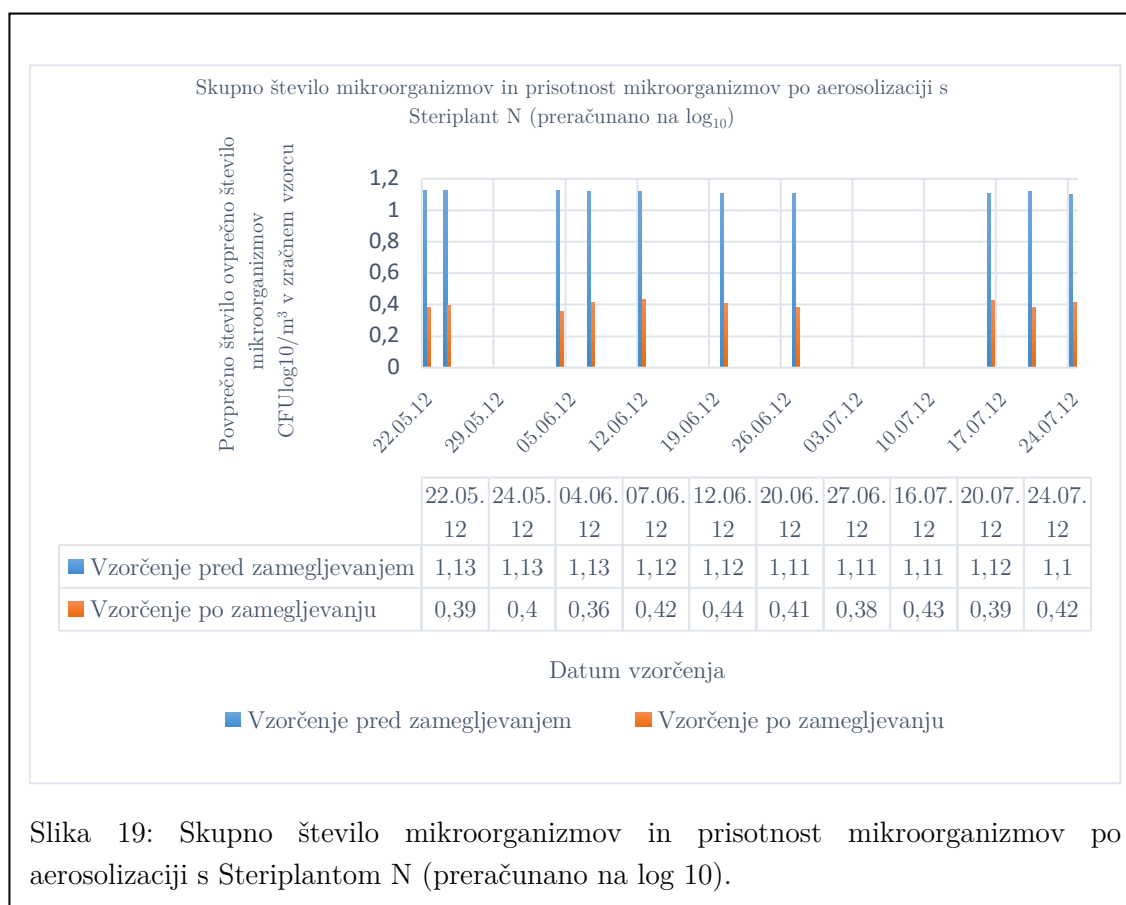
# Rezultati

### 4.1 Primernost elektrolizirane oksidativne vode za dezinfekcijo površin in opreme v radiologiji

#### 4.1.1 Potek raziskave z rezultati

Raziskava je vključevala 6 diagnostičnih prostorov, 600 vzorcev zraka, zbranih v tekočem mediju, in 50 vzorčenj na izpostavljenih medijih. Vrednosti zbranih vzorcev so prikazane v spodnjih tabelah, slikah in grafih. Po pričakovanjih je bilo število mikroorganizmov, prisotnih v zraku v diagnostičnih prostorih, nizko. Za zanesljivejšo potrditev zmanjšanja števila mikroorganizmov z vidika učinkovitosti delovanja aerosolnega biocidnega sredstva bolje zagotoviti čim večje začetno število mikroorganizmov. Vendar je ta raziskava ugotavljala zanesljivost delovanja v dejanskih pogojih. Zato so rezultati drugačni kot bi lahko bili v eksperimentalnih pogojih. V povprečju je bilo skupno povprečno število mikroorganizmov v vseh prostorih med 11,43 in 14,87 CFU/m<sup>3</sup> vzorčenega zraka (slika 18). Izraženo v logaritamskih vrednostih je znašalo 1,01 - 1,13 CFU log<sub>10</sub> /m<sup>3</sup> (slika 19).





Med vzorčenjem zraka je bil z mikroorganizmi najbolj obremenjen diagnostični prostor D7 povprečno  $14,50 \text{ CFU/m}^3$  (slika 19) in glede na logaritemsko vrednost  $1,11 \text{ CFU log}_{10}/\text{m}^3$  (slika 20).

Izvedli smo statistično analizo podatkov pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnosti mikroorganizmov po aerosolizaciji s Steriplantom<sup>®</sup>N v diagnostičnih prostorih. Analizo smo razdelili na dva koraka.

1. korak: Zanimalo nas je ali je porazdelitev podatkov normalna?

Pri majhnih vzorcih normalno porazdelitev preverimo s Shapiro-Wilk testom.

Če je p-vrednost višja od 0,05, pomeni, da se porazdelitev ne razlikuje od normalne porazdelitve, če je nižja od 0,05 kaže na to da porazdelitev ni normalna.

Tabela 4: Shapiro-Wilk test pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnosti mikroorganizmov po aerosolizaciji

		Shapiro-Wilk		
		Vrednost statistike	df	p-vrednost
Skupno število mikroorganizmov / $\text{m}^3$	Pred aerosolizacijo	0,862	10	0,080
	Po aerosolizaciji	0,961	10	0,802

Glede na to da imamo majhen vzorec ( $n=10$  v posamezni skupini) gledamo podatke Shapiro-Wilk testa, kjer je statistična značilnost višja od 0,050 (pred aerosolizacijo  $p=0,080$ )

in po aerosolizaciji  $p=0,802$ ), torej se porazdelitev podatkov ne razlikuje od normalne porazdelitve. Preverjali smo razlike med skupinami pred in po aerosolizaciji, zato nas zanima porazdelitev podatkov znotraj posamezne skupine, ki se pa razlikujejo od normalne porazdelitve.

2. korak: Izvedba ustreznega statističnega testa, glede na porazdelitev podatkov.

Izračunali smo tudi t-test za odvisne vzorce, ki primerja raziskovano trditev ob prvem merjenju in isto trditev pri drugem merjenju. Izračunali smo povprečje in ga nato primerjali.

Opisna statistika nam pove kakšne so razlike v povprečjih, medtem ko nam t-test za odvisne vzorce pove ali so te razlike statistično pomembne.

Tabela 5: Opisna statistika pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnost mikroorganizmov po aerosolizaciji s Steriplantom<sup>®</sup>N.

Opisna statistika	Povprečje	N	Standardni odklon	Standardna napaka
Pred aerosolizacijo	13,480	10	1,051	0,332
Po aerosolizaciji	1,840	10	0,331	0,105

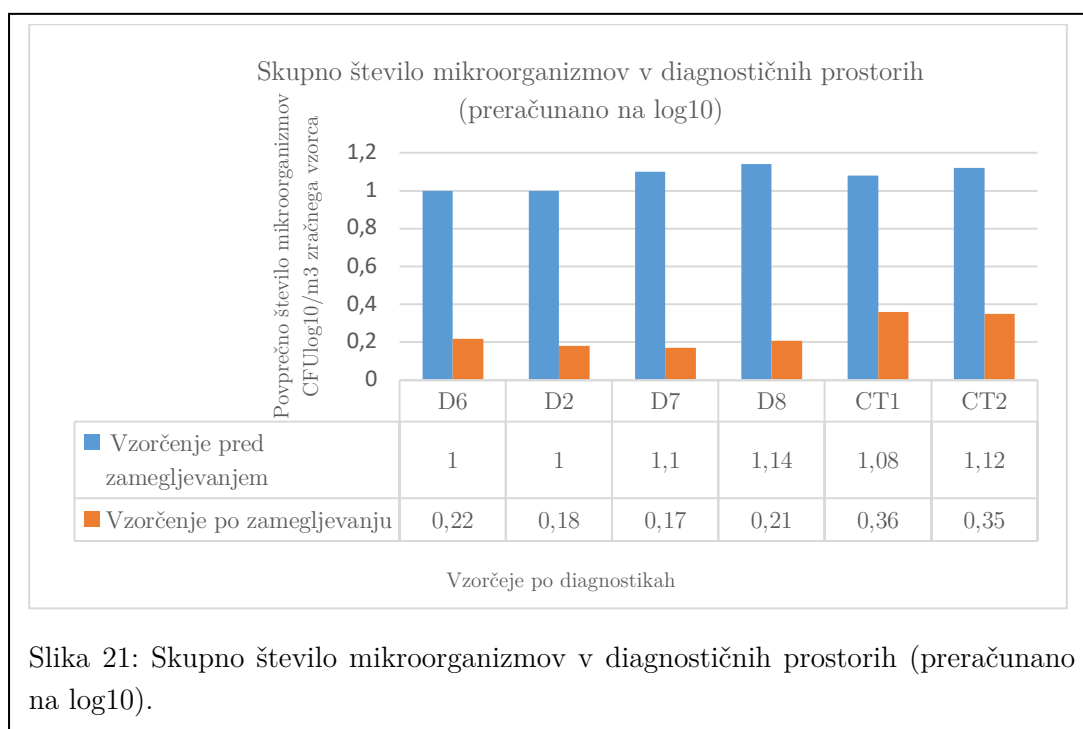
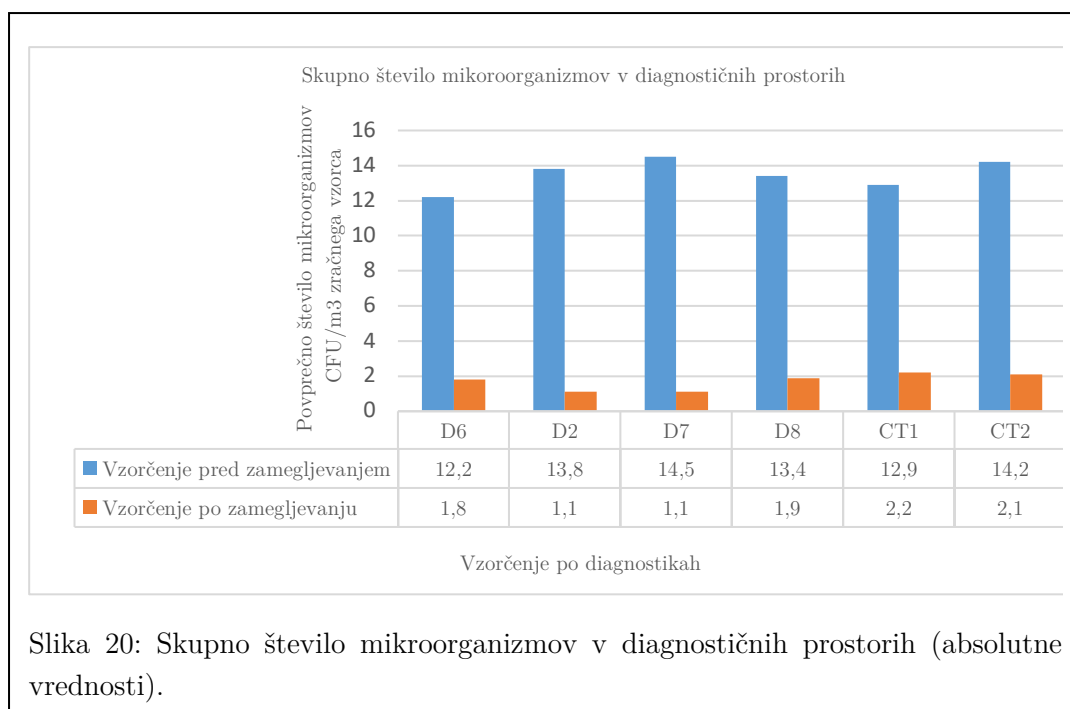
Tabela 6: Parni t-test pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnost mikroorganizmov po aerosolizaciji s Steriplantom<sup>®</sup>N

Parni t-test	Povprečje	Standardni odklon	Standardna napaka	t	df	p-vrednost (2-stranska)	95% interval zaupanja za razliko	
							Spodnji	Zgornji
Pred aerosolizacijo – Po aerosolizaciji	11,640	1,208	0,382	30,459	9	0,000	10,7755	12,5045

Rezultati parnega t-testa kažejo, da je povprečna razlika med meritvami pred in po aerosolizaciji statistično značilna ( $t(9) = 30,459$ ,  $p < 0,001$ ). Povprečna vrednost pred aerosolizacijo ( $M = 13,480$ ) je bistveno višja od povprečne vrednosti po aerosolizaciji ( $M = 1,840$ ), kar nakazuje na močan učinek aerosolizacije.

Standardni odklon razlike ( $SD = 1,208$ ) je relativno majhen, kar kaže na majhno variabilnost razlik med posameznimi pari. Standardna napaka razlike ( $SE = 0,382$ ) prav tako kaže na visoko natančnost ocene povprečne razlike. 95% interval zaupanja za razliko je  $[10,7755, 12,5045]$ .

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko sklenemo, da aerosolizacija statistično značilno zmanjša vrednosti merjene spremenljivke. Izjemno nizka p-vrednost ( $2,17E-10$ ) potrjuje, da je ta učinek zelo verjetno in ne zgolj posledica naključne variabilnosti. Zato lahko z visoko stopnjo zaupanja trdimo, da ima aerosolizacija močan vpliv na merjeno spremenljivko.



Sliki 20 in 21 prikazujeta razmeroma majhno prisotnost mikroorganizmov v obdobju vzorčenja. Glavni razlog za to je nadzorovano prezračevanje diagnostičnih prostorov s klimatskimi napravami. Primerjava podatkov za vse prostore skupaj pred aerosolizacijo EOv in po njej kaže 78 – 92% zmanjšanje skupnega števila mikroorganizmov (slika 18). Logaritemske primerjave kažejo zmanjšanje med 0,7 - 0,9 log 10 CFU/m<sup>3</sup> (slika 19).

Primerjava podatkov za posamezne prostore pred aerosolizacijo EOv in po njej kaže 80 – 92% zmanjšanje skupnega števila mikroorganizmov (slika 20). Logaritemske primerjave kažejo zmanjšanje med 0,5 - 0,8 log 10 CFU/m<sup>3</sup> (slika 21). Pri statistični obdelavi smo analizo razdelili na dva koraka.

1. korak: Zanima nas ali je porazdelitev podatkov normalna?

Pri majhnih vzorcih normalno porazdelitev preverimo s Shapiro-Wilk testom.

Če je p-vrednost višja od 0,05, pomeni, da se porazdelitev ne razlikuje od normalne porazdelitve, če je nižja od 0,05 kaže na to da porazdelitev ni normalna.

Tabela 7: Shapiro-Wilk test za skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih.

		Shapiro-Wilk		
		Vrednost statistike	df	p-vrednost
Skupno število mikroorganizmov/m <sup>3</sup>	Pred aerosolizacijo	0,970	6	0,893
	Po aerosolizaciji	0,842	6	0,136

Glede na to da imamo majhen vzorec (n=6 v posamezni skupini) gledamo podatke Shapiro-Wilk testa, kjer je statistična značilnost višja od 0,050 (pred aerosolizacijo p=0,893 in po aerosolizaciji p=0,136), torej se porazdelitev podatkov ne razlikuje od normalne porazdelitve. Preverjali smo razlike med skupinami, zato nas zanima porazdelitev podatkov znotraj posamezne skupine.

2. korak: Izvedba ustreznega statističnega testa, glede na porazdelitev podatkov.

Izračunali smo t-test za odvisne vzorce, ki primerja raziskovano trditev ob prvem merjenju in isto trditev pri drugem merjenju. Izračunali smo povprečje in ga nato primerjali.

Opisna statistika nam pove kakšne so razlike v povprečjih, medtem ko nam t-test za odvisne vzorce pove ali so te razlike statistično pomembne.

Tabela 8: Opisna statistika skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih.

Opisna statistika	Povprečje	N	Standardni odklon	Standardna napaka
Pred aerosolizacijo	13,50	6	0,85	0,34
Po aerosolizaciji	1,70	6	0,48	0,19

Tabela 9: Parni t-test skupno število mikroorganizmov v diagnostičnih prostorih.

Parni t-test	Povprečje	Standardni odklon	Standardna napaka	t	df	p-vrednost (2-stranska)	95% interval zaupanja za razliko	
							Spodnji	Zgornji
Pred aerosolizacijo – Po aerosolizaciji	11,80	1,16	0,47	24,93	5	0,000	10,58	13,01

Interpretacija rezultatov tebele 8 in 9:

Povprečna razlika med meritvami pred in po aerosolizaciji je 11,80. To kaže, da so vrednosti po aerosolizaciji v povprečju za 11,80 enot nižje kot pred aerosolizacijo.

Standardni odklon razlike je 1,16, kar kaže na relativno nizko variabilnost razlik med pari. Standardna napaka razlike je 0,47, kar kaže na visoko natančnost ocene povprečne razlike. t-vrednost 24,93 je zelo visoka, kar kaže na močno statistično značilnost

razlike med pred in po aerosolizaciji. p-vrednost je nižja od 0,001, kar je manj od običajne ravni značilnosti (0,05), to pomeni, da je razlika med pred in po aerosolizaciji statistično značilna. 95% interval zaupanja za razliko je [10,58, 13,01].

Rezultati parnega t-testa (tabela 8) kažejo, da je razlika med meritvami pred in po aerosolizaciji statistično značilna. Povprečne vrednosti meritev so se po aerosolizaciji bistveno zmanjšale (iz 13,5 na 1,7), kar kaže na močan učinek aerosolizacije. Izjemno nizka p-vrednost (1,94E-06) potrjuje, da je ta učinek zelo verjetno resničen in ne zgolj posledica naključne variabilnosti.

Prisotnost mikroorganizmov smo določili tudi s postopkom sedimentacije na Petrijevih ploščah z gojiščem. Rezultate smo primerjali z metodo ciklonskega vzorčenja. Z metodo sedimentacije smo ugotovili da je v primerjavi z metodo ciklonskega vzorčenja v zraku odkritih 28 - 82 % manj mikroorganizmov, kot je tudi prikazano na sliki 11.

Primerjali smo metodo sedimentacije in metodo ciklonskega vzorčenja v diagnostičnih prostorih. Statistično analizo smo prikazali v treh korakih.

1. korak: Normalno porazdelitev smo preverili s Shapiro-Wilk testom pri majhnih vzorcih.

Če je p-vrednost višja od 0,05, pomeni, da se porazdelitev ne razlikuje od normalne porazdelitve, če je nižja od 0,05 kaže na to da porazdelitev ni normalna

Tabela 10: Shapiro-Wilk test za skupno število mikroorganizmov, določeno s postopkom sedimentacije in vzorčenjem s ciklonsko metodo v diagnostičnih prostorih.

		Shapiro-Wilk		
		Vrednost statistike	df	p-vrednost (p<0,001)
Meritev pred aerosolizacijo	Sedimentacija	0,80	3	0,13
	Ciklonsko vzorčenje	0,85	3	0,23
Meritev med aerosolizacijo	Sedimentacija	0,75	3	0,00
	Ciklonsko vzorčenje	0,78	3	0,07
Meritev po aerosolizaciji	Sedimentacija	0,98	3	0,72
	Ciklonsko vzorčenje	0,93	3	0,49

Glede na to da imamo majhen vzorec (n=3 v posamezni skupini) smo se odločili za Shapiro-Wilk test, kjer je statistična značilnost višja od 0,050 povsod razen pri meritvah med sedimentacijo (p<0,001), v tem primeru se podatki ne porazdeljujejo po normalni porazdelitvi. Glede na to, da je vzorec zelo majhen in je kršeno načelo normalne porazdelitve, ni priporočljivo uporabiti parametričnih testov (verjetnost zaznave je nizka in tudi statistična moč je nizka).

2. korak: Primerjave med metodo sedimentacije in metodo ciklonskega vzorčenja v diagnostičnih prostorih je izvedba ustreznega statističnega testa, glede na porazdelitev podatkov. Uporabili smo neparametrični Friedmanov test (ekvivalent parametričnega testa ANOVA), ki ga uporabljamo za ugotavljanje značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi rangov večih (več kot dve) spremenljivk.

S pomočjo rangov smo preverili ali obstajajo razlike med skupinami in s pomočjo p-vrednosti smo preverili ali so razlike statistično značilne.

Tabela 11: Neparametrični Friedmanov test za metodo sedimentacije in ciklonsko vzorčenje.

<b>Metoda sedimentacije</b>		<b>Ciklonsko vzorčenje</b>	
	Povprečni rang		Povprečni rang
Meritev pred	2,00	Meritev pred	2,33
Meritev med	1,00	Meritev med	1,67
Meritev po	3,00	Meritev po	2,00
Friedmanov test		Friedmanov test	
n	3	n	3
Vrednost Hi-kvadrat	6,0	Vrednost Hi-kvadrat	0,67
df	2	df	2
p-vrednost	0,05	p-vrednost	0,72

Povprečni rangi za metodo sedimentacije kažejo, da so vrednosti meritev pred aerosolizacijo nekoliko višje (2,0) kot vrednosti meritev med aerosolizacijo (1,0) in nižje kot po aerosolizaciji (3,0). Friedmanov test je bil uporabljen za ugotavljanje, ali obstajajo statistično značilne razlike med temi tremi merjenimi časovnimi točkami. p-vrednost (0,050) je enaka kot "običajna" raven značilnosti (0,05; testiramo, da je manjše), kar pomeni, da ni statistično značilnih razlik med meritvami pred, med in po aerosolizaciji v skupini metode sedimentacije. Kljub opaznim razlikam v povprečnih rangih, te razlike niso dovolj velike, da bi bile statistično značilne.

Povprečni rangi kažejo, da so vrednosti meritev pred aerosolizacijo nekoliko višje (2,33) kot vrednosti meritev med aerosolizacijo (1,67) in po aerosolizaciji (2,00). Friedmanov test je bil uporabljen za ugotavljanje, ali obstajajo statistično značilne razlike med temi tremi merjenimi časovnimi točkami. p-vrednost (0,72) je bistveno višja od običajne ravni značilnosti (0,05), kar pomeni, da ni statistično značilnih razlik med meritvami pred, med in po aerosolizaciji v skupini ciklonsko vzorčenje. Razlike v povprečnih rangih so majhne in niso dovolj velike, da bi bile statistično značilne.

Na podlagi rezultatov Friedmanovega testa lahko sklenemo, da ni statistično značilnih razlik med meritvami pred, med in po aerosolizaciji v obeh skupinah (metode sedimentacije in ciklonsko vzorčenje). Kljub opaznim razlikam v povprečnih rangih, te razlike niso dovolj velike, da bi bile statistično značilne. To pomeni, da aerosolizacija v teh dveh skupinah ni povzročila pomembnih sprememb v meritvah, kot jih ocenjuje Friedmanov test.

3. korak: Preverili smo ali so razlike med sedimentacijo in ciklonskim vzorčenjem, v vsaki posamezni časovni točki, uporabljen je bil neparametrični test (Mann-Whitney U test).

Uporabili smo neparametrični Mann-Whitney test (ekvivalent parametričnega t-testa za neodvisne vzorce), ki ga uporabljamo za ugotavljanje značilnih razlik med povprečnima vrednostima rangov dveh spremenljivk.

Tabela 12: Neparametrični Mann-Whitney U test.

Rangiranje	Skupina	N	Povprečni rang	Vsota rangov
Meritev pred aerosolizacijo	Sedimentacija	3	2,00	6,00
	Ciklonsko vzorčenje	3	5,00	15,00
	Skupaj	6		
Meritev med aerosolizacijo	Sedimentacija	3	2,00	6,00
	Ciklonsko vzorčenje	3	5,00	15,00
	Skupaj	6		
Meritev po aerosolizaciji	Sedimentacija	3	2,33	7,00
	Ciklonsko vzorčenje	3	4,67	14,00
	Skupaj	6		

Tabela 13: Neparametrični Mann-Whitney test (ekvivalent parametričnega t-testa za neodvisne vzorce).

	Meritev pred aerosolizacijo	Meritev med aerosolizacijo	Meritev po aerosolizaciji
Mann-Whitney U	0,000	0,000	1,000
vrednost Z	-1,964	-1,993	-1,528
p-vrednos (2-stranska)	0,050	0,046	0,127

Interpretacija podatkov iz tabel 12 in 13.

Meritev pred aerosolizacijo:

Povprečni rangi kažejo, da je skupina ciklonskega vzorčenja imela višje meritve pred aerosolizacijo v primerjavi s skupino sedimentacije. p-vrednost ( $p=0,050$ ) je na meji statistične značilnosti. To pomeni, da je razlika med skupinama ni statistično značilna na ravni značilnosti 0,05.

Meritev med aerosolizacijo:

Povprečni rangi kažejo, da je skupina ciklonskega vzorčenja imela višje meritve med aerosolizacijo v primerjavi s skupino sedimentacije. p-vrednost (0,046) je manjša od 0,05, kar pomeni, da je razlika med skupinama statistično značilna. To nakazuje, da so meritve med aerosolizacijo v skupini ciklonskega vzorčenja statistično značilno višje kot v skupini sedimentacije.

Meritev po aerosolizaciji:

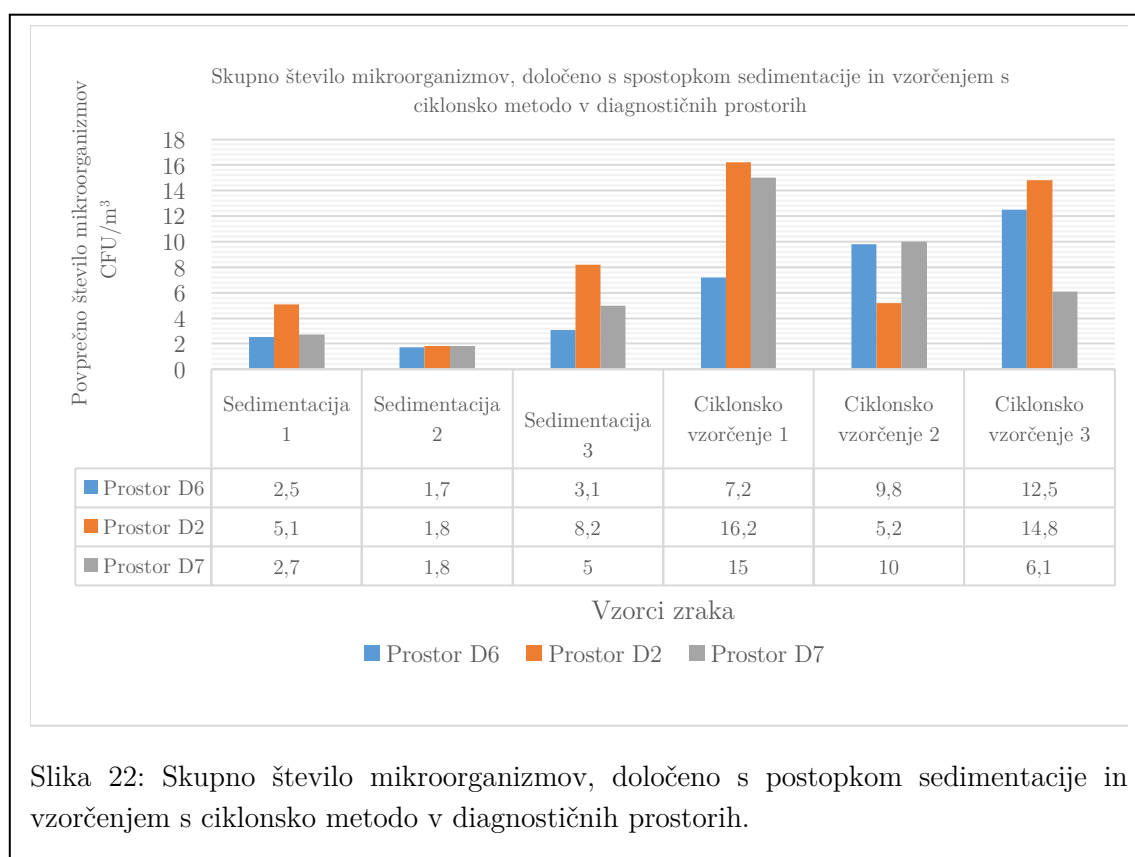
Povprečni rangi kažejo, da je skupina ciklonskega vzorčenja imela višje meritve po aerosolizaciji v primerjavi s skupino sedimentacije. p-vrednost (0,127) je večja od 0,05, kar pomeni, da razlika med skupinama ni statistično značilna. To nakazuje, da meritve po aerosolizaciji med skupinama niso statistično različne.

Razlika v meritvah pred aerosolizacijo med skupinama sedimentacija in ciklonsko vzorčenje ni statistično značilna ( $p = 0,050$ ). Razlika v meritvah med aerosolizacijo med skupinama je statistično značilna ( $p = 0,046$ ), kar kaže, da je med aerosolizacijo skupina ciklonskega vzorčenja dosegla višje meritve kot skupina sedimentacije. Razlika v meritvah po aerosolizaciji med skupinama ni statistično značilna ( $p = 0,127$ ), kar pomeni, da ni pomembne razlike med meritvami po aerosolizaciji med obema skupinama.

Ti rezultati kažejo, da je aerosolizacija vplivala na meritve med postopkom, vendar ni povzročila statistično značilne razlike v meritvah po postopku. Dodatno smo še opravili pregled po povprečnih vrednostih po skupinah in različnih časovnih točkah, kar je prikazano v tabeli 14.

Tabela 14: Pregled povprečnih vrednosti CFU/m<sup>3</sup> po skupinah in različnih časovnih točkah.

Skupina		Meritev pred aerosolizacijo	Meritev med aerosolizacijo	Meritev po aerosolizaciji
Sedimentacija	Povprečje	3,43	1,77	5,43
	N	3	3	3
	Standardni odklon	1,44	0,05	2,57
Ciklonsko vzorčenje	Povprečje	12,8	8,3	11,13
	N	3	3	3
	Standardni odklon	4,88	2,71	4,50
Skupaj	Povprečje	8,1	5,05	8,2
	N	6	6	6
	Standardni odklon	6,05	3,98	4,53



Med štetjem smo opazovali tudi oblike kolonij. Vse sumljive kolonije so bile predmet nadaljnjega določanja. Vendar v nobenem od preučevanih primerov ni šlo za posebej nevarne povzročitelje bolezni.

### 4.1.2 Sklepne ugotovitve

Rezultati vzorčenja zraka pri mikrobiološki obremenitvi diagnostičnih prostorov so pokazali dokaj enakomerno obremenitev z mikroorganizmi. Menimo, da je razlog za ugotovljeno prisotnost mikrobov v načinu prisilnega prezračevanja prostorov celotne bolnišnice (centralni prezračevalni sistem s predhodno pripravo zraka). Posebej zaskrbljujoča je prisotnost mikroorganizmov v operacijskih dvoranh, namenjenih operacijam, zaradi možnih pooperativnih zapletov. Nedavne študije drugih avtorjev poudarjajo pomen aerosolizacije mikroorganizmov v operacijskih sobah (Rahman, 2011) in pomen obremenjenih prostorov z mikroorganizmi v dihalnem sistemu zdravstvenega osebja. Priporočila nekaterih avtorjev so 10 CFU/m<sup>3</sup> zraka za diagnostične in operacijske prostore (Salgado, 2006; Scanlon, 2006). Glede na rezultate naše študije je bilo za 25 - 45 % mikroorganizmov več, kot je priporočeno. Biocidni aerosol Steriplant<sup>®</sup>N je pokazal zmanjšanje števila CFU v zračnih prostorih preskusa v povprečnih vrednostih od 1,14 do 2,54 CFU/m<sup>3</sup> ali zmanjšanje za 80 do 92 %. Glede na priporočila avtorjev o mikrobnii obremenitvi prostorov (Salgado, 2006; Scanlon, 2006) menimo, da je uporaba biocidnega aerosola Steriplant<sup>®</sup>N praktična v pripravljenem prostoru, v katerem se bistveno zmanjša obremenitev z mikroorganizmi. Menimo, da to pomaga vzpostaviti biološko varnost med operativnimi in diagnostičnimi posegi. Ob upoštevanju dejstva, da je za aerosolizacijo biocida potrebnih 6 - 8 ml raztopine biocida/m<sup>3</sup> zraka, lahko dosežemo z zelo malimi količinami biocida dosežemo dobre dezinfekcijske učinke v operacijskih prostorih in opremi. Poudariti želimo tudi pomen izbire metodologije vzorčenja zraka za ugotavljanje prisotnosti mikroorganizmov. Menimo, da je obvezna ciklonska metoda vzorčenja zraka v tekočem mediju primerna za ugotavljanje prisotnosti mikroorganizmov v primerjavi s procesom sedimentacije, saj smo tako ugotovili od 28 do 82 % višje vsebnosti mikroorganizmov.

## 4.2 Rezultati vzorčenja diagnostičnih prostorov MR

Rezultati števila mikroorganizmov v zraku pred aerosolizacijo Steriplant<sup>®</sup>N in po njej z aerosolizatorjem OPTI-JET CSC MD1 MR so prikazani v tabeli 15. Kot je bilo pričakovano, je bilo število mikroorganizmov v zraku v diagnostični sobi (240 CFU/m<sup>3</sup>) zaradi dobrega delovnega postopka čiščenja in internih postopkov čiščenja nizko. Jasno je, da bi bilo za zanesljivejšo potrditev zmanjšanja števila mikroorganizmov z vidika učinkovitosti biocidnega delovanja aerosola bolje zagotoviti večje začetno število mikroorganizmov. Vendar je bil cilj te študije določiti zanesljivost biocidnega delovanja aerosola Steriplant<sup>®</sup>N v dejanskih pogojih.

Tabela 15: Vpliv vzorčenja zraka glede na čas.

Vzorec, odvzet pred aerosolizacijo	240 CFU/m <sup>3</sup> zraka
Vzorec, odvzet takoj po aerosolizaciji	31 CFU/m <sup>3</sup> zraka
Vzorec, odvzet 30 minut po aerosolizaciji	50 CFU/m <sup>3</sup> zraka

Ugotavljamo, da je aerosolizacija zmanjšala prisotnost mikroorganizmov v zraku za 87 %, vendar se je njihovo število po 30 minutah zaradi delovanja klimatskega sistema povečalo. To potrjuje, da lahko s tem sistemom vzpostavimo biološko varnost med operativnimi in diagnostičnimi posegi. Glede na to, da je za aerosolizacijo biocida potrebnih 6–8 ml

raztopine biocida/ $\text{m}^3$  zraka, se dezinfekcija v operacijskih prostorih in opremi doseže z zelo majhnimi količinami biocida.

Sklepamo lahko, da v vseh diagnostičnih prostorih obstaja stalna nevarnost prisotnosti mikroorganizmov, kar je najverjetneje posledica prezračevanja in klimatizacije zraka. Uporaba izdelka Steriplant<sup>®</sup>N se je izkazala za učinkovito na vse uporabljene načine. Prav tako ni bilo zabeleženih morebitnih poškodb izpostavljenih naprav ali slabega počutja in bolezenskih znakov pri osebju, ki je uporabljalo Steriplant<sup>®</sup>N.

Varnost bolnikov mora biti glavna skrb vsake zdravstvene organizacije. Za zaščito bolnikov in osebja so potrebna skupna prizadevanja vseh strani, vključenih v slikovno diagnostiko. Ni dvoma, da obvladovanje okužb ni bilo deležno pozornosti, ki si jo zasluži. Vedno večja postaja skrb, da bi lahko vsaj del širjenja povzročiteljev okužb prihajal iz ambulantnih centrov za slikanje in radioloških oddelkov v bolnišnicah. Vendar pa nadzoru okužb v teh centrih za MR ni bilo posvečene skoraj nobene pozornosti. To dokazuje dejstvo, da je bila doslej objavljena le ena študija (izvedena na Irskem leta 2011, v kateri je bila celo raziskana možnost, da se v diagnostičnih prostorih MR nahajajo rezervoarji nalezljivih bolezni (Shelly, 2011). Med 125 vzorci brisov z različnih kliničnih in nekliničnih področij znotraj radiološkega oddelka je bil le en vzorec iz enote MR in ta je bil tudi edini pozitiven na MRSA (Boyce, 2002; Cosgrove, 2005). Avtorji so zaključili, da je treba preprečevanju kontaminacije enote diagnostičnih prostorov MR nameniti posebno pozornost zaradi njene dolge odprtine in težkega dostopa. Zanimivo pa je, da od takrat ni bila objavljena nobena nadaljnja študija za MR diagnostiko vse do leta 2024. Ključno je, da bolnikom zagotovimo, da se v diagnostičnem prostoru MR izvajajo ustrezni postopki za nadzor okužb, da bi zagotovili uspešno prihodnjo uporabo MR. Razumljivo je, da bi bilo to za centre, ki imajo MR in bolnišnice nekoliko drago, vendar bo dolgoročno ključnega pomena, da se to vprašanje obravnava, preden postane nacionalni problem, ki zahteva vladno posredovanje in predpise. Centri za slikanje in bolnišnice so svojim bolnikom dolžni zagotoviti, da je njihova varnost med postopkom preiskave magnetne resonance na prvem mestu.

V naši študiji iz leta 2011 smo dokazali visoko učinkovitost hladnega zamegljevanja s Steriplant<sup>®</sup>N za razkuževanje diagnostičnih prostorov in opreme (Pintarič, 2015). V tej študiji smo najprej določili učinkovitost razkuževanja s hladnim zamegljevanjem Steriplant<sup>®</sup>N. Vzorčenje zraka in bakteriološke analize so bile opravljene dvakrat. Pri prvem vzorčenju so bili parametri hladnega zamegljevanja enaki kot v študiji iz leta 2012 (Pintarič, 2015). Za ta namen smo razvili model aerosolizatorja OPTI-JET CSC MD1MR (slika 3) proizvajalca Obisan Inštitut Murska Sobota. Uporabili smo 6–8 ml biocidne raztopine Steriplant<sup>®</sup>N / $\text{m}^3$  v 12 minutah pri tlaku 6 barov. Pri drugem vzorčenju smo hladno zamegljevanje izvedli z uporabo parametrov, ki smo jih dobili s simulacijsko komoro, izdelano za testiranje genotoksičnosti. Z novo napravo, ki jo je izdelal Obisan Inštitut Murska Sobota, model: OPTI JET CS MD 2ZE (slika 4). Velikost kapljic je bila 10–15 mikronov, pri čemer smo dosegli rezultat 5 ml biocidne raztopine Steriplant<sup>®</sup>N / $\text{m}^3$  v 5 minutah pri tlaku 6 barov. Taka simulacijska komora se lahko uporablja v raziskovalnih procesih tudi kot napovedni model, upoštevati pa je treba pravila, določena za majhne zračne tokove, ki niso izotermni (Müllejans, 1966). Upoštevati smo morali naslednje parametre in teorije. Za našo simulacijsko komoro smo uporabili modelno teorijo in pravila, povezana z izkrivljenimi modeli za industrijsko prezračevanje in spremembe gostote tekočine (Baturin, 1972). Medtem ko se je v simulacijski komori izvajala aerosolizacija, smo spreminjali gostote tekočin z metodo neizotermnega pretoka zraka. Zhang je izvedel simulacijsko modeliranje za napovedovanje gibanja zraka v prostoru za neizotermni zračni tok (Zhang, 1993). Preučevali so podobnostno modeliranje s teoretičnimi in eksperimentalnimi tehnikami. Hladno zamegljevanje je bilo izvedeno s parametri, ki so bili pridobljeni s simulacijsko komoro, in sicer 5 ml biocidne raztopine Steriplant<sup>®</sup>N/ $\text{m}^3$  v 5 minutah pri tlaku 6 barov. Bakteriološke analize vzorcev zraka so pokazale, da je bilo

število mikroorganizmov, prisotnih v zraku diagnostične sobe pred razkuževanjem, nizko zaradi dobrega postopka čiščenja, ki je že vpeljan v sam potek dela po razkuževanju pa se je učinkovito zmanjšalo (preglednica 15). Mehanizem protibakterijskega delovanja Steriplant<sup>®</sup>N temelji na nizkem pH, hipoklorni kislini in reaktivnih oblikah kisika, za katere je znano, da povzročajo škodljive učinke tudi v celicah in tkivih sesalcev. Zato smo potencialno citotoksičnost in genotoksičnost hladnega zamegljevanja z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N določili na *modelu in vitro* s človeškimi alveolarnimi epitelijskimi celicami A549, ki se pogosto uporabljajo za *in vitro* študije inhalacijske toksičnosti (Himestra et al. 2018). Za namene teh poskusov je bila izdelana simulacijska komora, ki je omogočala izpostavljenost celic v pogojih, ki odražajo razmere v diagnostičnem prostoru MR.

Za zaključek naj povemo, da se je uporabljen Steriplant<sup>®</sup>N izkazal za učinkovito sredstvo za razkuževanje. Njegova uporaba je smiselna tudi z ekonomskega vidika. Čeprav je bila uporabnost Steriplant<sup>®</sup>N vsekakor dokazana, bi bilo priporočljivo izvesti nadaljnjo primerjalno raziskavo, v kateri bi učinkovitost izdelka Steriplant<sup>®</sup>N primerjali z običajnimi razkužili, ki se uporabljajo v bolnišnicah. Glavna prednost Steriplant<sup>®</sup>N v primerjavi z drugimi biocidi je v njegovem širokem spektru delovanja proti mikroorganizmom in uporabnosti. Je odporen in brez ostankov, ki bi zahtevali umivanje površin, okolju prijazna, je nestrupena in varna za uporabo (zaščitna oprema ni potrebna). Za nanašanje na površino je potrebna le raztopina 6–8 ml/m<sup>2</sup>. Skratka, obstajajo številne prednosti uporabe Steriplant<sup>®</sup>N, ki so predvsem posledica širokega spektra delovanja, prijaznosti do okolja, varne uporabe, možnosti uporabe v prisotnosti živali in uporabe brez ostankov (ni potrebno dodatno čiščenje površine). Vse to predstavlja pomembno prednost v primerjavi z vsemi drugimi skupinami biocidov. Poudariti želimo tudi pomen izbire metodologije vzorčenja zraka za ugotavljanje prisotnosti mikroorganizmov. Metodologija ciklonskega vzorčenja zraka je za bakterijsko kontaminacijo v prostorih za MR veliko uspešnejša od metode izpostavljenosti v petrijevkah na obravnavanem območju (Pintarič, 2015).

#### 4.2.1 Rezultati vzorčenja v diagnostičnem prostoru 3T MR primerjava OPTI-JET CSC MD1MR in OPTI-JET CS MD 2ZE

Bakteriološke analize vzorcev zraka so pokazale, da je bilo število mikroorganizmov, prisotnih v zraku diagnostične sobe pred razkuževanjem, nizko zaradi dobrega postopka čiščenja, po razkuževanju pa se je učinkovito zmanjšalo (tabela 16).

Tabela 16: zmanjševanje števila mikroorganizmov/m<sup>3</sup> v prostoru za 3T MR z dezinfekcijo s hladnim zamegljevanjem Steriplant N z OPTI-JET CSC MD1MR (1.vzorčenje) in OPTI-JET CS MD 2ZE (2. vzorčenje).

Število vzorčenj	1. vzorčenje	2. vzorčenje
Vzorec, odvzet pred hladnim zamegljevanjem zraka	240 CFU/m <sup>3</sup>	60 CFU/m <sup>3</sup>
Vzorec, odvzet takoj po hladnem zamegljevanju	31 CFU/m <sup>3</sup>	0 CFU/m <sup>3</sup>
Vzorec, odvzet 30 minut po hladnem zamegljevanju zraka	50 CFU/m <sup>3</sup>	4 CFU/m <sup>3</sup>

Po hladnem zamegljevanju se je število mikroorganizmov/m<sup>3</sup> zraka zmanjšalo za 87 % in 93 %. Vendar se je v vzorcih, zbranih 30 minut pozneje, število mikroorganizmov/m<sup>3</sup> nekoliko povečalo, kar je bilo najverjetneje posledica neprekinjenega delovanja klimatske naprave. Rezultati so dokazali, da je Steriplant<sup>®</sup>N pri uporabljenih pogojih učinkovito razkužilo za prostor MR. Rezultati so skladni z rezultatom učinkovitosti razkuževanja zraka in površin pri hladnem zamegljevanju s Steriplant<sup>®</sup>N, pridobljenimi v naši prejšnji študiji (Pintarič, 2015).

### 4.3 Rezultati potencialne toksičnosti aerosolizacije Steriplant<sup>®</sup>N za človeške alveolarne celice A459 *in vitro*

#### 4.3.1 Rezultati viabilnosti celic po hladnem zamegljevanju s Steriplant<sup>®</sup>N

V simulacijski komori so bile celice A459 neposredno izpostavljeni hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N 6 minut, kar je čas zamegljevanja, ki se uporablja za razkuževanje v napravi 3T MR. Med izpostavljenostjo je bila v simulacijski komori opazna drobna megla. Rezultati so pokazali, da hladno zamegljevanje z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N ni vplivalo na viabilnost celic (tabela 17).

Tabela 17: Viabilnost človeških alveolarnih epitelijskih celic A549 po izpostavljenosti hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N (50 in 100 % v/v), določena s testom propidijevega jodida.

Čas vzorčenja (h)	Steriplant <sup>®</sup> N 50% v/v		Steriplant <sup>®</sup> N 100% v/v	
	Kontrolne	Izpostavljene	Kontrolne	Izpostavljene
0	97,1 ± 1,0	96,1 ± 1,2	96,7	95,4
1	97,1 ± 0,9	97,1 ± 1,3	96,2	96,6
4	96,8 ± 1,1	96,1 ± 2,1	96,1	96,9
24	96,9 ± 0,6	95,9 ± 2,0	97,2	98,2

Privzem propidijevega jodida smo analizirali s pretočno citometrijo takoj po izpostavljenosti (čas 0 h) ter po 1, 4 in 24 urah inkubacije. Z ustreznimi kontrolnimi celicami smo ravnali enako kot z izpostavljenimi, le da so bile med časom izpostavljenosti na zraku. Poskusi so bili ponovljeni trikrat, pri čemer je bilo v vsakem vzorcu zabeleženih 10<sup>4</sup> dogodkov. Rezultati so predstavljeni kot % živih celic (obarvanje PI negativno) ± SD.

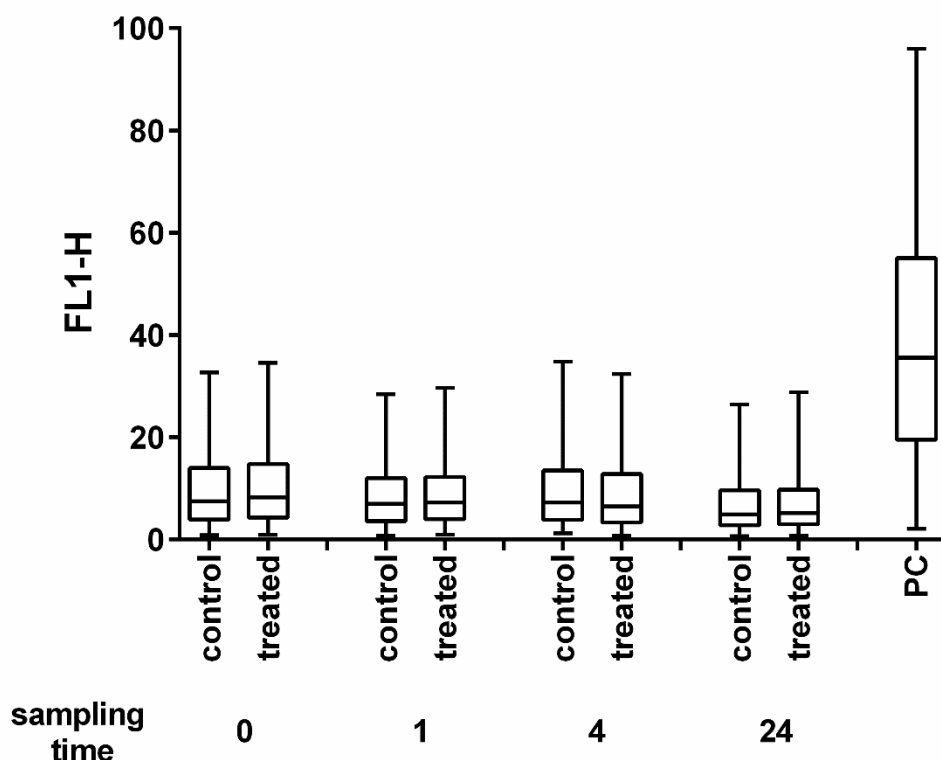
Tabela 18: Viabilnost človeških alveolarnih epiteljskih celic tipa 2 A549 po izpostavljenosti hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N (50 % v/v), izmerjena s pretočno citometrijo.

Testni vzorec 50% v/v						
Časovna točka	A	B	C	Povprečje	STD	p
Čas 0 h kontrola	98.2 %	96.4 %	96.7 %	97.1 %	0.010	1.000
Čas 0 h aerosolizacija	95.5 %	97.5 %	95.3 %	96.1 %	0.012	0.327
Čas 1h kontrola	97.1 %	97.9 %	96.2 %	97.1 %	0.009	0.973
Čas 1h aerosolizacija	98.5 %	96.9 %	96.0 %	97.1 %	0.013	0.973
Čas 4 h kontrola	98.0 %	96.2 %	96.1 %	96.8 %	0.011	0.709
Čas 4 h aerosolizacija	97.1 %	97.4 %	93.7 %	96.1 %	0.021	0.475
Čas 24 h kontrola	97.3 %	96.2 %	97.2 %	96.9 %	0.006	0.776
Čas 24 h aerosolizacija	95.4 %	94.3 %	98.1 %	95.9 %	0.020	0.406

Vnos propidijevega jodida smo analizirali s pretočno citometrijo takoj po izpostavljenosti ter po 1, 4 in 24 urah inkubacije. Z ustreznimi kontrolnimi celicami smo ravnali enako kot z izpostavljenimi, le da so bile med časom izpostavljenosti na zraku. Poskusi so bili ponovljeni trikrat, pri čemer je bilo v vsakem vzorcu zabeleženih  $10^4$  dogodkov. Rezultati so predstavljeni kot % živih celic (obarvanje PI negativno)  $\pm$  SD.

#### 4.3.2 Analize nastajanja dvojnih prekinitev verig DNK (DSB) v človeških alveolarnih epiteljskih celicah A549 takoj po izpostavljenosti 50 % v/v hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N

Študij o citotoksičnosti EOv v celicah sesalcev je malo. Ker naj bi bil mehanizem protibakterijskega delovanja EOv povezan z nastajanjem HOCl in OCl<sup>-</sup>, ki lahko z organskimi snovmi tvorita genotoksične stranske produkte (Knasmüller, 1996), in z reaktivnimi vrstami, za katere je prav tako znano, da povzročajo genotoksične učinke, smo nadalje raziskovali, ali izpostavljenost hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N povzroči poškodbe DNK v celicah A549. S testom  $\gamma$ H2AX, ki zaznava nastanek dvojnih prekinitev verig DNK (DSB), smo dokazali, da pri uporabljenih pogojih izpostavljenosti hladna megla Steriplant<sup>®</sup>N ni povzročila večjega nastajanja  $\gamma$ H2AX pozitivnih celic v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki ji niso bile izpostavljene (slika 23).



Slika 23: Analize dvoverižnih prelomov DNK (DBS) v človeških alveolarnih epiteljskih celicah A549 takoj po izpostavljenosti 50% v/v hladni megli Steriplant N (čas 0) ter po 1, 4 in 24 urah inkubacije.

V poskus smo vključili kontrolne celice; z njimi smo ravnali enako kot z izpostavljenimi, le da so bile med časom izpostavljenosti na zraku. Za pozitivno kontrolo (PC), smo uporabili 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  etopozida (24 ur izpostavitve). Graf prikazuje distribucijo fluorescentnega signala individualnih celic v vzorcu in je predstavljen kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi ter tretji in četrti interkvartilni razmik. Črta, ki razmejuje boks je mediana. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil. Za ugotavljanje statistično značilne razlike med kontrolo in izpostavljenimi celicami (za vsak čas) smo uporabili Studentov t-test (ni statistične razlike med kontrolo in izpostavljenimi vzorci). V vsak poskus je bila vključena pozitivna kontrola (PC, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  etopozida, 24 ur). Prisotnost DSB je bila analizirana s pretočno citometrijo, posredno z zaznavanjem fosforilacije H2AX. Porazdelitev fluorescenčnih signalov posameznih celic v vzorcih je predstavljena kot kvantilni škatlasti diagram. Poskusi so bili ponovljeni trikrat neodvisno, pri čemer je bilo v vsakem vzorcu zabeleženih  $10^4$  dogodkov. Rezultati so predstavljeni (tabela 19) kot povprečna vrednost fluorescentnih celic  $\gamma\text{H2AX}$  v  $10^4$  dogodkih normirano na ustrezno kontrolo.

Tabela 19: Analize nastajanja dvojnih prekinitev verig DNK (DSB) v človeških alveolarnih epiteljskih celicah A549 takoj po izpostavljenosti 50% v/v hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N (čas 0) ter po 1, 4 in 24 urah inkubacije.

Testni vzorec 50%						
Časovna točka	A	B	C	Povprečje	STD	p
Čas 0 h kontrola	1.00	1.00	1.00	1.000	0.000	/
Čas 0 h aerosolizacija	1.12	1.04	1.07	1.077	0.043	0.375
Čas 1h kontrola	1.00	1.00	1.00	1.000	0.000	/
Čas 1h aerosolizacija	1.09	1.01	1.30	1.135	0.147	0.1881
Čas 4 h kontrola	1.00	1.00	1.00	1.000	0.000	/
Čas 4 h aerosolizacija	0.92	0.98	0.97	0.959	0.031	0.0845
Čas 24 h kontrola	1.00	1.00	1.00	1.000	0.000	/
Čas 24 h aerosolizacija	0.94	1.13	0.73	0.933	0.202	0.5937

Rezultati so pokazali, da izpostavljenost hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N (50 % v/v) (50 in 100 %) ni statistično značilno povečal tvorbe DSB v izpostavljenih celicah A549 takoj po izpostavljenosti, po 1, 4 in 24 urni inkubaciji.

## Poglavje 3

# Razprava

Razkuževanje s hladnim zamegljevanjem Steriplant<sup>®</sup>N ima številne prednosti in se je izkazalo za posebej primerno za razkuževanje radiološke opreme, diagnostičnih prostorov in opreme MR. Ker EOv ne vsebuje strupenih ostankov, bi se lahko uporabljala za dezinfekcijo s hladnim zamegljevanjem tudi med prisotnostjo bolnikov in zdravstvenega osebja. Vendar je treba pred tako uporabo oceniti njeno varnost za ljudi.

Znano je, da lahko izpostavljenost osebja ali bolnikov aerosolom nasploh predstavlja tveganje za dihalni sistem, zato je bil cilj te študije oceniti potencialno citotoksičnost in genotoksičnost aerosolizacije Steriplant<sup>®</sup>N za človeške alveolarne celice A459 *in vitro*. Celice A459 so bile 6 minut izpostavljene aerosolu, ki je vseboval različne koncentracije (50 % in 100 % v/v) izdelka Steriplant<sup>®</sup>N, v komori, ki je bila izdelana tako, da je simulirala pogoje v prostoru za MRI. Citotoksičnost je bila ocenjena z merjenjem privzema jodida, genotoksičnost pa z merjenjem tvorbe fosforiliranih histonov H2AX ( $\gamma$ H2AX), ki so označevalci dvojnih prekinitev verig (DSB) DNK, takoj po aerosolizaciji ter po 1, 4 in 24 urah po inkubaciji. Rezultati so pokazali, da aerosolizacija z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N v pogojih, ki odražajo aerosolizacijo v prostoru za MRI, ni citotoksična in nima genotoksičnega potenciala.

Potencialno mutagenost in genotoksičnost EOv so ocenili v študiji Saitoh, 2010. Dokazali so, da nevtralna EOv ne povzroča povratnih mutacij pri sevih *Salmonella typhimurium* in *E. coli* ter kromosomskih aberacij v celicah pljučnega fibroblasta kitajskega hrčka. Okubo s sodelavci je dokazal, da je izpostavljenost mišjih fibroblastov EOv, serijsko razredčeni z destilirano vodo, povzročila citotoksičnost, primerljivo s citotoksičnostjo raztopine hipoklorita (Okubo, 2014). Mokudai je poročal, da je pri mišjih fibroblastih izpostavljenost EOv povzročila znatno zmanjšanje viabilnosti celic pri razredčitvah, manjših od 1 : 8, in da je bila citotoksičnost povezana z nastankom znotrajceličnih reaktivnih kisikovih vrst (ROS) (Mokudai, 2015). Vendar so bile v teh študijah celice izpostavljene EOv, razredčeni z destilirano vodo in z dodanim medijem za obdelavo. Ker naj bi bil mehanizem protibakterijskega delovanja EOv povezan z nastajanjem HOCl in OCl<sup>-</sup>, ki lahko z organskimi snovmi tvorita genotoksične stranske produkte, in z reaktivnimi vrstami, za katere je prav tako znano, da povzročajo genotoksične učinke, smo nadalje raziskovali, ali izpostavljenost hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N povzroči poškodbe DNK v celicah A549. Naši rezultati potrjujejo rezultate študije Saitoh, 2010 in kažejo, da hladno zamegljevanje z Steriplant<sup>®</sup>N pri pogojih, ki se uporabljajo za razkuževanje diagnostičnega prostora za MR, verjetno ne predstavlja nevarnosti za zdravje bolnikov ali osebja.

## 5.1 Splošna razprava

Biocid Steriplant<sup>®</sup>N uporabljamo v prostorih zdravstvenih ustanov. Glede na problematiko infekcijskih stanj v zdravstvu, je uporaba EOv kot metoda izbora v kombinaciji z rednim čiščenjem. S hladnim zamegljevanjem hitro in učinkovito razkužimo prostore, površine in zrak. Uporaba hladnega zamegljevanja v radiologiji predstavlja določene omejitve. Predvsem je pomembno poudariti da je pri rentgenskih aparataturah z leti vedno več občutljive elektronike. V diagnostičnih prostorih magnetne resonance, se srečujemo še s privlaki magnetnih sil, ki so ves čas prisotne v prostoru. Kako uporabiti EOv v prostorih radiologije smo ugotovili v naših raziskavah in jih tudi podrobno opisali.

Steriplant<sup>®</sup>N je produkt pridobljen s pomočjo postopka elektrolize. Kisla frakcija, ki pri tem nastane ima pomanjkanje elektronov. Lahko rečemo, da je frakcija v metastabilnem stanju s težnjo, da pridobi elektrone iz okolice in se vrne v stabilno stanje. Med proizvodnjo nastajajo tudi druge biocidne spojine kot stranski produkti elektrolize, vendar v zelo nizkih koncentracijah. Glavna lastnost delovanja biocida Steriplant<sup>®</sup>N je pomanjkanje elektronov in težnja biocidne raztopine Steriplant<sup>®</sup>N, da se vrne v stabilno stanje. Zaradi te lastnosti je zelo pomemben način aplikacije biocida. Med samo aplikacijo ne sme nastajati elektrostatični naboj pri pretokih biocidne raztopine, saj bi se s tem lahko znatno zmanjšala biocidna učinkovitost ali bi se celo izničila. Zato je pomembno poleg uporabe Steriplant<sup>®</sup>N tudi način aplikacije za uspešno biocidno delovanje, kar pri drugih skupinah biocidnih sredstev ne zasledimo. Steriplant<sup>®</sup>N deluje biocidno na prokariotske celice, na kar nakazujejo ugotovitve baktericidne učinkovitosti. Večina biocidov deluje škodljivo tudi na višje razvite evkariotske celice, kar jim zmanjšuje možnost uporabe neposredno na tkivih ljudi, živali oziroma, če bi bili izpostavljeni v takšnih okoljih (Bialka, 2004). Prav ta ugotovitev v mojem delu nakazuje na možnost uporabe Steriplant<sup>®</sup>N posebej ob uporabi posebne hladne aerosolizacije, da lahko delujemo na prisotne patogene oz. površinsko mikrobnobno floro ob npr. prisotnih pacientih in osebju v zaprtih prostorih, za katere je takšno okolje neškodljivo. In prav to smo želeli potrditi z našim postopkom simulacije v nadzorovanih pogojih. Za uspešno delovanje so potrebne majhne količine biocidne raztopine. Z odvzemom vzorčnih površin smo preizkusili zanesljivost postopkov Steriplant<sup>®</sup>N, hladno zamegljevanje radiološkega oddelka, ki nam omogoča uporabo metod dezinfekcije na površinah in v zraku.

Izbira metode vzorčenja je glavno vprašanje za postopek standardizacije – metodi se razlikujeta v skoraj vseh vidikih, od enostavnosti izvedbe, občutljivosti in natančnosti do načina predstavitve in interpretacije rezultatov. Številna priporočila in standardi določajo mejne vrednosti sprejemljivih koncentracij mikroorganizmov v zraku, ne navajajo pa izrecno načina vzorčenja (Chinn, 2003; Napoli, 2012; Landrin, 2005).

Obe metodi tako pasivna kot aktivna se v določenih situacijah štejeta za dokaj enakovredni, vendar se moramo odločiti za eno ali drugo, saj lahko kombiniranje metod povzroči nejasno predstavitve in interpretacijo rezultatov (Sandle, 2022). Enakovrednost je razvidna predvsem pri vzorčenju prostorov, v katerih je pričakovati večjo mikrobnobno obremenitev, medtem ko pri vzorčenju čistih prostorov, kot so operacijske dvorane in bolnišnične sobe s pozitivnim tlakom, prednjačijo aktivne metode vzorčenja zaradi boljše občutljivosti (Hofman, 2002; Landrin, 2005). Težava pri obeh metodah, je razlikovanje med klinično pomembnimi izolati in kontaminanti. Razen strogega upoštevanja aseptičnih delovnih tehnik za zmanjšanje tveganja kontaminacije ni drugih metod, ki bi jasno opredelile, ali je izolat kontaminant ali ne.

Ideja razkuževanja z biocidom, ki ima lastnosti hitrega učinkovanja, takojšnjega vstopa v prostor in nemotenega delovanja, brez residuuma oz. ostankov na površinah je bila kompleksna.

V grobem smo jo razdelili na:

- izbor pravilnega biocida;
- pravilna aplikacija v prostoru in zraku,
- način aplikacije biocida,
- vzorčenje v prostorih,
- vzorčenje v zraku,
- testiranje,
- razvoj za določene diagnostike v zdravstvu.

Kot metodo vzorčenja smo uporabili pasivno metodo ali metodo sedimentacije.

Glede na dosežek nanosa Steriplanta<sup>®</sup>N na površinah smo se odločili da opravimo prvo zameglitev prostora in površin z visokim učinkom delovanja biocida na površino in zrak v prostoru.

Težave pri Steriplant<sup>®</sup>N so se pojavile pri aplikativnih metodah zamegljevanja. Za Steriplant<sup>®</sup>N ni bilo primerno kakršnokoli vmesno delovanje črpalk na osnovi centrifugalnih sil ali spreminjanja agregatnega stanja tekočine prav tako tudi ne ultrazvočno delovanje na Steriplant<sup>®</sup>N. V razmišljanju pravilne aplikativne možnosti smo prišli na idejo šob, ki se uporabljajo pri delovanju s pomočjo stisnjene zraka in tekočine. Pri tem se količina in hitrost zraka primerno po potrebi nastavljata in z mešanico Steriplant<sup>®</sup>N nastane megla, ki ima velikost kapljic od 5 mikronov in več, kar je tudi z vidika toksičnosti zelo pomembno pri vdihavanju.

V primerjavi z drugimi možnostmi raznih dezinfekcij in zamegljevanja pri omenjenih metodah je pomemben sam dizajn OPTI JET CS MD, kajti premikanje in dostop do prostorov v katerih se izvaja aerosolizacija je včasih otežen. Sama izvedba dezinfekcije se deli glede na naše ugotovitve na preventivno in kurativno. Pri podobnih sistemih je težje določiti parametre in jih ustrezno prilagoditi situaciji v kateri naj bi izvedli zamegljevanje zraka, ker je spet odvisno od stopnje kontaminacije prostora in dogodka, ki je povzročil kontaminacijo. Večina uporabljenih sistemov ima prednastavitve s katerimi lahko sprožimo cikel dezinfekcije ali zamegljevanja zraka ne glede na situacijo v prostoru. Z aerosolizatorji medicinskih generacij se lahko vedno prilagodimo nastali situaciji v prostorih in lahko tudi sami določimo količino in način optimalne aplikacije Steriplant<sup>®</sup>N, s tlakom in šobami. Vse omenjene parametre smo upoštevali pri razvoju aparatov za zamegljevanje in pri izbiri šob. Za naše potrebe smo uporabili najbolj primerne dvosistemske šobe. Ker poznamo več različnih tipov dvosistemskih šob, ki zahtevajo različne sisteme dovajanja zraka, kar smo s testi preverjali in merili parametre aplikacije Steriplanta<sup>®</sup>N na površini in v zraku lahko v končni fazi tudi zamenjamo tip šob in se prilagodimo nastali situaciji v prostorih. Pri vseh variantah se pretok uravnava preko obstoječega diferenčnega tlaka tekočine. Tudi s tlakom smo neodvisni od delovanja naprave kot se pri večini drugih podobnih sistemov žal ne da prilagoditi.

Posebej smo se morali z razvojem prilagoditi pri magnetnem polju 3T. Uporabili smo vse smernice in priporočila iz direktive EMC (elektromagnetna združljivost), tj. Evropski direktivi 2014/35/EU.

Leta 2018 smo pri preiskusu na NIB Ljubljana uporabili simulacijsko komoro. Takrat smo tudi uporabili posebne šobe 10 -15 mikronov. Na osnovi predhodnega testiranja in rezultatov porabe stisnjene volumna in količino Steriplant<sup>®</sup>N, smo uporabili omenjene šobe pri aerosolizatorju OPTI JET CS MDZE, ki je bil prvi s posebnimi šobami, ki smo jih uporabljali na nivoju tri šobne tehnologije aerosolizatorjev in jih uporabljamo v diagnostičnih prostorih v zdravstvenih ustanovah.

Primerjava z drugimi podobnimi brezkontaktnimi tehnikami dezinfekcije zraka in površin se najpogosteje uporablja izpostavljenost ultravijoličnemu sevanju (UV). Obstaja veliko dokazov, ki kažejo na učinkovitost UV razkužilnega obsevanja kot dezinfekcijskega in sterilizacijskega pristopa za preprečevanje različnih nalezljivih bolezni, vključno s COVID-19, gripo in tuberkulozo (Wu, 2019). UV svetloba s kratko valovno dolžino, znana kot UVC (200–280 nm), vpliva na DNA/RNA mikroorganizme in prekine njihovo celično aktivnost in razmnoževanje. UVC dezinfekcijo lahko dosežemo z montažo UVC luči na strop ali z uporabo prenosnih UVC luči za dezinfekcijo različnih površin in zraka (Kowalski, 2010). Vendar ti načini v praksi niso zelo učinkoviti, saj lahko zahtevajo dolge čase delovanja in veliko ročnega nadzora.

Zanimanje za uporabo avtonomnih dezinfekcijskih sistemov, kot so UV roboti narašča, zaradi njihovega potenciala za učinkovitejšega razkuževanja (Murphy, 2022). UV roboti so bili uporabljeni za razkuževanje bolnišničnih sob proti COVID-19 z uporabo intenzivnega UV sevanja (Acerman, 2020). Čeprav bi rutinska uporaba UV robotov na javnih mestih lahko znatno omejila širjenje okužb, je intenzivno UV sevanje teh naprav nevarno za človeško kožo, zato se je treba prisotnosti UV sevanja izogibati. Posledično lahko to omeji čas delovanja takih naprav in morda bodo potrebne spremembe obstoječih UV sistemov za dodatno izboljšanje varnosti in učinkovitosti dezinfekcije. UV robot se samodejno premika v vnaprej določenem območju, potem ko je programiran za parametre časa izpostavljenosti in razdalje površin (Kowalski, 2010). Sestavljen je iz osmih svetilk, ki se nahajajo na vrhu platforme. Med ciklom dezinfekcije oddajajo UVC sevanje pri valovni dolžini 254 nm, kar omogoča 360-stopinjsko pokritost. Med postopkom razkuževanja se robot, ki oddaja UVC svetlobo, premika s hitrostjo 10 cm na sekundo, kar zagotavlja dozo 2,7 mJ/cm<sup>2</sup> na sekundo za neposredno izpostavljene površine v razdalji 1 m in doseže pokritost območij na razdalji več metrov v skladu s specifikacijami proizvajalca. Vendar je vredno upoštevati, da je intenzivnost UVC svetlobe na razdalji urejena z inverznim kvadratnim zakonom, kar ima za posledico znatno manjše doze za območja, ki so bolj oddaljena od naprave (Kowalski, 2010). Da bi omogočili avtonomno premikanje, je treba robota vnaprej programirati z uporabo podrobnega zemljevida položaja pohištva in drugih ovir na območju, ki ga obdelujemo z UVC obsevanjem.

Füszl s sodelavci navaja določanje mikrobne obremenitve bolnišničnih površin s kontaktnimi kulturami z vsakega mesta vzorčenja s ploščami Tryptic Soy Agar (TSA) s premerom 5,5 cm (VWR International, Dunaj, Avstrija). Vzorce je 9 dni zbiral isti laboratorijski tehnik po vnaprej določeni standardizirani shemi vzorčenja (Füszl, 2021).

Med obdobjem raziskave je bilo vzorčenje opravljeno trikrat na dan:

- (a) pred rutinskim čiščenjem in/ali razkuževanjem;
- (b) po rutinskem čiščenju in/ali razkuževanju in
- (c) po uporabi robota UVC.

Po vzorčenju so plošče TSA inkubirali pri 37 °C 48 ur. Po inkubaciji so na vsaki plošči prešteli število enot, ki tvorijo kolonije CFU. Nato so kolonije identificirali z metodo masne spektrometrije MALDITOF (Bruker, ZDA).

Površine so bile razdeljene v tri kategorije glede na stopnjo kontaminacije, ki se redno uporablja za okoljske vzorce v njihovi ustanovi:

- (1) površine z nizko mikrobno obremenitvijo, opredeljeno kot 0–3 CFU/24 cm<sup>2</sup>;
- (2) površine s povprečno mikrobno obremenitvijo, opredeljeno kot 4–50 CFU/24 cm<sup>2</sup>;
- (3) površine z visoko mikrobno obremenitvijo, opredeljeno kot > 50 CFU/24 cm<sup>2</sup>.

Študija, ki jo je izvedla Füszi s sodelavci kaže, da je UVC sevanje, ki ga oddaja robot, znatno zmanjšalo preostalo površinsko kontaminacijo v čakalnicah dveh ambulant terciarne bolnišnice v primerjavi s samim ročnim čiščenjem in razkuževanjem (Füszi, 2021). To je v skladu z drugimi študijami, ki so odkrile znatno zmanjšanje biološke obremenitve patogenov v kliničnih okoljih z uporabo robotske naprave za obsevanje UVC (Liscynsky, 2017; Wong, 2016; Anderson, 2017). Anderson s sodelavci je ugotovili, da je uporaba UVC svetlobe znatno zmanjšala prisotnost na vankomicin odpornih enterokokov (VRE) in *Clostridium difficile* v sobah za bolnike, ki so jih prej zasedali kolonizirani bolniki, v primerjavi z izhodiščem brez predhodnega ročnega čiščenja in razkuževanja (Anderson, 2013). Podobno je Yang s sodelavci opazil zmanjšanje števila bakterijskih kolonij, vzorčenih na različnih površinah po izpostavljenosti UVC v prostorih brez predhodnega ročnega čiščenja in razkuževanja, ki so bili prej okuženi z VRE in MRSA (Yang, 2019).

Z omenjeno tehnologijo so prišli do zaključka da tehnologije UVC sicer izboljšujejo rezultate površinske dekontaminacije, ne poenostavljajo trenutnih postopkov in lahko trenutno služijo le kot dodatek k ročnemu čiščenju in razkuževanju, ki ga izvaja usposobljeno in preizkušeno čistilno osebje.

V primerjavi s predstavljeno tehniko UVC in metodo hladnega zamegljevanja:

- smo pri uporabi metode hladnega zamegljevanja lahko v prostoru med samim izvajanjem, kjer se izvaja dezinfekcija;
- porabimo krajši čas kot s sistemom UVC;
- nimamo težav v prostorih MR kot ga imajo z UV roboti glede kompatibilnosti sistema;
- pri zamegljevanju dosežemo površine aparatov tudi pod površjem kjer je elektronika;
- omenjeni metodi imata slabo lastnost da je pri UVC tehnologij potrebno napotiti z navigacijo in programiranjem UV robota do primerne razdalje v prostoru, kjer je učinkovit na površine;
- navigacija v MR diagnostiki ne deluje in tudi UV robota ne smemo zapeljati v omenjeni prostor;
- uporaba sistema UVC ima slabo lastnost glede svetlobne obremenitve površin, ki po določenem času izpostavljenosti zbledijo oz. jih svetloba uniči in izgubijo svojo namembnost.

V primerjavi s hladnim zamegljevanjem smo uporabili isto metodo vzorčenja (pasivna metoda), ki se razlikuje v velikosti petrijevk in nanosu agarja. Pri študiji s UV roboti so pravtako vzorčili pred in po izvajanju dezinfekcije. Po izvajanju dezinfekcije so imeli

100% rezultat redukcije mikroorganizmov skupaj z metodo čiščenja in dezinfekcije. Pri metodi čiščenja in dezinfekcije so imeli rezultate učinkovitosti 16,7 %.

Drugi od načinov katerega vključujem v primerjavo s hladnim zamegljevanjem je uporaba suhega vodikovega peroksida kot dopolnilni pristop k čiščenju in razkuževanju okolja in prostorov in je eden od načinov, ki se ga uporablja v zdravstvu in laboratorijih. Sterilizatorji z vodikovim peroksidom delujejo tako, da ločijo visoko reaktivne hidroksidne skupine s kompleksno kemično reakcijo, ki se uporablja za napad na celične komponente, vključno s celičnimi membranami, lipidi, beljakovinami in DNA (Herman, 2015). Tekočina  $H_2O_2$  se pretvori v suho meglico vodikovega peroksida s pospešenim procesom izhlapevanja, ki ga je mogoče učinkovito izvesti pri sobni temperaturi in vlažnosti brez posebne predhodne obdelave, kot je razvlaževanje. Suha meglica vodikovega peroksida se enakomerno vnese v zaprt prostor, njegova notranja površina pa je popolnoma izpostavljena suhi meglici vodikovega peroksida, pri čemer se tvori film vodikovega peroksida debeline približno  $1 \mu m$ , ki se oprime površine, kjer se lahko zadržujejo mikroorganizmi (Herman, 2015). Načeloma imajo sterilizatorji avtomatiziran in neprekinjen sistem. Tehnologija katalitično proizvaja suh vodikov peroksid iz okoljske vlage in kisika ter ga dovaja po celotnem prostoru, kjer želimo opraviti dezinfekcijo. Časovno se postopek izvaja od 5 do 7 ur (Herman, 2015).

Dezinfekcija in sterilizacija s suho meglo z vodikovim peroksidom nista škodljiva za upravljavca, ne onesnažujeta okolja, njen končni ostanek pa sta voda in kisik. Z dezinfekcijsko metodo uporabo suhe megle z vodikovim peroksidom se redko poškoduje pasivni film iz nerjavečega jekla (Sanguinet, 2021).

Ramirez je s sodelavci v študiji kjer je bil cilj oceniti vpliv dezinfekcije z vodikovim peroksidom na bolniščne okužbe razvil logistični regresijski model z namenom da bi raziskali možno povezavo med izpostavljenostjo dezinfekcije z vodikovim peroksidom in verjetnostjo razvoja bolnišničnih okužb (Ramirez, 2021). V modelu je bilo nadzorovanih več spremenljivk, vključno s trajanjem pacientovega obiska, starostjo pacienta, letom obiska, bolnikovo vrsto diagnoze in območjem bolnišnice, v katero so bili sprejeti. Z modelom so dokazali statistično značilno razmerje, ki povezuje izpostavljenost dezinfekcije z vodikovim peroksidom z zmanjšano verjetnostjo, da bi bolnik med bivanjem razvil bolnišnično okužbo, ob nadzoru zgoraj omenjenih spremenljivk. Od vključenih kospremenljivk je bila samo dolžina bivanja bolnika pomembno povezana z bolnikovo verjetnostjo, da zbolí za bolnišnično okužbo, pri čemer so imeli bolniki, ki so ostali dlje kot 10 dni, znatno višje možnosti za razvoj bolnišničnega infekta kot bolniki, ki so ostali 5 dni ali manj (Ramirez, 2021).

Primerjava metode uporabe suhega vodikovega peroksida z metodo hladnega zamegljevanja:

- pri uporabi metode hladnega zamegljevanja smo lahko v prostoru med samim izvajanjem, kjer se izvaja dezinfekcija;
- porabimo krajši čas kot s sistemom uporabe suhega vodikovega peroksida;
- s sistemom hladnega zamegljevanja nimamo težav v prostorih MR kot ga imajo s sterilizatorji suhega vodikovega peroksida glede kompatibilnosti sistema in privlaka magnetne sile;

- metoda suhega vodikovega peroksida ima slabo lastnost kjer je po dolgi dezinfekciji 5-7 ur, omejen tudi vstop v prostor;
- metoda s suhim vodikovim peroksidom je učinkovita na površine vendar ne doseže vseh površin optimalno, pomanjkljivo deluje na razkuževanje elektronike.

Pri metodi s suhim vodikovim peroksidom so uporabili pasivno metodo vzorčenja, ki ima glavno prednost sedimentacijo. Pasivno metodo so uporabljali pri rednih vzorčenjih in jih uporabljajo rutinsko primerljivo z našo metodo pasivnega vzorčenja.

Poglavitno vprašanje je bilo ali Steriplant<sup>®</sup>N pri hladnem zamegljevanju v diagnostičnih prostorih med diagnostičnimi posegi vpliva negativno na diagnostično opremo, preiskovance med posegom in na osebje. Postavili smo hipotezo da Steriplant<sup>®</sup>N ne vpliva na človeške celice. Raziskovalno vprašanje smo razdelili na tri dele, ki smo jih opredelili na tehnično aplikativno in empirično podprto raziskavo.

*Hipoteza 1: Dokazati želimo da z obstoječim aerosolizatorjem OPTI JET CS MD1 MR in s šobami 20-30 mikronov dosežemo dezinfekcijo v zraku na radioloških in MR diagnostikah s pomočjo aerosolov.*

Namen hipoteze je bil ugotoviti in oceniti učinkovitost delovanja uporabljenega biocidnega sredstva EOV (Steriplant<sup>®</sup>N) z aerosolizacijo z aerosolizatorjem OPTI-JET CSC MD1 MR. Za ugotavljanje stopnje kontaminacije je bila izvedena identifikacija prisotnosti mikroorganizmov v zraku in na površinah, da bi lahko ocenili učinkovitost zmanjšanja števila mikroorganizmov, prisotnih v zraku, z aerosolizacijo EOV. Uporabili smo pasivno in aktivno metodo vzorčenja. V povprečju je bilo skupno povprečno število mikroorganizmov v vseh prostorih med 11 in 14 CFU/m<sup>3</sup> vzorčenega zraka. Primerjava podatkov za vse prostore skupaj pred aerosolizacijo EOV in po njej kaže 79–92 % zmanjšanje skupnega števila mikroorganizmov. Izvedli smo statistično analizo podatkov pri skupnem številu mikroorganizmov in prisotnostjo mikroorganizmov po aerosolizaciji EOV v diagnostičnih prostorih. Rezultati parnega t-testa kažejo, da je povprečna razlika med meritvami pred in po aerosolizaciji statistično značilna. Povprečna vrednost pred aerosolizacijo je bistveno višja od povprečne vrednosti po aerosolizaciji, kar nakazuje na močan učinek aerosolizacije. S tem lahko potrdimo da so razlike statistično pomembne in lahko sprejmemo podano hipotezo.

Rezultati vzorčenja zraka pri mikrobiološki obremenitvi diagnostičnih prostorov so pokazali dokaj enakomerno obremenitev z mikroorganizmi. Glede na rezultate naše študije je bilo za 25–45 % mikroorganizmov več, kot je priporočeno. Biocidni aerosol na osnovi EOV je pokazal zmanjšanje števila CFU v zračnih prostorih preskusa v povprečnih vrednostih od 1,14 do 2,54 CFU/m<sup>3</sup> ali zmanjšanje za 80 do 92 %. Glede na priporočila avtorjev (Salgado, 2006; Scanlon, 2006) menimo, da je uporaba biocidnega aerosola Steriplant<sup>®</sup>N praktična v pripravljenem prostoru za dezinfekcijo, v katerem se bistveno zmanjša obremenitev z mikroorganizmi.

*Hipoteza 2: Predvidevamo da bomo z uporabo izboljšane aerosolizatorja OPTI JET CS MD 2 ZE s specilanimi 10-15 mikronskimi šobami za hladno zamegljevanje dosegli izboljšavo pri kakovosti samega zamegljevanja z aerosoli in dosegli manjšo uporabo EOV.*

Glede na opravljeno analizo, ki smo jo predstavili v hipotezi 1 smo pred uporabo izboljšane aerosolizatorja OPTI JET CS MD 2 ZE s specilanimi 10-15 mikronskimi šobami za hladno zamegljevanje določene trditve glede vzorčenja potrdili in določene tudi ovrgli. Izdelava in optimizacija aerosolizatorja je bila posebej zahtevna glede na posebno okolje v katerem smo izvajali hladno zamegljevanje.

Primerjave med metodo sedimentacije in metodo ciklonskega vzorčenja v diagnostičnih prostorih smo izvedli z ustreznim statističnim testom, glede na porazdelitev podatkov. Uporabili smo neparametrični Friedmanov test (ekvivalent parametričnega testa ANOVA), ki ga uporabljamo za ugotavljanje značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi rangov večjih (več kot dve) spremenljivki.

S pomočjo rangov smo preverili ali obstajajo razlike med skupinami in s pomočjo p-vrednosti smo preverili ali so razlike statistično značilne. Povprečni rangi za metodo sedimentacije kažejo, da so vrednosti meritev pred aerosolizacijo nekoliko višje kot vrednosti meritev med aerosolizacijo in nižje kot po aerosolizaciji. Friedmanov test je bil uporabljen za ugotavljanje, ali obstajajo statistično značilne razlike med temi tremi merjenimi časovnimi točkami. p-vrednost (0,050) je enaka kot "običajna" raven značilnosti (0,05; testiramo, da je manjše), kar pomeni, da ni statistično značilnih razlik med meritvami pred, med in po aerosolizaciji v skupini metode sedimentacije. Kljub opaznim razlikam v povprečnih rangih, te razlike niso dovolj velike, da bi bile statistično značilne.

Povprečni rangi kažejo, da so vrednosti meritev pred aerosolizacijo nekoliko višje kot vrednosti meritev med aerosolizacijo in po aerosolizaciji. Friedmanov test je bil uporabljen za ugotavljanje, ali obstajajo statistično značilne razlike med temi tremi merjenimi časovnimi točkami. p-vrednost (0,717) je bistveno višja od običajne ravni značilnosti (0,05), kar pomeni, da ni statistično značilnih razlik med meritvami pred, med in po aerosolizaciji v skupini ciklonsko vzorčenje. Razlike v povprečnih rangih so majhne in niso dovolj velike, da bi bile statistično značilne.

Na podlagi rezultatov Friedmanovega testa lahko sklenemo, da ni statistično značilnih razlik med meritvami pred, med in po aerosolizaciji v obeh skupinah (metode sedimentacije in ciklonsko vzorčenje). Kljub opaznim razlikam v povprečnih rangih, te razlike niso dovolj velike, da bi bile statistično značilne. To pomeni, da aerosolizacija v teh dveh skupinah ni povzročila pomembnih sprememb v meritvah, kot jih ocenjuje Friedmanov test.

Nato smo preverili ali so razlike med sedimentacijo in ciklonskim vzorčenjem, v vsaki posamezni časovni točki, uporabljen je bil neparametrični test (Mann-Whitney U test). Uporabili smo neparametrični Mann-Whitney test (ekvivalent parametričnega t-testa za neodvisne vzorce), ki ga uporabljamo za ugotavljanje značilnih razlik med povprečnima vrednostima rangov dveh spremenljivk.

Meritev pred aerosolizacijo:

Povprečni rangi kažejo, da je skupina ciklonskega vzorčenja imela višje meritve pred aerosolizacijo v primerjavi s skupino sedimentacije. p-vrednost ( $p=0,050$ ) je na meji statistične značilnosti. To pomeni, da je razlika med skupinama ni statistično značilna na ravni značilnosti 0,05.

Meritev med aerosolizacijo:

Povprečni rangi kažejo, da je skupina ciklonskega vzorčenja imela višje meritve med aerosolizacijo v primerjavi s skupino sedimentacije. p-vrednost (0,046) je manjša od 0,05, kar pomeni, da je razlika med skupinama statistično značilna. To nakazuje, da so meritve med aerosolizacijo v skupini ciklonskega vzorčenja statistično značilno višje kot v skupini sedimentacije.

Meritev po aerosolizaciji:

Povprečni rangi kažejo, da je skupina ciklonskega vzorčenja imela višje meritve po aerosolizaciji v primerjavi s skupino sedimentacije. p-vrednost (0,127) je večja od 0,05, kar pomeni, da razlika med skupinama ni statistično značilna. To nakazuje, da meritve po aerosolizaciji med skupinama niso statistično različne.

Razlika v meritvah pred aerosolizacijo med skupinama sedimentacija in ciklonsko vzorčenje ni statistično značilna ( $p = 0,050$ ). Razlika v meritvah med aerosolizacijo med skupinama je statistično značilna ( $p = 0,046$ ), kar kaže, da je med aerosolizacijo skupina ciklonskega vzorčenja dosegla višje meritve kot skupina sedimentacije. Razlika v meritvah po

aerosolizaciji med skupinama ni statistično značilna ( $p = 0,127$ ), kar pomeni, da ni pomembne razlike med meritvami po aerosolizaciji med obema skupinama.

Sklenemo lahko da ti rezultati kažejo, da je aerosolizacija vplivala na meritve med postopkom, vendar ni povzročila statistično značilne razlike v meritvah po postopku.

Po aerosolizaciji se je število mikroorganizmov/ $m^3$  zraka z izboljšanim aerosolizatorjem OPTI JET CS MD 2 ZE s specilanimi 10-15 mikronskimi šobami pri uporabi zmanjšalo za 87 % in 93 % kar je razvidno iz tabele 16. Dokazali smo tudi da smo uporabili 5 ml/ $m^3$  v petih minutah. Vendar se je v vzorcih, zbranih 30 minut pozneje, število mikroorganizmov/ $m^3$  nekoliko povečalo, kar je bilo najverjetneje posledica neprekinjenega delovanja klimatske naprave. Rezultati so dokazali, da je Steriplant<sup>®</sup>N pri uporabljenih pogojih učinkovito razkužilo za prostor MR. Rezultati so skladni z rezultatom učinkovitosti razkuževanja zraka in površin pri hladnem zamegljevanju s Steriplant<sup>®</sup>N, pridobljenimi v naši prejšnji študiji (Pintarič, 2015).

Uporaba biocida Steriplant<sup>®</sup>N se je izkazala za učinkovito. Prav tako ni bilo zabeleženih morebitnih poškodb izpostavljenih naprav ali osebja. Skratka, obstajajo številne možnosti uporabe EOV, ki so predvsem posledica širokega spektra delovanja, prijaznosti do okolja, varne uporabe, možnosti uporabe brez ostankov (ni potrebno dodatno čiščenje površine) v količini 6-8 ml/ $m^2$ . Vse to predstavlja pomembno prednost v primerjavi z vsemi drugimi skupinami biocidov (Pintarič, 2015). Na osnovi predstavljenih podatkov lahko sprejmemo podano hipotezo.

*Hipoteza 3: Predvidevamo da aerosol Steriplant<sup>®</sup>N pri pogojih zamegljevanja, ki simulirajo pogoje v MR prostorih med razkuževanjem ne povzroči citotoksičnih in genotoksičnih učinkov pri človeških alveolarnih epitelijskih celicah A549 in vitro.*

V tej študiji smo ocenili učinkovitost hladnega zamegljevanja Steriplant<sup>®</sup>N za razkuževanje zraka ter njegovo potencialno citotoksičnost in genotoksičnost za človeške alveolarne epitelijske celice A549 *in vitro*. Citotoksičnost in genotoksičnost sta bili določeni pri pogojih izpostavljenosti, ki simulirajo pogoje v prostoru MR med zamegljevanjem. Za ta namen je bila zasnovana in izdelana simulacijska komora, ki simulira pogoje izpostavljenosti v prostoru za 3T MR na Oddelku za radiologijo. Glede na parametre in meritve smo zasnovali in izdelali simulacijsko komoro, v kateri smo lahko vzpostavili pogoje pretoka zraka in časovne razlike, kot so v diagnostičnem prostoru 3T MR. Taka simulacijska komora se lahko uporablja v raziskovalnih procesih tudi kot napovedni model, upoštevati pa je treba pravila, določena za majhne zračne tokove, ki niso izotermni (Müllejans, 1966). Upoštevati smo morali naslednje parametre in teorije. Za našo simulacijsko komoro smo uporabili modelno teorijo in pravila, povezana z izkrivljenimi modeli za industrijsko prezračevanje in spremembe gostote tekočine (Baturin, 1972). Medtem ko se je v simulacijski komori izvajala aerosolizacija, smo spreminjali gostote tekočin z metodo neizotermnega pretoka zraka. Zato smo potencialno citotoksičnost in genotoksičnost hladnega zamegljevanja z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N določili na *modelu in vitro* s človeškimi alveolarnimi epitelijskimi celicami A549, ki se pogosto uporabljajo za *in vitro* študije inhalacijske toksičnosti (Himestra et al. 2018). Rezultati so pokazali, da izpostavljenost hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N (50 % v/v) (50 in 100 %) ni bistveno zmanjšala viabilnosti celic A549 neposredno po izpostavljenosti, po 1, 4 in 24 urni inkubaciji.

Mehanizem protibakterijskega delovanja EOVS naj bi bil povezan z nastajanjem HOCl in OCl<sup>-</sup>, ki lahko z organskimi snovmi tvorita genotoksične stranske produkte (Knasmüller, 1996), in z reaktivnimi vrstami, za katere je prav tako znano, da povzročajo genotoksične učinke, smo nadalje raziskovali, ali izpostavljenost hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N povzroči poškodbe DNK v celicah A549. S testom  $\gamma$ H2AX, ki zaznava nastanek dvojnih prekinitev verig DNK (DSB), smo dokazali, da pri uporabljenih pogojih izpostavljenosti hladna megla Steriplant<sup>®</sup>N ni povzročila večjega nastajanja  $\gamma$ H2AX pozitivnih celic v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki ji niso bile izpostavljene. V vsak poskus je bila vključena pozitivna kontrola (PC, 1  $\mu$ g/ml etopozida, 24 ur). Prisotnost DSB je bila analizirana s pretočno citometrijo, posredno z zaznavanjem fluorescence  $\gamma$ H2AX. Rezultati so pokazali, da izpostavljenost hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N (50 % v/v) (50 in 100 %) ni bistveno povečal tvorbe DSB v izpostavljenih celicah A549 takoj po izpostavljenosti, po 1, 4 in 24 urni inkubaciji.

Potencialno mutagenost in genotoksičnost EOVS je ovrednotil (Saitoh et al. 2010). Dokazali so, da z nevtralno EOVS niso inducirali povratnih mutacij v sevih *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli* ter niso povzročili kromosomskih aberacij v celicah pljučnih fibroblastov kitajskega hrčka. Kolikor je avtorjem znano, ni bila objavljena nobena druga študija o možni genotoksičnosti EOVS. Naši rezultati potrjujejo rezultate te študije in kažejo, da ni verjetno, da bi hladno zamegljevanje z EOVS Steriplant<sup>®</sup>N pri pogojih, ki se uporabljajo za dezinfekcijo MRI, predstavljalo nevarnost za zdravje pacientov ali osebja. Naši rezultati so pokazali, da hladno zamegljevanje z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N učinkovito zmanjša breme mikroorganizmov, ter da je hladna megla Steriplant<sup>®</sup>N v pogojih izpostavljenosti, ki so pomembni za izpostavljenost ljudi v diagnostičnem prostoru za MR, necitotoksična in nima genotoksičnega potenciala. Na osnovi predstavljenih podatkov lahko sprejmemo hipotezo.

## 5.2 Sklepne ugotovitve

EOVS je dezinfekcijsko sredstvo nove generacije s številnimi prednostmi. Poleg zelo širokega spektra antibakterijskega delovanja s takojšnjim učinkom je njena prednost tudi, da po uporabi ne pušča strupenih ostankov. Zaradi teh lastnosti je EOVS najprimernejše razkužilo za razkuževanje v bolnišnicah in diagnostičnih centrih. Za razkuževanje prostora za MRI s hladnim zamegljevanjem EOVS (Steriplant<sup>®</sup>N) smo razvili aerosolizator OPTI-JET CSC MD1MR, ki ga namestimo v prostor za MR, in dokazali učinkovito razkuževanje zraka v prostoru za MR v kratkem času (12 min). S tem se odpira možnost, da se razkuževanje diagnostičnega prostora za MR izvaja med posameznimi preiskavami bolnikov ali celo med njihovim potekom. Da bi ocenili, ali je lahko hladno zamegljevanje z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N nevarno za ljudi, smo testirali potencialno citotoksičnost in genotoksičnost hladne megle Steriplant<sup>®</sup>N v pogojih, ki se uporabljajo v diagnostičnem prostoru za MR. S simulacijsko komoro, ki je bila izdelana za testiranje genotoksičnosti, smo pridobili tudi nove parametre za hladno zamegljevanje z novo aerosolizatorsko napravo OPTI-JET CS MD 2ZE. Ta nam ponuja boljše rezultate pri metodi hladnega zamegljevanja v samo 5 minutah in je boljše za delovni proces MR.

Dokazali smo, da izpostavljenost človeških alveolarnih epitelijskih celic A549 hladni megli Steriplant<sup>®</sup>N ni vplivala na njihovo sposobnost preživetja niti ni povzročila poškodb

DNK. Naši rezultati so pokazali, da hladno zamegljevanje z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N učinkovito zmanjša breme mikroorganizmov, ter da je hladna megla Steriplant<sup>®</sup>N v pogojih izpostavljenosti, ki so pomembni za izpostavljenost ljudi v diagnostičnem prostoru za MR, necitotoksična in nima genotoksičnega potenciala. Menimo, da je dezinfekcija z EOVS učinkovita in varna ter da gre za metodo, ki jo lahko izberejo bolnišnice in diagnostični centri.



## Poglavje 4

# Zaključki

Razmere v katerih delamo dnevno nas silijo da delamo hitro in smo izpostavljeni dodatnim dejavnikom, ki nas bremenijo. Delovni čas se podaljšuje ponavadi v določenih poklicih še delamo dežurstva in pripravljenost. Okolje v katerem delamo v zdravstvu se deli na več nivojev. Poznamo bolniške sobe, preiskovalnice, operacijske dvorane, diagnostike itd. Vsi od naštetih prostorov so posebni, glede na pogoje dela. V nekaterih prostorih se moramo preoblečt, v filtru to posebej velja za operacijske dvorane, posebni normativi so tudi v izolacijskih sobah na infekcijskih oddelkih s kužnimi in prenosljivimi boleznimi. Razkuževanje v takšnih prostorih je ponavadi ciklično in ozko usmerjeno. Predvsem se osredotočamo na kurativo na preventivo in na standarde. Preiskovanci, ki pridejo na diagnostično preiskavo od doma torej ambulantno in ne kažejo nikakršnih znakov okužbe ali zdravstvenih težav niso obravnavani po istem postopku kot visoko rizični kužni pacienti, čeprav jih diagnostično pregledamo pod istimi pogoji. Prav tako so udeleženi v postopku zdravstveni delavci, ki so tudi lahko potencialno okuženi in prenašajo nalezljive bolezni. Idealno je omogočiti vsakemu preiskovancu na diagnostičnih pregledih iste razmere v istem okolju v katerem delamo, kar pa je nemogoče pravilno in natančno izvesti. V doktorskem delu smo se poskušali približati omenjenemu idealu na radioloških preiskavah (Pintaric, 2015). Radiološke preiskave so postale številčne in svojstvene posebej z razvojem novih tehnologij in materialov. Osredotočili smo se na MR preiskave, kjer je še posebej velika težava zaradi svojstvenega okolja še prisotno ves čas magnetno polje. Torej dokazali smo da lahko razkužujemo s hladnim zamegljevanjem med in po preiskavi brez učinkov na sesalčje celice. Prav tako ni obremenjeno zdravstveno osebje, ki je ves čas prisotno v omenjenih prostorih, kar smo dokazali s potencialno citotoksičnostjo in genotoksičnostjo hladnega zamegljevanja z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N na modelu *in vitro* s človeškimi alveolarnimi epiteljskimi celicami A549.

Z rezultati predstavljeni v doktorski nalogi smo pokazali, da hladno zamegljevanje z izdelkom Steriplant<sup>®</sup>N učinkovito zmanjša breme mikroorganizmov, ter da je hladna megla Steriplant<sup>®</sup>N v pogojih izpostavljenosti, ki so pomembni za izpostavljenost ljudi v diagnostičnem prostoru za MR, necitotoksična in nima genotoksičnega potenciala.



# Literatura

- Ackerman, E. (2020). Autonomous robots are helping kill coronavirus in hospitals, *IEEE Spectr.* 11.
- Aiello, A. E., & Larson, E. (2003). Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infect. Dis.*, 3, 501.
- Aiello, A. E., Marshall, B., Levy, S. B., Della-Latta, P., & Larson, E. (2004). Relationship between triclosan and susceptibilities of bacteria isolated from hands in the community. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 48, 2973.
- Amato, P., Brisebois, E., Draghi, M., Duchaine, C., Fröhlich-Nowoisky, J., Huffman, J.A., Mainelis, G., Robine, E., & Thibaudon, M. (2017). Sampling Techniques. *Microbiol. Aerosols*, 13, 23–48.
- Anderson, D.J., Chen, L.F., Weber, D.J., Moehring, R.W., Lewis, S.S., & Triplett, P.F. (2017). Enhanced terminal room disinfection and acquisition and infection caused by multidrug-resistant organisms and *Clostridium difficile* (the Benefits of Enhanced Terminal Room Disinfection study): a cluster-randomised, multicentre, crossover study. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10071):805–14.
- Anderson, D.J., Gergen, M.F., Smathers, E., Sexton, D.J., Chen, L.F., & Weber, D.J. (2013). Decontamination of targeted pathogens from patient rooms using an automated ultraviolet-C-emitting device. *Infect Control Hosp Epidemiol.*;34(5):466–71.
- Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martin, S.E., Domínguez-Domínguez, J. and García-Almendárez, B.E. (2012). Effect of Neutral Electrolyzed Water and Nisin on *Listeria monocytogenes* Biofilms, and on Listeriolysin O Activity. *Food Control* 24: 116–122.
- Ariza-Heredia, E.J., & Chemaly, R.F. (2018). Update on infection control practices in cancer hospitals. *CA Cancer J Clin.*;68:340–355.
- Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S. & Kannan, K. (2014). Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1243–1249.
- Astagneau, P. (1999). Prevention of hepatitis C in clinical practice. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 29:345-347.
- Aubert, B. (1991). Practical Aspects of Personal Exposure Monitoring in Hospitals and Research Laboratories. *Radioprotection*, 26:481-491.
- Auchincloss, T.R., Biocidal, particularly virucidal compositions, US Patent 4,822,512.

- Baffoy-Fayard, N., Maugat, S., Sapoval, M., Cluzel, P., Denys, A., Sellier, N., Desruennes, E., Legmann, P., Thibault, V., Brucker, G., & Astagneau, P. (2003). Study Group on Hygiene Practices in Interventional Radiology. Potential exposure to hepatitis C virus through accidental blood contact in interventional radiology. *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR*, 14(2 Pt 1), 173–179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582185>.
- Balonov, M. I., Krisyuk, E. M., & Ramel, C. (1999). Environmental radioactivity, population exposure and related health risks in the east Baltic region. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 25 Suppl 3, 17–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10546805>.
- Bari, M. L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., & Isshiki, K. (2003a). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *J. Food Prot.* 66:542-548.
- Baturin, V. V. (1972). *Fundamentals of industrial ventilation*,. Pergamon Press. Retrieved Bernstein, M., 2004. A review of the influence of particle size, puff volume and inhalation pattern on the deposition of cigarette smoke particles in the respiratory tract. *Inhalation Toxicol.* 16: 675–689. <https://doi.org/10.1080/08958370490476587>
- Bialka, K. L., Demirci, A., & Knabel, S. J. (2004). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poult Sci* 83:2071–2078.
- Bibbolino, C., Pittalis, S., Schininà, V., Busi Rizzi, E., & Puro, V. (2009). Hygiene precautions and the transmission of infections in radiology. *La Radiologia Medica*, 114(1), 111–120. <https://doi.org/10.1007/s11547-009-0363-0>.
- Blythe, D., Keenlyside, D., Dawson, S. J., & Galloway, A. (1998). Environmental contamination due to methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). 1: *J Hosp Infect.* Jan;38(1):67-9. Comment in: *J Hosp Infect.* Jul;39(3):243-4.
- Borges, J.T., Nakada, L.Y.K., Maniero, M.G., & Guimarães, J.R. (2021). SARS-CoV-2: A Systematic Review of Indoor Air Sampling for Virus Detection. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28, 40460–40473.
- Boyce, J. M., Potter-Bynoe, G., Chenevert, C., & King, T. (1997). Environmental contamination due to methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Sep;18(9):622-7.
- Boyce, P. (2002). Guideline for hand hygiene in health-care settings. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*;51(16):1–44.
- Braoudaki, M., & Hilton, A.C. (2004). Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. *FEMS Microbiol. Lett.*, 235, 305.
- Braoudaki, M., & Hilton, A.C. (2004a). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 73.
- Breitner, S., Liu Q., Cyrus J., Brüske I., Franck U., Schlink U., Leitte M., Herbarth O., Wiedensohler A., Wehner B., Hu M., Pan C., Wichmann E., Peters A., 2011. Submicrometer particulate air pollution and cardiovascular mortality in Beijing, China. *Sci Total Environ* 409: 5196–5204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.023>.
- Brusick, D., Analysis of genotoxicity and the carcinogenic mode of action for ortho-phenylphenol. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 460.
- Buerke, B., Mellmann, A., Kipp, F., Heindel, W., & Wessling, J. (2012). Hygienic Aspects in Radiology: What the Radiologist Should Know. *Rofo-Fortschritte Auf dem Gebiet der Rontgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren*, 184:1099-1109.

- Cabanis, E. A., & Chouard, C. H. (2009). Good practices for disinfection of endo-vaginal and endorectal ultrasonic probes. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*, 193:2121-2126.
- Cao W, Zhu Z. W., Shi Z.X., Wang C.Y., & Li B.M. (2009). Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of Salmonella Enteritidis and its contaminated shell eggs. *Int J Food Microbiol* 130(2):88–93.
- Chaljub, G., Kramer, L. A., Johnson, R. F., Johnson, R. F., Singh, H., & Crow, W. N. (2001). Projectile Cylinder Accidents Resulting from the Presence of Ferromagnetic Nitrous Oxide or Oxygen Tanks in the MR Suite. *American Journal of Roentgenology*, 177(1), 27–30. <https://doi.org/10.2214/ajr.177.1.1770027>.
- Chan, D., Downing, D., Keough, C. E., Saad, W. A., Annamalai, G., d'Othee, B. J., & Cardella, J. F. (2012). Joint Practice Guideline for Sterile Technique during Vascular and Interventional Radiology Procedures: From the Society of Interventional Radiology, Association of periOperative Registered Nurses, and Association for Radiologic and Imaging Nursing, for t. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 23(12), 1603–1612. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2012.07.017>.
- Chang, C.-W., Ting, Y.-T., & Horng, Y.-J. (2019). Collection Efficiency of Liquid-based Samplers for Fungi in Indoor Air. *Indoor Air* 2019, 29, 380–389.
- Chaoui, A. S., Dahran, S., Terrier, F., & Duclel, G. (1995). Microbiologic Contamination in Interventional Radiology Rooms. *Radiology*, 197:137.
- Chauhan, S., D'Cruz R., Faruqi S., Singh K., Varma S., Singh M., Karthik V. (2008). Chemical warfare agents. *Environ Toxicol Pharmacol* 26(2):113–22. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.003>.
- Chen, J., Kan, D., Chen, H., Huang, W., Bai, P., Song, X., Pan, W., (2012). Association of particulate air pollution with daily mortality: the China Air Pollution and Health Effects Study. *Am J Epidemiol* 175(11): 1173–1181. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr425>.
- Chen, J., Li, Y., Ma, J., Pan, W., Zeng, G., Xu, H., Chen, H., Kan, D. (2011). Coarse particles and mortality in three Chinese cities: the China Air Pollution and Health Effects Study (CAPES). *Sci Total Environ* 409:4934–4938. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.058>.
- Cherepenko, Y., & Hovorun, D. M. (2005). Bacterial multidrug resistance unrelated to multidrug exporters: Cell biology insight. *Cell Biol. Int.*, 29, 3.
- Chinn, R.Y., & Sehulster, L. (2003). Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities: Recommendations of CDC and Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm. Rep.*, 52, 1–42.
- Chrz, J., Dvorakova, M., Kejlova, K., Ocadlikova, D., Svobodova, L., Malina, L., Hošikova, B., Jirova, D., Bendova, H. & Kolarova, H. (2024). The Potential for Genotoxicity, Mutagenicity and Endocrine Disruption in Triclosan and Triclocarban Assessed through a Combination of In Vitro Methods. *J. Xenobiot.* 14, 15–30.
- Clark, J., Barrett, S.P. & Stapleton, R. (2006). Efficiency of Super-Oxidized Water Fogging in Environmental Decontamination. *J. Hosp. Infect.* 64: 386–90.
- Cohen, J., Brauer, M., Burnett, R., Anderson, R., Frostad, J., & Estep, K. (2017). Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *Lancet* 389, 1907–1918. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30505-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30505-6).
- Cole, E. C., Addison, R. M., Rubino, J. R., Leese, K. E., Dulaney, P. D., Newell, M. S., Wilkins, J., Gaber, D. J., Wineinger, T., & Criger, D. A. (2003). Investigation of antibiotic and antibacterial agent cross-resistance in target bacteria from homes of

- antibacterial product users and nonusers. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 664. Concentration electrolyzed water and its sanitization potential against contaminated shell eggs. *Int J Food Microbiol* 130(2):88–93.
- Cosgrove, S. E., Qi, Y., Kaye, K. S., Harbarth, S., Karchmer, A. W., & Carmeli, Y. (2005). *Infect Control Hosp Epidemiol.* Feb;26(2):166-74. Comment in: *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006 Sep;27(9):994-5. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges.
- Cowan, R. E., Manning, A. P., Ayliffe, G. A. J., Axon, A. T. R., Causton, J. S., Cripps, N. F., Hall, R., Hanson, P. J. V., Harrison, J., Leicester, R. J., Neumann, C., & Wicks, J. (1993). Aldehyde Disinfectants and Health in Endoscopy Units - the Report of A Working Party of the British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. *Gut* 1993; 34:1641-1645.
- Cox, J., Mbareche, H., Lindsley, W.G., & Duchaine, C. (2020). Field Sampling of Indoor Bioaerosols. *Aerosol Sci. Technol.*, 54, 572–584.
- De Rossi, E., Ainsa, J. A., & Riccardi, G. (2006). Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: An unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 36.
- Delaney, L. R., & Gunderman, R. B. (2005). Hand Hygiene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* Vol. 28, No. 1 120.
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andremont, A., Picard, B., Taddei, F., & Matic, I. (2002). High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Bacteriol.*, 184, 605–609.
- Dietze, B., Rath, A., Wendt, C., & Martiny, H. (2001). Survival of MRSA on sterile goods packaging. *J Hosp Infect.* 2001 Dec; 49 (4): 255-61.
- Ding, T, G. E. Z., & Shi J. (2015b). Impact of slightly acidic electrolyzed water (SAEW) and ultrasound on microbial loads and quality of fresh fruits. *LWT-Food Sci Technol* 60(2):1195–1199.
- Ding, T., Xuan X.T., & Li J. (2016). Disinfection efficacy and mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Staphylococcus aureus* in pure culture. *Food Control* 60:505–510.
- Ding, T., Xuan X.T., & Liu D.H. (2015a). Electrolyzed water generated using a circulating reactor. *Int J Food Eng* 11(1):79–84.
- DuPont company literature for Virkon S <http://www.antecint.co.uk/main/virkons.htm>
- Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, A.W., Cimino, C. M., Dobrev, I., Douglas, R. G., Nohmi, T., Phillips, H.D., & Vickers, C. (2009). Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme., *Mutagenesis* vol. 24 no. 4 pp. 341–349. doi:10.1093/mutage/geb014 Advance Access Publication 17 June 2009.
- Elwekeel, F., Cui X., & Abdala A., 2022. Effects of chlorine particle concentration on the human airway. *J Nanopart Res* ; 24(6): 105. doi: 10.1007/s/11051-022-05493-5.
- Emmons, C.W. (1933). Fungicidal action of some common disinfectants on two dermatophytes. *Arch. Dermatol. Syphil.* ;28:15-21.
- Escalada, M. G., Russell, A. D., Maillard, J. Y., & Ochs, D. (2005). Triclosan–bacteria interactions: Single or multiple target sites? *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 476.
- European Union. Regulation EC No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (Recast) (Text with EEA Relevance). *Off. J. Eur. Union* 2009, 342, 59–209.
- Fang, H., Tong, W., Branham, W.S., Moland, C.L., Dial, S.L., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R., Owens, W., & Sheehan, D.M. (2003). Study of 202 natural, synthetic, and

- environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 1338.
- Favero, M.S. & Bond, W.W. (1991). Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger, :617-41.
- Fernstrom, A., & Goldblatt, M. (2013). Aerobiology and Its Role in the Transmission of Infectious Diseases. *J. Pathog.*, 493960.
- Fissore, A. A., & Ph, D. (1991). a Simple Empirical Model for Predicting Velocity Distributions and Comfort in a Large Slot-Ventilated Space. *Foodborne pathogens. J Food Eng* 113(4):548–53.
- Fu Shaw, L., Chen, I.H., Chen, C.S., Wu, H.H., Lai, L.S., Chen, Y.Y., & Wang, F.D. (2018). Factors Influencing Microbial Colonies in the Air of Operating Rooms. *BMC Infect. Dis.*, 18, 4. [CrossRef] [PubMed]
- Füszl, A., Zatorska, B., Van den Nest, M., Ebner, J., Presterl, E. & Diab-Elschahawi, M. (2021). The use of a UV-C disinfection robot in the routine cleaning process: a field study in an Academic hospital. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* volume 10, Article number: 84.
- Garcin, F., Bergeaud, Y., & Joly, B. (1998). [Efficacy of an ultraviolet device for the disinfection of radiology cassettes]. *Pathologie-Biologie*, 46(5), 325–329. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9769893>.
- Gaze, W. H., Abdousslam, N., Hawkey, P. M., & Wellington, E. M. (2005). Incidence of Class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 49, 1802.
- Gilbert, P., Allison, D. G., & McBain, A. J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: Dosing mechanisms imply cross-resistance? *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 31, 98S.
- Grabsch, E. A., Burrell, L. J., Padiglione, A., O'Keeffe, J. M., Ballard, S., & Grayson, L. (2006). Risk of environmental and healthcare worker contamination with vancomycin-resistant enterococci during outpatient procedures and hemodialysis. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27:287-293.
- Guentzel, J.L., Lam, K.L., Callam, M.A., Emmons, S.A. & Dunham, V.L. (2008). Reduction of Bacteria on Spinach, Lettuce, and Surface in Food Service Areas Using Neutral Electrolyzed Oxidizing Water. *Food Microbiol.* 25: 36–41.
- Guerini, H., Ayrat, X., Vuillemin, V., Morvan, G., Thévenin, F., Campagna, R., & Drapé, J. L. (2012). Ultrasound-guided injection in osteoarticular pathologies: General principles and precautions. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 93(9), 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2012.06.010>.
- Hamouda, T. A., & Baker, J.R. Jr. (2000). Antimicrobial mechanism of action in negative gram negative bacilli, *J. Appl. Microbiol.*, 89, 397–403.
- Hamouda, T., Hayes, M. M., & Cao, Z. (1999). A novel surfactant nanoemulsion with broad-spectrum sporicidal activity against *Bacillus* species, *J. Infect. Dis.*, 180, 1939–1949.
- Hamouda, T., Myc, A., Donovan, B., Shih, A. Y., Reuter, J. D., & Baker, J. R. Jr. (2000). A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi, *Microbiol. Res.*, 156(1),1–7.
- Hao, J., Qiu S., & Li H., (2012). Roles of hydroxyl radicals in electrolyzed oxidizing water (EOW) for the inactivation of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 155(3):99–104.
- Hardy, K. J., Oppenheim, B. A., Gossain, S., Gao, F., & Hawkey, P. M. (2006). A Study of the Relationship Between Environmental Contamination with Methicillin-

- Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) and Patients' Acquisition of MRSA. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. February, Vol. 27 No. 2.
- Heal, R. M., Kumar, P., & Harrison M. (2012). Particles, air quality, policy and health. *Chem Soc Rev* 41:6606–6630. <https://doi.org/10.1039/c2cs35076a>
- Heidemann, A. (1990). Chromosome aberration assay in Chinese Hamster V79 cells in vitro with FAT 80 ' 023/Q. *Cytotest Cell Res.*; CCR project 179100.
- Herman, C.K., Hess, J., & Cerra, C. (2015). Dilute hydrogen peroxide technology for reduction of microbial colonization in the hospital setting. *Am J Infect Control.*;43:S25S26.
- Hiemstra, P. S., Grootaers, G., van der Does, A. M., Krul, C. A. M., & Kooter, I. M. (2018). Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicology in Vitro*, 47(September 2017), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.005>.
- Hoffman, P.N., Williams, J., Stacey, A., Bennett, A.M., Ridgway, G.L., Dobson, C., Fraser, I., & Humphreys, H. (2002). Microbiological Commissioning and Monitoring of Operating Theatre Suites. *J. Hosp. Infect.*, 52, 1–28.
- Hsu, S.Y., Kim, C., & Hung, Y.C. (2005). Effect of spraying on chemical properties and bactericidal efficacy of electrolysed oxidizing water. *Int J Food Sci Technol* 39:157–165.
- Huang, Y. R., Hung, Y. C., Hsu, S. Y., Huang, Y. W., & Hwang D. F. (2008). Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19(4):329–45. *J Food Eng* 78(4):1326–32.
- Iacopetta, D., Catalano, A., Ceramella, J., Saturnino, C., Salvagno, L., Ielo, I., Drommi, D., Scali, E., Plutino, M.R. & Rosace, G. (2021). The Different Facets of Triclocarban: A Review. *Molecules* 26, 2811.
- Iyer, P.A., Xue, J., Honda, M., Robinson, M., Kumosami, A.T., Abulnaja, K. & Kannan, K. (2018). Urinary levels of triclosan and triclocarban in several Asian countries, Greece and the USA: Association with oxidative stress. *Environ. Res.* 106, 91–96.
- Jana, S. & Deb, J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 140.
- Jeong, C.-H., & Joo, S. H. (2016). Downregulation of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. *Journal of Cancer Prevention*, 21(1), 13–20. <https://doi.org/10.15430/jcp.2016.21.1.13>.
- Johns, C.K. (1934). Germicidal power of sodium hypochlorite, *Ind. Eng. Chem.*, 26, 787–788, 1934.
- Kan, D., London J., Chen H., Zhang H., Song X., Zhao Q., Jiang L., & Chen H. (2007). Differentiating the effects of fine and coarse particles on daily mortality in Shanghai, China. *Environ Int* 33(3): 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.12.001>.
- Keith, H. (1982). Particle size studies on tobacco smoke. *Beitr Tabakforsch* 11 (3): 123–131. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0506>.
- Kim, C., Hung, Y. C. & Brackett, R. E. (2000a). Roles of oxidation reduction potential (ORP) in electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *J. Food Prot.* 63:19-24.
- Kim, J. S., Kim, H. S., Park, J. Y., Koo, H. S., Choi, C. S., Song, W., & Lee, K. M. (2012). Contamination of X-ray cassettes with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in a radiology department. *Annals of Laboratory Medicine*, 32(3), 206–209. <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.3.206>.

- Kim, J.H., Kim, D., Moon, S.M. (2020). Yang, E.J. Associations of lifestyle factors with phthalate metabolites, bisphenol A, parabens, and triclosan concentrations in breast milk of Korean mothers. *Chemosphere* 249, 126149.
- Kim, K.H., Kabir, E., & Jahan, S.A. (2018). Airborne Bioaerosols and Their Impact on Human Health. *J. Environ. Sci.*, 67, 23–35.
- Kittelson, B. (1998). Engines and nanoparticles: a review. *J Aerosol Sci* 29(5–6):575–588. [https://doi.org/10.1016/S0021-8502\(97\)10037-4](https://doi.org/10.1016/S0021-8502(97)10037-4).
- Klein, M., DeForest, A. (1963). The inactivation of viruses by germicides. *Chem. Specialists Manuf. Assoc. Proc.*;49:116-8.
- Knasmüller, S., Zöhrer, E., Kronberg, L., Kundi, M., Franzén, R., & Schulte-Hermann, R. (1996). Mutational Spectra of Salmonella typhimurium Revertants Induced by Chlorohydroxyfuranones, Byproducts of Chlorine Disinfection of Drinking Water. *Chemical Research in Toxicology*, 9(2), 374–381. <https://doi.org/10.1021/tx9500686>
- Koseki, S., Yoshida, K., Isobe, S., & Itoh, K. (2001). Decontamination of lettuce using acidic electrolyzed water. *J. Food Prot.* 64:652-658.
- Kotewicz, M. L., Brown, E. W., LeClerc, J. E., & Cebula, T.A. (2003). Genomic variability among enteric pathogens: The case of the mutS-rpoS intergenic region. *Trends Microbiol.*, 11, 2.
- Kowalski, W. (2010). *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for Air and Surface Disinfection*, Springer science & business media, 2010.
- Landa-Solis, C., González-Espinosa, D., Guzmán-Soriano, B., Snyder, M., Reyes-Terán, G., Torres, K., & Gutierrez, A. A. (2005). Microcyn<sup>TM</sup>: A novel super-oxidized water with neutral pH and disinfectant activity. *Journal of Hospital Infection*, 61(4), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.04.021>
- Landrin, A., Bissery, A., & Kac, G. (2005). Monitoring Air Sampling in Operating Theatres: Can Particle Counting Replace Microbiological Sampling? *J. Hosp. Infect.*, 61, 27–29.
- Lankford, G. M., Collins, S., Youngberg, L., Rooney, D. M., Warren, J. R., & Noskin, G. A., (2006). Assessment of Materials Commonly Used in Healthcare: Implications for survival and transmission. *Am J Infect Control* ;34:258-63.
- Lavorgna, M., Russo C., D'Abrosca B., Parrella A., & Isidori M. (2016). Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* as model systems. *Environ. Pollut. Mar.*:210:34-9.
- Lawless, P. A. (1996). Particle Charging Bounds, Symmetry Relations, and an Analytic Charging Rate Model for the Continuum Regime. *Journal of Aerosol Science*, 27(2), 191–215.
- Ledder, R. G., Gilbert, P., Willis, C., & McBain, A. J. (2006). Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 1132.
- Lelieveld, J., Evans, S., Fnais, M., Giannadaki ,D., & Pozzer A. (2015) The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. *Nature* 525, 367. <https://doi.org/10.1038/nature15371>.
- Len, S. V., Hung, Y. C., Chung, D., Anderson, J. L., Erickson, M. C., & Morita, K. (2002). Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *J. Agric. Food. Chem.* 50:209-212.

- Len, S. V., Hung, Y. C., Erickson, M., & Kim, C. (2000). Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *J. Food Prot.* 63:1534-1537.
- Li, W., Shao, L., Zhang, D., Ro, C.U., Hu, M., Bi, X., Geng, H., Matsuki, A., Niu, H. & Chen, J. (2016a). A review of single aerosol particle studies in the atmosphere of East Asia: Morphology, mixing state, source, and heterogeneous reactions. *J. Cleaner Prod.* 112: 1330–1349.
- Li, W., Zhang, W., Chang, M., Ren, J., Xie, W., Chen, H., Zhang, Z., Zhuang, X., Shen, G. & Li, H. (2018). Metabonomics reveals that triclocarban affects liver metabolism by affecting glucose metabolism,  $\beta$ -oxidation of fatty acids, and the TCA cycle in male mice. *Toxicol. Lett.* 299, 76–85.
- Liao, L. B., Chen, W. M., & Xiao, X. M. (2007). The generation and inactivation mechanism of oxidation–reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *J Food Eng* 78(4):1326–32.
- Liscynsky, C., Hines, L. P., Smyer, J., Hanrahan, M., Orellana, R.C., & Mangino, J.E. (2017). The effect of ultraviolet light on *Clostridium difficile* spore recovery versus bleach alone. *Infect Control Hosp Epidemiol.*;38(9):1116–7.
- Liu, B. Y. H., & Pui, D. Y. H. (1974). Electrical neutralization of aerosols. *Journal of Aerosol Science*, 5(5), 465–472. [https://doi.org/10.1016/0021-8502\(74\)90086-X](https://doi.org/10.1016/0021-8502(74)90086-X)
- Martinez, J. A., Ruthazer, R., Hansjosten, K., Barefoot, L., & Snyderman, D.R. (2003). Role of Environmental Contamination as a Risk Factor for Acquisition of Vancomycin-Resistant Enterococci in Patients Treated in a Medical Intensive Care Unit. *Arch Intern Med*,163:1905-12 *Arch Intern Med* 2003;163:1905-12.
- McBain, A. J., Ledder, R. G., Moore, L. E., Catrenich, C. E., & Gilbert, P. (2004) Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3449.
- McCarthy, S. & Burkhardt Iii, W. (2012). Efficacy of Electrolyzed Oxidizing Water Against *Listeria Monocytogenes* and *Morganella Morganii* on Conveyor Belt and Raw Fish Surfaces. *Food Control.* 24: 214–219.
- McCulloch, E.C. & Costigan, S. A. (1936). Comparison of the efficiency of phenol, liquor cresolis, formaldehyde, sodium hypochlorite and sodium hydroxide against *Eberthella typhi* at various temperatures. *J. Infect. Dis.* ;59:281-4.
- McGowan, J. E. Jr. (2006). Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: Multidrug resistance to the maximum. *Am. J. Med.*, 119, S29, discussion S62.
- McMurry, L. M., Oethinger, M., & Levy, S. B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, 394, 531.
- Meakin, N. S., Bowman, C., Lewis, M. R., & Dancer, S. J. (2012). Comparison of cleaning efficacy between in-use disinfectant and electrolysed water in an English residential care home. *Journal of Hospital Infection*, 80(2), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.10.015>
- Meakin, S.M.E., Park, J.H., & Oh, D.H. (2011). The bactericidal and fungicidal effects of salicid on pathogenic organisms involved in hospital infections. *African Journal of Microbiology Research*, 5:2773-2778.
- Méheust, D., Le Cann, P., Reboux, G., Millon, L., & Gangneux, J.-P. (2014). Indoor Fungal Contamination: Health Risks and Measurement Methods in Hospitals, Homes and Workplaces. *Crit. Rev. Microbiol.* 2014, 40, 248–260.
- Meng, X., Ma, J., Chen, J., Zhou, J., Chen, H., & Kan D. (2013). Size-fractionated particle number concentrations and daily mortality in a Chinese city. *Environ Health Perspect* 121:1174–1178. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206398>.

- Mokudai, T., Kanno, T., & Niwano, Y. (2014). Involvement of reactive oxygen species in the cytotoxic effect of acid-electrolyzed water. *The Journal of Toxicological Sciences*, 40(1), 13–19. <https://doi.org/10.2131/jts.40.13>
- Müllejjans, H. (1966). Über die Ähnlichkeit der nichtisothermen Strömung und den Wärmeübergang in Räumen mit Strahlhlüftung. In *Über die Ähnlichkeit der nichtisothermen Strömung und den Wärmeübergang in Räumen mit Strahlhlüftung* (pp. 24–31). Wiesbaden: VS Verlag für Sozialwissenschaften. [https://doi.org/10.1007/978-3-663-05128-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-663-05128-2_1)
- Murphy, R.R., Gandudi, V.B., Amin, T. Clendenin, A. & Moats, J. (2022). An analysis of international use of robots for COVID-19, *Robot. Auton. Syst.* 148 103922.
- Napoli, C., Marcotrigiano, V., & Montagna, M.T. (2012). Air Sampling Procedures to Evaluate Microbial Contamination: A Comparison between Active and Passive Methods in Operating Theatres. *BMC Public Health*, 12, 594.
- Nikitin, B.A., Vinnik, L.A. (1965). Presurgical preparation of surgeons' hands with the products of electrolysis of a 3per cent solution of sodium chloride. *Khirurgiia (Sofia)* 41:104–105.
- Occupational Health and Safety Administration. (2002). OSHA Fact Sheet: Formaldehyde: Occupational Safety and Health Administration, U.S. Department of Labor.
- Occupational Safety and Health Administration. (1993). Air Contaminants Final Rule. *Fed. Regist.*;58:35338-51.
- Okubo, K., Urakami, H., & Tamura, A. (2014). Cytotoxicity and Microbicidal Activity of Electrolyzed Strong Acid Water and Acidic Hypochlorite Solution under Isotonic Conditions. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 73(10), 1025–1031. <https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.73.1025>
- Park, H., Hung, Y. C., & Chung, D. (2004). Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 91(1):13–8.
- Pasquarella, C., Pitzurra, O., & Savino, A. (2000). The Index of Microbial Air Contamination. *J. Hosp. Infect.* 2000, 46, 241–256.
- Pasquarella, C., Vitali, P., Saccani, E., Manotti, P., Boccuni, C., Ugolotti, M., Signorelli, C., Mariotti, F., Sansebastiano, G.E., & Albertini, R. (2012). Microbial Air Monitoring in Operating Theatres: Experience at the University Hospital of Parma. *J. Hosp. Infect.*, 81, 50–57.
- Pérez, P., Fernández, E., Beiras, R. (2009). Toxicity of Benzalkonium Chloride on Monoalgal Cultures and Natural Assemblages of Marine Phytoplankton. *Water, Air and Soil Pollution*. 201:319-330.
- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19, 382.
- Pintaric, R., Matela, J., & Pintaric, S. (2015). Suitability of electrolyzed oxidizing water for the disinfection of hard surfaces and equipment in radiology. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0160-8>
- Pintaric, R., Matela, J., Pintaric, S., Novak, M., & Filipic, M. (2021). Evaluation of potential toxicity of Steriplant<sup>®</sup>N aerosolization toward human alveolar cells A459 in vitro. *Toxicology and industrial Health*: 9:37-45. <https://doi.org/10.1177/07482337211031681>.

- Pintaric, R., Matela, J., Vadjnal, S., & Pintaric, S. (2011). The use of neutral electrolyzed oxidizing water for disinfection of 3.0T MRI scanner. Congress: ECR 2011. Poster Number: C-0810. DOI:10.1594/ecr2011/C-0810.
- Pomati, F., Castiglioni, S., & Zuccato, E. (2006). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 2442, 2006.
- Pycke, G.F.B., Geer, A.L., Dalloul, M., Abulafia, O., Jenck, M.A. & Halden, U.R. (2014). Human fetal exposure to triclosan and triclocarban in an urban population from Brooklyn, New York. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 8831–8838.
- Rahman, M., Joong, H. P., & Deog Hwan, O. (2016). The bactericidal and fungicidal effects of salicid on pathogenic organisms involved in hospital infections. *African Journal of Microbiology Research*, 5(18), 2773–2778. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.621>
- Rahman, S. M. E, Park, J. H, & Oh, D. H. (2011). The bactericidal and fungicidal effects of salicid on pathogenic organisms involved in hospital infections. *African Journal of Microbiology Research*; 5:2773-2778.
- Rahman, S. M. E., Ding, T., & Oh, D. H. (2010a). Effectiveness of low concentration electrolyzed water to inactivate foodborne pathogens under different environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 139(3):147–53.
- Ramirez, M., Matheu, L., & Gomez, M. (2021). Effectiveness of dry hydrogen peroxide on reducing environmental microbial bioburden risk in a pediatric oncology intensive care unit. *Am J Infect Control.*;49:608–613.
- Ramli, M.F., Hussin, A.S., & Yusoff, A. (2009). EBSCOhost | 44196649 | Microbial Contamination of Dental Radiology Equipment. Retrieved May 20, 2019, from <https://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=13412051&AN=44196649&h=N0rELjHI%2BOZPrpOK0nkF3MpICvy%2FN7jYXqLwqKRrmFzfdhBdw7MTS3O5kDDbfxe5P2y98OGysUSKPw9NLZAIa%3D%3D&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocalresistance>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 140.
- Rideal, E. K., & Evans, U.R. (1921). The effect of alkalinity on the use of hypochlorites, *J. Soc. Chem. Ind.*, 40, 64R–66R.
- Rosenberg, N. (2000). Asthme professionnel dû aux désinfectants employés en milieu hospitalier. Documents pour le médecin du travail, 2000, 84. TR 26.
- Rubbo, S.D., Gardner, J.F & Webb, R.L. (1967). Biocidal activities of glutaraldehyde and related compounds. *J. Appl. Bacteriol.* ;30:78-87.
- Rutala, W.A., & Weber, D.J. (2019). Best practices for disinfection of noncritical environmental surfaces and equipment in health care facilities: a bundle approach. *Am J Infect Control.*; 47S:A96–A105.
- Rutala, W.A., Weber, D.J. & Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). (2024). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. Update: June, 2024.
- Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F et al., (2010) Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 26, pp. 203-216.
- Sakagami, Y., Yamazaki, H., Ogasawara, N., Yokoyama, H., Ose, Y., & Sato, T. (1988) The evaluation of genotoxic activities of disinfectants and their metabolites byumu test. *Mutat. Res.*, 209, 155.

- Salgado, C. D., & Farr, B. M. (2006). What proportion of hospital patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are identified by clinical microbiology cultures? , *ICHE Infect Control Hosp Epidemiol*;27:116-21.
- Sandle, T. (2022). *EU GMP Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products*; European Commission: Brussels, Belgium, 2022.
- Sanguinet, J., & Edmiston, C. (2021). Evaluation of dry hydrogen peroxide in reducing microbial bioburden in a healthcare facility. *Am J Infect Control*.;49:985–990.
- Santarpia, J.L., Klug, E., Ravnholdt, A., & Kinahan, S.M. (2023). Environmental sampling for disease surveillance: Recent advances and recommendations for best practice. *J. Air Waste Manag. Assoc.*, 73, 434–461.
- Scanlon, T., & Murray, J. (2006). MRSA Detection in the Radiology Department, code LL-HS4369-L04, presented at the RSNA meeting.
- Shelly, M. J., Scanlon, T. G., Ruddy, R., Hannan, M. M., & Murray, J. G. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) environmental contamination in a radiology department. *Clin Radiol*; 66:861-4.
- Sheltmire, W.H. (1962). Chlorinated bleaches and sanitizing agents, Chlorine: Its Manufacture, Uses and Properties, Sconce, J.S. (ed.), Reinhold Publishing Corporation, New York, chapter 17, pp. 512–542.
- Shrestha, P., Zhang, Y., Chen, W.J. & Wong, T.Y. (2020). Triclosan: Antimicrobial mechanisms, antibiotics interactions, clinical applications, and human health. *J. Environ. Sci. Health C Toxicol. Carcinog.* 38, 245–268.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J., & Lenski, R. E. (1997). Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*, *Nature*, 387, 703–705, 1997. Comment in: *Nature*, 387, 659, 661.
- Springthorpe, S., Nokhbeh, R., & Sattar, S.A. (2006). Acquisition of antibiotic resistance in bacteria exposed to disinfectant in drinking water distribution system biofilms. Presented at International Symposium on Microbial Ecology, Vienna, August 21–25.
- Squeri, R., Genovese, C., Trimarchi, G., Antonuccio, G.M., Alessi, V., Squeri, A., & La Fauci, V. (2019). Nine Years of Microbiological Air Monitoring in the Operating Theatres of a University Hospital in Southern Italy. *Ann. Ig.*, 31, 1–12.
- Standard ISO 14644-1:2015; *Cleanrooms and Associated Controlled Environments, Part 1: Classification of Air Cleanliness by Particle Concentration*. International Organization for Standardization: London, UK, 2023.
- Standard ISO 14698-1; *Cleanrooms and Associated Controlled Environments–Biocontamination Control, Part 1: General Principles and Methods*. International Organization for Standardization: London, UK, 2003.
- Stevenson, S., Cook, S., Bach, S., & McAllister, T. (2004). Effects of water source, dilution, storage, and bacterial and fecal loads on the efficacy of electrolyzed oxidizing water for the control of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Protect* 67(7):1377–83.
- Tian, X., Huang, K., Liu, Y., Jiang, K., Liu, R., Cui, J., Wang, F., Yu, Y., Zhang, H. & Lin, M. (2023). Distribution of phthalate metabolites, benzophenone-type ultraviolet filters, parabens, triclosan and triclocarban in paired human hair, nail and urine samples. *Environ. Pollut.* 333, 122083.
- Tkhawkho, L., Jackson, K., & Nitzan, P. (2017). Destruction of *clostridium difficile* spores colitis using acidic electrolyzed water. *Am J Infect Control* 45(1):1053.

- Tolabi, Z., Alimohammadi, M., Hassanvand, M.S., Nabizadeh, R., Soleimani, H., & Zarei, A. (2019). The Investigation of Type and Concentration of Bio-Aerosols in the Air of Surgical Rooms: A Case Study in Shariati Hospital, Karaj. *MethodsX*, 6, 641–650.
- Toms, L.M.L., Allmyr, M., Mueller, J.F., Adolfsson-Erici, M., McLachlan, M., Murby, J. & Harden, F.A. (2011). Triclosan in individual human milk samples from Australia. *Chemosphere* 85, 1682–1686.
- Viani, I., Colucci, M.E., Pergreffi, M., Rossi, D., Veronesi, L., Bizzarro, A., Capobianco, E., Affanni, P., Zoni, R., & Saccani, E. (2020). Passive Air Sampling: The Use of the Index of Microbial Air Contamination. *Acta Bio Medica Atenei Parm.*, 91, 92.
- Vorobjeva, N. V., Vorobjeva, L. I., & Khodjaev, E. Y. (2004). The Bactericidal Effects of Electrolyzed Oxidizing Water on Bacterial Strains Involved in Hospital Infections. *Artificial Organs*, 28(6), 590–592. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2004.07293.x>
- Weber, D.J., Rutala, W.A., Anderson, D.J., Chen, L.F., Sickbert-Bennett, E.E., & Boyce, J.M. (2016). Effectiveness of ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems for terminal room decontamination: focus on clinical trials. *Am J Infect Control*. 2016;44(Suppl 5): e77–e84.
- Wei, L., Qiao, P., Shi, Y., Ruan, Y., Yin, J., Wu, Q. & Shao, B. (2017). Triclosan/triclocarban levels in maternal and umbilical blood samples and their association with fetal malformation. *Clin. Chim. Acta* 2017, 466, 133–137.
- Whitby, M., McLaws, M. L., & Berry, G. (2001). The risk of death from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med J Aust* 2001; 175: 264-267.
- White, W., & Martin, G. (2010). Chlorine gas inhalation: human clinical evidence of toxicity and experience in animal models. *Proc Am Thorac Soc* 7: 257–263. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-008sm>.
- Wong, T., Woznow, T., Petrie, M., Murzello, E., Muniak, A., & Kadora, A. (2016). Postdischarge decontamination of MRSA, VRE, and *Clostridium difficile* isolation rooms using 2 commercially available automated ultraviolet-C- emitting devices. *Am J Infect Control*.;44(4):416–20.
- Wu, G., Yu, X., & Gu, Z. (2008). Ultrasonically nebulised electrolysed oxidising water: a promising new infection control programme for impressions, metals and gypsum casts used in dental hospitals. *The Journal of Hospital Infection*, 68(4), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.01.024>
- Wu, Y., Sheng, T. (2010). Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens, *J. Microbiol., Immunol. Infect.* 52 (3) (2010) 487–493.
- Yang, J.H., Wu, U.I., Tai, H.M., & Sheng, W.H. (2019). Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens. *J Microbiol Immunol Infect.*;52(3):487–93.
- Yin, J., Wei, L., Shi, Y., Zhang, J., Wu, Q. & Shao, B. (2016). Chinese population exposure to triclosan and triclocarban as measured via human urine and nails. *Environ. Geochem. Health* 38, 1125–1135.
- Zeiger, E., Gollapudi, B., & Spencer, P. (2005). Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—a review. *Mutat. Res.*, 589, 136.

- Zhang, E., & Burbridge, B. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Implications for the Radiology Department. *American Journal of Roentgenology*, 197(5), 1155–1159. <https://doi.org/10.2214/AJR.11.6584>
- Zhang, H., Li, J., An, Y., Wang, D., Zhao, J., Zhan, M., Xu, W., Lu, L. & Gao, Y. (2022). Concentrations of bisphenols, benzophenone-type ultraviolet filters, triclosan, and triclocarban in the paired urine and blood samples from young adults: Partitioning between urine and blood. *Chemosphere*, 288, 132563.
- Zhang, J. S., G. J. Wu, & L. L. Christiansons, R. T. (1993). NRC Publications Archive Archives des publications du CNRC A new similitude modeling technique for studies of nonisothermal room ventilation flows room ventilation flow s RNRCC-36141.



# Bibliografija

## Objave v povezavi z delom

### Članki v revijah

- Pintarič, R., Matela, J., Pintarič, Š., Novak, M., & Filipič, M. (2021). Evaluation of potential toxicity of Steriplant<sup>®</sup>N aerosolization toward human alveolar cells A459 in vitro. *Toxicology and industrial health*. [v tisku][str. 1-8], ilustr. ISSN 1477-0393. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/07482337211031681>, <https://doi.org/10.1177/07482337211031681>, DOI: 10.1177/07482337211031681. [COBISS.SI-ID 72837123], [JCR, SNIP, WoS, Scopus]
- Pintarič, R., Matela, J., Pintarič, Š., & Grebenc, S. (2015). Use of OPTI-JET CS MD1 MR device for biocide aerosolisation in 3T magnetic resonance. <http://waset.org/publications/10003572/use-of-opti-jet-cs-md1mr-device-for-biocide-aerosolisation-in-3t-magnetic-resonance>. [COBISS.SI-ID 4183930]
- Pintarič, R. (2015). Aerosolizator OPTI-JET CS MD1MR a new device for biocide aerosolisation in magnetic resonance. *Global journal of engineering science and research management*. vol. 2, issue 7, str. 111-117. ISSN 2349-4506. <http://www.gjesrm.com/Issues%20PDF/Archive-2015/July/12.pdf>. [COBISS.SI-ID 5462335]
- Pintarič, R., Matela, J., & Pintarič, Š. (2015). Suitability of electrolyzed oxidizing water for the disinfection of hard surfaces and equipment in radiology. *Journal of environmental health science & engineering*. [vol.] 13, 6, str. [1-6], ilustr. ISSN 2052-336X. <http://www.ijehse.com/content/pdf/s40201-015-0160-8.pdf>, DOI: 10.1186/s40201-015-0160-8. [COBISS.SI-ID 5250111], [JCR, SNIP, WoS do 28. 8. 2021: št. citatov (TC): 10, čistih citatov (CI): 9, čistih citatov na avtorja (CIAu): 3,00, Scopus do 1. 9. 2021: št. citatov (TC): 12, čistih citatov (CI): 11, čistih citatov na avtorja (CIAu): 3,67]
- Pintarič, R., Matela, J., & Pintarič, Š. (2015). The use of neutral electrolyzed oxidizing water for disinfection of 3.0T MRI scanner. *SM Journal of public health and epidemiology*. vol. 1, no. 1, str. [1]-3, article no. 1003. <http://smjournals.com/index.php/public-health-epidemiology/article/download/62/18>. [COBISS.SI-ID 5416511]

### Prispevek na konferenci

- Pintarič, R., Matela, J., Grebenc, S., & Pintarič, Š. (2012). Upotreba neutralne elektrolizirane oksidirajuće vode za dezinfekciju diagnostičke opreme = The use of neutral electrolyzed oxidizing water for disinfection of diagnostic equipment. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). *Zbornik radova. XXIII savetovanje Dezinfekcija, dezinskcija i deratizacija sa međunarodnim učesćem - Jedan svet jedno*

- zdravlje - Fruška gora, 24.-27.maj 2012. god. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2012. Str. 67-72. ISBN 978-86-81043-62-2. [COBISS.SI-ID 3536506]
- Pintarič, Š., Grebenc, S., Janković, L., Kustura, A., & Pintarič, R. (2019). Biodezinfekcija in bolnišnične okužbe. V: KRULEC, Aleš (ur.), TAJNIKAR, Sara (ur.). Book of articles = Zbornik prispevkov. Ljubljana: Inštitut za sanitarno inženirstvo: = Institute of Public and Environmental Health, 2019. Str. 64-70. ISBN 978-961-94556-4-7. [COBISS.SI-ID 15963395]
- Pintarič, Š., Levstek, P., Dovč, A., Grebenc, S., & Pintarič, R. (2015). Efikasnost uobičajenih postupaka dezinfekcije kod niskih temperatura. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). Jedan svet jedno zdravlje : zbornik radova. XXVI savetovanje Dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija sa međunarodnim učešćem - Jedan svet jedno zdravlje, Novi Bečej, 28.-31. maja 2015 god. Beograd: Srpsko veterinarsko društvo, 2015. Str. 89-94. ISBN 978-86-83115-27-3. [COBISS.SI-ID 3997306]
- Pintarič, Š., Pintarič, R., & Janković, L. (2014). Pranje muzne opreme sa enzimskim deterđentima. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). Jedan svet jedno zdravlje : zbornik radova. XXV savetovanje Dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija sa međunarodnim učešćem - Jedan svet jedno zdravlje, Kovačica, 29. maja - 1. juna 2014 god. Beograd: Srpsko veterinarsko društvo, 2014. Str. 79-84. ISBN 978-86-81043-87-5. [COBISS.SI-ID 3882874]
- Pintarič, R., Pintarič, Š., & Matela, J. (2014). Uloga zračnih sustava kod endovaskularnog liječenja i korištenje neutralne elektrooksidirajuće vode (EOW) za dezinfekciju diagnostičnih sala. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). Jedan svet jedno zdravlje : zbornik radova. XXV savetovanje Dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija sa međunarodnim učešćem - Jedan svet jedno zdravlje, Kovačica, 29. maja - 1. juna 2014 god. Beograd: Srpsko veterinarsko društvo, 2014. Str. 71-77. ISBN 978-86-81043-87-5. [COBISS.SI-ID 3882618]
- Pintarič, Š., Levstek, P., Pintarič, R., Kustura, A., & Grebenc, S. (2012). Disinfection and importance of material quality. V: HRISTOV, Slavča (ur.). [Proceedings of] The First International Symposium on Animal Science, November 8-10th 2012, Belgrade, Serbia. Belgrade: University of Belgrade, Faculty of Agriculture, 2012. Str. 820-826. ISBN 978-86-7834-166-3. [COBISS.SI-ID 3614074]
- Pintarič, Š., Dobeic, M., Pintarič, R., Janković, L., Radenković-Damjanović, B., & Grebenc, S. (2012). New group of biocide in livestock productions. V: HRISTOV, Slavča (ur.). [Proceedings of] The First International Symposium on Animal Science, November 8-10th 2012, Belgrade, Serbia. Belgrade: University of Belgrade, Faculty of Agriculture, 2012. Str. 809-813. ISBN 978-86-7834-166-3. [COBISS.SI-ID 3613818]
- Pintarič, Š., Dobeic, M., Pintarič, R., & Grebenc, S. (2012). The new sampling methodology for determining the presence of microorganisms in air. V: HRISTOV, Slavča (ur.). [Proceedings of] The First International Symposium on Animal Science, November 8-10th 2012, Belgrade, Serbia. Belgrade: University of Belgrade, Faculty of Agriculture, 2012. Str. 769-772. ISBN 978-86-7834-166-3. [COBISS.SI-ID 3613562]
- Pintarič, R., Matela, J., Grebenc, S., Koprivnikar, J., & Pintarič, Štefan. (2011). The use of neutral electrolyzed oxidizing water for disinfection of diagnostic equipment. V: Animal protection and welfare 2011 = Ochrana zvířat a welfare 2011 : proceedings = sborník příspěvků. Brno: University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2011. Str. 130-134. ISBN 978-80-7305-587-5. [COBISS.SI-ID 3467642]
- Pintarič, Š., Levstek, P., Grebenc, S., Pintarič, R., & Dolenc, B. Quality materials in disinfection of vehicles at the outbreak of contagious diseases. V: Animal protection and welfare 2011 = Ochrana zvířat a welfare 2011 : proceedings = sborník příspěvků.

- Brno: University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno: Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno, 2011. Str. 135-139. ISBN 978-80-7305-587-5. [COBISS.SI-ID 3468410]
- Pintarič, R., Matela, J., Grebenc, S., & Pintarič, Š. (2011). The use of neutral electrolyzed oxidizing water for disinfection of 3.0T MRI scanner. V: European Society of Radiology. Vienna: European Society of Radiology. 2011, str. 1-12 (1 pdf datoteka). [http://posterng.netkey.at/esr/online\\_viewing/index.php?module=view\\_postersection&task=viewsection&si=1045](http://posterng.netkey.at/esr/online_viewing/index.php?module=view_postersection&task=viewsection&si=1045), DOI: 10.1594/ecr2011/C-0810. [COBISS.SI-ID 3877439]
- Pintarič, Š., Koprivnikar, J., Dobeic, M., Pintarič, R., Radenković-Damjanović, B., & Janković, L. (2011). Elektrolizirana oksidirajuća voda - biocid nove generacije. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). Program in zbornik referatov. Slovenian veterinary research. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011. Vol. 48, suppl. 13, str. 378-380. Slovenian veterinary research, Supplement, 13. ISBN 978-961-6199-54-4. ISSN 1580-4003. [COBISS.SI-ID 3446650], [JCR, SNIP, Scopus]
- Pintarič, Š., Koprivnikar, J., & Pintarič R. (2011). Mogućnost primjene elektrooksigenirane vode kao dezinficiensa u preventivnoj dezinfekciji i kod suzbijanja zaraznih bolesti. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). Zbornik radova. XXII Savetovanje Dezinfekcija, dezinskcija i deratizacija u zaštiti zdravlja životinja i ljudi sa međunarodnim učešćem, Kaštel-Ečka, 26. - 29. maj 2011. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2011. Str. 103-112. ISBN 978-86-85165-11-5. [COBISS.SI-ID 3360378]
- Levstek, P., Pintarič, Š., Pintarič, R., Janković, L. (2014). Sprečavanje širenja aviarne influencije. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). Jedan svet jedno zdravlje : zbornik radova. XXV savetovanje Dezinfekcija, dezinskcija i deratizacija sa međunarodnim učešćem - Jedan svet jedno zdravlje, Kovačica, 29. maja - 1. juna 2014 god. Beograd: Srpsko veterinarsko društvo, 2014. Str. 151-161. ISBN 978-86-81043-87-5. [COBISS.SI-ID 3883130]
- Kobal, S., Pintarič, R., Matela, J., Pintarič, Š., (2013). Janković, L. Biocidi u savremenoj hirurgiji = Biocides in modern surgerie!. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). Jedan svet jedno zdravlje : zbornik radova. XXIV savetovanje Dezinfekcija, dezinskcija i deratizacija sa međunarodnim učešćem - Jedan svet jedno zdravlje, Kosmaj, 23.-26. maj 2013. god. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2013. Str. 45-50. ISBN 978-86-81043-69-1. [COBISS.SI-ID 3680890]
- Pintarič, Š., Pintarič, R., Dovč, A., Grebenc, S., & Janković, L. (2013). Biosigurnost u peradarstvu sa upotrebom elektrolizirajuće vode kao biocida nove generacije = Biosecurity in poultry production with the use of oxidizing electrolyzing water as biocides new generation. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). Jedan svet jedno zdravlje : zbornik radova. XXIV savetovanje Dezinfekcija, dezinskcija i deratizacija sa međunarodnim učešćem - Jedan svet jedno zdravlje, Kosmaj, 23.-26. maj 2013. god. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2013. Str. 51-56. ISBN 978-86-81043-69-1.[COBISS.SI-ID 3681146]
- Pintarič, R., Matela, J., & Pintarič, Š. (2015). Suitability of electrolyzed oxidizing water for the disinfection of hard surfaces and equipment in radiology. Journal of bioengineering & biomedical science. 2015, vol. 5, issue 1, str. 73. ISSN 2155-9538. [COBISS.SI-ID 5381951]
- Pintarič, R., & Pintarič, Š. (2015). Suitability of electrolyzed oxidizing water for the disinfection of hard surfaces and equipment in radiology. Journal of infectious disease and therapy. 2015, vol. 3, issue 4, [1] str. ISSN 2332-0877. [http://www.esciencecentral.org/journals/2332-0877/2332-0877.S1.003\\_035.pdf](http://www.esciencecentral.org/journals/2332-0877/2332-0877.S1.003_035.pdf), DOI: 10.4172/2332-0877.S1.003. [COBISS.SI-ID 5467455]

- Pintarič, R., Matela, J., & Pintarič, Š. (2015). Biocide aerosolisation a new method for disinfection of radiology department. V: Semmelweis CEE Conference on Hospital Hygiene and Patient Safety 2015, 03.-04. März 2015. [Wien: Semmelweis. 2015, str. 1-10, ilustr. [http://semmelweis.info/wp-content/uploads/2015/03/Robert-Pintaric\\_Poster.pdf](http://semmelweis.info/wp-content/uploads/2015/03/Robert-Pintaric_Poster.pdf). [COBISS.SI-ID 5290047]
- Pintarič, R., Matela, J., & Pintarič, Š. (2014). Biocide aerosolisation : a new method for disinfection of radiology department. *Insights into imaging*. Mar. 2014, vol. 5, suppl. 1, str. s364. ISSN 1869-4101. <http://link.springer.com/journal/13244/5/1/suppl/page/1>. [COBISS.SI-ID 4956479], [SNIP]
- Pintarič, R., Matela, J., Pintarič, Š., & Grebenc, S. (2012). Use of nanopartical methodology of neutral electrolyzed oxidizing water for radiology equipment disinfecton. V: DEBENAK, Primož (ur.). *Zbornik predavanj*. Maribor: Radiološko društvo dr. Mile Kovač: Radiološki oddelek, UKC, 2012. Str. 40. ISBN 978-961-6575-97-3. [COBISS.SI-ID 4534591]
- Pintarič, R., Pintarič, Š., Grebenc, S., Cvetko, D. (2018). Then [i. e ten] years of use steriplant N in medicine and public health. *Journal of infectious diseases & preventive medicine*. Sep. 2018, vol. 6, str. 45. DOI: 10.4172/2329-8731-C1-002. [COBISS.SI-ID 6759999]
- Dovč, A., Tomašič, A., Kobal, S., Pintarič, Š., Levstek, P., & Pintarič, R. (2013). Značaj nanotehnologije u zdravstvenoj zaštiti životinja = Importance of nanotechnology in health care of animals. V: RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). *Zbornik radova i kratkih sadržaja*. 24. Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor, 12.-15. septembar 2013. Beograd: Srpsko veterinarsko društvo, 2013. Str. 17. ISBN 978-86-83115-22-8. [COBISS.SI-ID 3722618]
- Pintarič, R., Matela, J., & Pintarič, Š. (2017). Disinfection of air and surfaces in medicine with aerosolization and use of electro-oxygenated water. V: KUMAR, Prashant (ur.). *Air and noise pollution*. Houston: Studium Press, cop. 2017. Str. [167]-178, ilustr. *Environmental science and engineering*, vol. 3. ISBN 1-62699-091-3, ISBN 1-62699-088-3. [COBISS.SI-ID 6081599]

# Biografija

Avtor je končal srednjo zdravstveno šolo leta 1996 v Rakičanu. Leta 1997 je začel dodiplomski študij na Zdravstveni fakulteti na Oddelku za radiologijo Univerze v Ljubljani in ga zaključil 6.6.2001.

Novembra 2001 je nastopil pripravništvo na Inštitutu za radiologijo UKC Ljubljana, ki ga je zaključil s strokovnim izpitom 26. septembra 2002 kot diplomirani inženir radiologije. Zaposlil se je na Inštitutu za radiologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani na Oddelku za interventno radiologijo.

4. novembra 2002 se je vpisal na podiplomski študij Informatika v zdravstvu in zdravstveni negi na Univerzi v Mariboru na Visoki zdravstveni šoli. Program je zaključil 7. julija 2005 z zagovorom specialističnega dela in pridobil naziv specialist zdravstvene informatike.

3. julija 2005 se je zaposlil na radiološkem oddelku Splošne bolnišnice Maribor. 10. aprila 2013 je zaključil podiplomski študij radiološke tehnologije na Univerzi v Ljubljani na Zdravstveni fakulteti druge stopnje in pridobil naziv magister radiološke tehnologije.

14. 05. 2014 je bil na podlagi pravilnika o raziskovalnih nazivih izvoljen v raziskovalni naziv višjega strokovnega sodelavca UKC Maribor.

Dne 11. 12. 2014 je bil s strani senata Fakultete za zdravstvene vede Univerze v Mariboru imenovan v naziv asistenta za predmetno področje »zdravstvena nega«.

16. aprila 2018 je bil s strani senata Fakultete za zdravstvene vede UKC Maribor ponovno imenovan v naziv asistenta za predmetno področje »zdravstvene vede«. Od leta 2008 je član Zavoda za biotehniške raziskave Obisa Murska Sobota. V letu 2008 je z omenjenim zavodom pričel z razvojem in uporabo površinske aplikacije EOW v zdravstvu.

Leta 2010 je s pomočjo Zavoda za biotehnične raziskave Obisa Murska Sobota v UKC Maribor uvedel prototip aerosolizatorja.

V letu 2012 je začel z osnovnimi tehnološkimi in mikrobiološkimi preiskavami za zagotavljanje pravilnega vzorčenja na površinah in zraku v radioloških prostorih.

Leta 2015 je začel študij na Mednarodni podiplomski šoli smer Ekotehnologija na IJS Ljubljana. Od leta 2015 do 2019 se je udeleževal številnih konferenc kot aktivni avtor na temo »EOW in zdravstvo«.

