

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-359>

УДК 579.832/833:615.47



ОПТИМИЗАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ РЕЖИМОВ ИНАКТИВАЦИИ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* В СРЕДЕ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО CO₂: ЧИСТЫЙ ГАЗ, ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА, НАДУКСУСНАЯ КИСЛОТА

Р.Ш. Гветадзе, М.С. Галстян, Я.Н. Харах[✉], П.Ю. Колесников, Л.Г. Киракосян, М.С. Подпорин, В.Н. Царев, С.Д. Арутюнов

Российский университет медицины, Москва, Россия

Введение. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), продолжают представлять существенную проблему для здравоохранения. Существующие методы стерилизации имеют ограничения по применимости к термочувствительным материалам и могут сопровождаться остаточной токсичностью или повреждением изделий. Стерилизация сверхкритическим диоксидом углерода, особенно в сочетании с окислительными добавками, представляется перспективной альтернативой, способной обеспечить требуемый уровень микробной безопасности при низких температурах и умеренных давлениях. Однако существующие данные демонстрируют значительную вариабельность результатов в зависимости от условий эксперимента, что указывает на необходимость оптимизации и валидации режимов обработки.

Цель. Оптимизация и валидация режимов стерилизации спор *Bacillus subtilis* в эксперименте с использованием сверхкритического диоксида углерода (scCO₂), включая чистый scCO₂, scCO₂ с перекисью водорода (H₂O₂) и scCO₂ с надуксусной кислотой (PAA).

Материалы и методы. Эксперименты проводили с использованием прототипа испытательного стенда для исследования режимов стерилизации. В качестве биологического индикатора использовали *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 NCTC 10400. Исследование включало контаминацию титановых дисков спорами; обработку тремя режимами (чистый scCO₂, scCO₂ + H₂O₂, scCO₂ + PAA); микробиологический анализ с подсчетом выживших спор; статистическую обработку результатов. Для каждого режима были реализованы центральные композиционные планы экспериментов с варьированием температуры, давления и времени экспозиции. Эффективность оценивали по показателю log-reduction жизнеспособных спор, валидационные серии включали по 10 независимых повторов.

Результаты. Газодинамическая обработка чистым scCO₂ в диапазоне 35–60 °C, 70–120 атм, 60–120 мин оказалась неэффективной (максимальный log-reduction ≤ 0,8). Добавление окислителей существенно увеличивало степень инактивации: для режима scCO₂ + H₂O₂ (200 ppm) оптимальные параметры составили 37,9 °C, 120 атм, 30 мин (log-reduction 4,4 ± 0,3; CV = 7,3%); для scCO₂ + PAA (50 ppm) — 45 °C, 94 атм, 10 мин (log-reduction 6,0 ± 0,3; CV = 4,9%), что соответствует требованиям уровня гарантии стерильности (SAL) для медицинских изделий. Режим с PAA обеспечил статистически значимо более высокую эффективность по сравнению с H₂O₂ (t-тест, p < 0,001).

Выводы. Методика стерилизации на основе сверхкритического диоксида углерода с добавлением перекиси водорода или надуксусной кислоты обеспечивает эффективную инактивацию спор *Bacillus subtilis* при параметрах, соответствующих низкотемпературной обработке термочувствительных медицинских материалов, и удовлетворяет современным требованиям к стерильности медицинских изделий.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*; стерилизация термочувствительных медицинских изделий; стерилизация диоксидом углерода; стерилизация надуксусной кислотой; стерилизация перекисью водорода; стерилизация; газовая стерилизация

Для цитирования: Гветадзе Р.Ш., Галстян М.С., Харах Я.Н., Колесников П.Ю., Киракосян Л.Г., Подпорин М.С., Царев В.Н., Арутюнов С.Д. Оптимизация и валидация режимов инактивации спор *Bacillus subtilis* в среде сверхкритического CO₂: чистый газ, перекись водорода, надуксусная кислота. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2026;28(1):134–145. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-359>

Финансирование: исследование выполнено в рамках программы поддержки научных исследований ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России (НПО-0014-Н).

Соответствие принципам этики: одобрение биоэтического комитета не требовалось, поскольку исследование выполнено *in vitro* без участия людей, животных, клинических образцов и использования персональных данных.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Харах Ясер Насерович c.kharakh@gmail.com

Статья поступила: 22.07.2025 **После доработки:** 22.09.2025 **Принята к публикации:** 16.10.2025 **Online first:** 30.10.2025

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF *BACILLUS SUBTILIS* SPORE INACTIVATION REGIMES IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE: PURE GAS, HYDROGEN PEROXIDE, PERACETIC ACID

Ramaz Sh. Gvetadze, Mariam S. Galstyan, Yaser N. Kharakh[✉], Petr Yu. Kolesnikov, Levon G. Kirakosyan, Mikhail S. Podporin, Viktor N. Tsarev, Sergey D. Arutyunov

Russian University of Medicine, Moscow, Russia

Introduction. Healthcare-associated infections (HAIs) continue to pose a significant challenge to public health. The existing sterilization methods possess a number of limitations regarding their applicability to heat-sensitive materials and the possibility of residual toxicity or material damage. Sterilization using supercritical carbon dioxide, particularly in combination with oxidative additives, appears to be a promising alternative capable of providing the required level of microbial safety at low temperatures and moderate pressures. However, the available data show significant variability depending on experimental conditions, indicating the need for optimization and validation of processing regimes.

© Р.Ш. Гветадзе, М.С. Галстян, Я.Н. Харах, П.Ю. Колесников, Л.Г. Киракосян, М.С. Подпорин, В.Н. Царев, С.Д. Арутюнов, 2025

Objective. Optimization and validation of *Bacillus subtilis* spore sterilization regimes in an experiment using supercritical carbon dioxide (scCO₂), including pure scCO₂, scCO₂ with hydrogen peroxide (H₂O₂), and scCO₂ with peracetic acid (PAA).

Materials and methods. Experiments were conducted using a prototype test bench for investigating sterilization regimes. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 NCTC 10400 was used as the biological indicator. The study involved the contamination of titanium discs with spores followed by their treatment under the three regimes (pure scCO₂, scCO₂ + H₂O₂, scCO₂ + PAA). Further, microbiological analysis with enumeration of surviving spores and statistical processing of the results were carried out. For each regime, central composite experimental designs were implemented, varying temperature, pressure, and exposure duration. Efficacy was assessed based on the log-reduction of viable spores. Validation series included 10 independent replicates each.

Results. Gas-dynamic treatment with pure scCO₂ in the range of 35–60°C, 70–120 atm, and 60–120 min proved ineffective (maximum log-reduction ≤ 0.8). The addition of oxidizing agents significantly increased the degree of inactivation: for the scCO₂ + H₂O₂ (200 ppm) regime, the optimal parameters were 37.9°C, 120 atm, 30 min (log-reduction 4.4 ± 0.3; CV = 7.3%); for scCO₂ + PAA (50 ppm) — 45°C, 94 atm, 10 min (log-reduction 6.0 ± 0.3; CV = 4.9%), which meets the requirements for the sterility assurance level (SAL) for medical devices. The PAA regime provided a statistically significant higher efficacy compared to H₂O₂ (*t*-test, *p* < 0.001).

Conclusions. The sterilization methodology based on supercritical carbon dioxide with the addition of hydrogen peroxide or peracetic acid ensures effective inactivation of *Bacillus subtilis* spores under parameters compatible with the low-temperature processing of heat-sensitive medical materials, thus meeting modern sterility requirements for medical devices.

Keywords: *Bacillus subtilis*; sterilization of thermolabile medical devices; carbon dioxide sterilization; peracetic acid sterilization; hydrogen peroxide sterilization; sterilization; gas sterilization

For citation: Gvetadze R.Sh., Galstyan M.S., Kharakh Ya.N., Kolesnikov P.Yu., Kirakosyan L.G., Podporin M.S., Tsarev V.N., Arutyunov S.D. Optimization and validation of *Bacillus subtilis* spore inactivation regimes in supercritical carbon dioxide: Pure gas, hydrogen peroxide, peracetic acid. *Extreme Medicine*. 2026;28(1):134–145. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-359>

Funding: the study was carried out within the framework of the scientific research support program of the Russian University of Medicine (Ministry of Health of Russia) (NPO-0014-N).

Compliance with the ethical principles: an Ethics Committee approval was not required since the study was conducted *in vitro* without involving humans, animals, clinical specimens, or personal data.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Yaser N. Kharakh c.kharakh@gmail.com

Received: 22 July 2025 **Revised:** 22 Sep. 2025 **Accepted:** 16 Oct. 2025 **Online first:** 30 Oct. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), продолжают представлять существенную проблему для здравоохранения. По данным ряда публикаций, поверхности медицинских изделий могут способствовать формированию биопленок и распространению устойчивых патогенов, что осложняет профилактику и лечение ИСМП [1–3]. В ряде работ отмечается, что современные требования к безопасности и биосовместимости изделий способствуют внедрению новых материалов и усложнению конструкции, что может ограничивать применение некоторых традиционных методов стерилизации из-за потенциального риска деградации или остаточной токсичности [2, 4]. Хорошо известные методы стерилизации, такие как автоклавирувание, радиационное и газовое воздействие (например, оксидом этилена), имеют ограничения по применимости к термочувствительным материалам и могут приводить к остаточной токсичности или структурным изменениям изделий [4]. В связи с этим стерилизация с использованием сверхкритического диоксида углерода (scCO₂) рассматривается как перспективная альтернатива благодаря сочетанию эффективности, безопасности и совместимости с современными материалами.

Для снижения риска контаминации изделий важно обеспечивать инактивацию как вегетативных, так и спорообразующих форм бактерий, включая *Bacillus subtilis*, который традиционно используется в качестве модельного тест-организма в исследованиях стерилизации [5–7]. В условиях расширяю-

щихся ограничений по материалам и конструкциям устройств растет интерес к новым низкотемпературным методам, позволяющим совместить эффективность и сохранность функциональных свойств материалов. Как известно, спорообразующие бактерии, особенно *B. subtilis* и *B. Stearothermophilus*, являются наиболее устойчивыми к эрадикации представителями микромира благодаря протективным структурным особенностям их спор, поэтому являются своего рода эталонными маркерами эффективности стерилизации [5, 7].

В ряде экспериментальных работ показано, что использование scCO₂, а также его комбинаций с различными окислителями позволяет эффективно инактивировать споры *B. subtilis* при различных параметрах обработки [5–9]. Авторы большинства публикаций подчеркивают, что предлагаемые режимы стерилизации пока не являются универсальным решением, а существующие данные демонстрируют значительную вариабельность результатов в зависимости от условий эксперимента и используемых протоколов [5–7, 10]. В связи с этим диапазоны поиска параметров для нашего исследования были выбраны на основании анализа литературы и технических ограничений лабораторной установки (максимальное давление 120 атм).

Цель работы — оптимизация и валидация режимов стерилизации спор *Bacillus subtilis* в эксперименте с использованием сверхкритического диоксида углерода (scCO₂), включая чистый scCO₂, scCO₂ с перекисью водорода и scCO₂ с надуксусной кислотой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная установка

Эксперименты проводили с использованием прототипа испытательного стенда для исследования режимов стерилизации (изготовлено в «Сколковском институте науки и технологий», Россия). Установка включала рабочую камеру объемом 1 л из нержавеющей стали AISI 316 с контролем температуры от комнатной до 100 °С и максимальным рабочим давлением 120 атм. Система была оснащена программируемым логическим контроллером (ПЛК) для автоматического управления циклом, дублированным контролем давления (аналоговые манометры и цифровые датчики), а также ПИД-регулятором температуры (ТРМ210). В качестве стерилизующего агента использовали медицинский CO₂. Общая схема установки представлена на рисунке 1.

Биологический индикатор

В качестве биологического индикатора использовали *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 NCTC 10400.

Подготовка культуры и контаминация образцов

Для культивирования использовали питательный агар ГРМ среда № 1 следующего состава: гидролизат казеина (5,00 г/л); дрожжевой экстракт (2,50 г/л); глюкоза (1,00 г/л); агар-агар (9,00 г/л). Посевы инкубировали при температуре 37,1 °С в течение 24 ч.

Инокулюм готовили из суточной агаровой культуры, отбирая четко изолированные колонии и перенося их в стерильный 0,9% раствор натрия хлорида (NaCl) до концентрации, соответствующей 0,5 единицы стандарта мутности по Мак-Фарланду [11]. Контроль плотности взвеси проводили с помощью денситометра DEN-1 (Biosan, Латвия). Инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления.

На поверхность титановых дисков с помощью автоматической микропипетки наносили 100 мкл инокулюма и высушивали до полного высыхания при температуре 20 ± 2 °С в стерильных условиях. Контаминированные диски упаковывали в индивидуальные крафт-пакеты перед газодинамической обработкой (рис. 2А).

Микробиологический анализ

После стерилизации образцы извлекали из крафт-пакетов и помещали в стерильные контейнеры с 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида (NaCl). Смыв проводили встряхиванием в течение 1,5 мин при 1000 об/мин с использованием вортекса V-3.

Смывную жидкость высевали в объеме 200 мкл (для скрининговых экспериментов) или 1000 мкл (для валидации экспериментов с расчетом SAL) на поверхность мясопептонного агара в чашки Петри диаметром 90 мм. Различный объем посева обусловлен методическими требованиями: для скрининговых экспериментов объем 200 мкл обеспечивал достаточную чувствительность при снижении нагрузки на автоматическую систему подсчета Scan 500; для валидационных экспериментов объем 1000 мкл максимизировал чувствительность анализа согласно ГОСТ Р ИСО¹. Жидкость равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем Дригальского. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 ч.

Учет результатов проводили визуально и с использованием автоматической системы подсчета колоний Scan 500 (Interscience, Франция). Для чашек, на которых получен обильный рост, учет выполняли автоматически на системе Scan 500 по методу выделенного поля: задавали область подсчета, после чего система рассчитывала плотность колоний и автоматически пересчитывала результат на всю площадь чашки с приведением к КОЕ/мл с учетом внесенного объема посева. В качестве контроля использовали образцы,

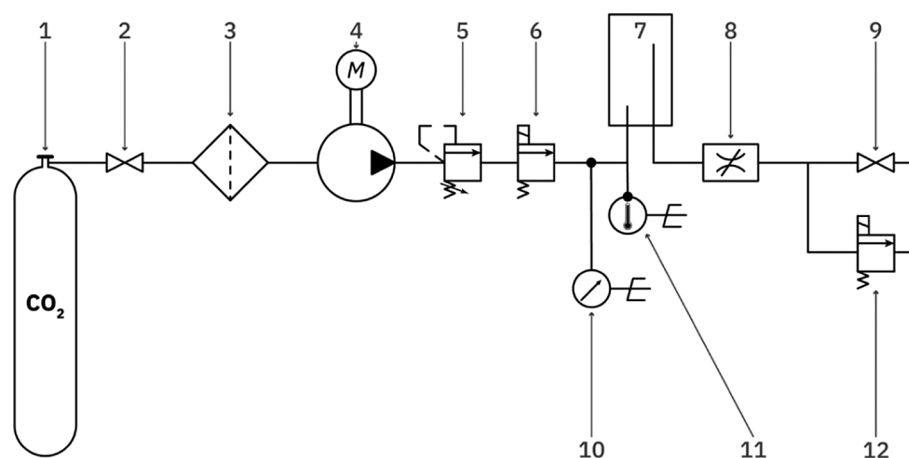


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Пневматическая схема прототипа испытательного стенда для исследования режимов стерилизации: 1 — баллон с газовой смесью; 2 — первый кран; 3 — фильтр; 4 — насос; 5 — клапан предохранительный; 6 — первый клапан; 7 — рабочая камера; 8 — дроссель; 9 — второй кран; 10 — электронный манометр; 11 — датчик температуры; 12 — второй клапан

¹ ГОСТ Р ИСО 14937-2012 (ISO 14937:2009). Стерилизация медицинской продукции. Общие требования к определению характеристик стерилизующего агента и к разработке, валидации и текущему контролю процесса стерилизации медицинских изделий. М.: Стандартинформ; 2013.

не подвергавшиеся стерилизации, с которых сразу после контаминации проводили смыв аналогичным способом. Минимально детектируемое число жизнеспособных микроорганизмов (предел обнаружения методики, LOD) составляло 1 КОЕ/мл.

Подготовка химических добавок

Растворы пероксида водорода (H_2O_2) и надуксусной кислоты ($C_2H_4O_3$) готовили в рамках научного сотрудничества с РХТУ им. Д.И. Менделеева в контролируемых условиях. Растворы готовили с использованием сверхчистой воды I типа, полученной путем двойного обратного осмоса и УФ-обработки. Все процедуры приготовления и расфасовки проводили в боксе с инертной атмосферой.

Рабочие концентрации составляли 200 ppm (0,02%) для пероксида водорода и 50 ppm (0,005%) для надуксусной кислоты.

Растворы готовили партиями с учетом срока хранения до 1 недели в условиях, рекомендованных РХТУ (при пониженной температуре без доступа света). Входной контроль исходных растворов проводили редоксиметрическими методами для уточнения концентрации.

Планирование эксперимента

С помощью статистического программного обеспечения Minitab 17.1 были сгенерированы три отдельных центральных композиционных плана (ЦКП), по одному для каждой группы обработки: CD (чистый диоксид углерода), CDHP (диоксид углерода + пероксид водорода) и CDPAA (диоксид углерода + надуксусная кислота). Для группы CD варьировали температуру в диапазоне 35–60 °C, давление 70–120 атм и время экспозиции 60–120 мин в рамках одного блока согласно данным литературы [5, 7, 8] с учетом технических ограничений оборудования ($P_{max} = 120$ атм). Группы

CDHP и CDPAA исследовали при температурах 30–45 °C, давлении 90–110 атм и времени экспозиции 10–30 мин согласно данным [9, 12], с организацией экспериментов в 3 блока.

Каждый ЦКП включал 20 экспериментальных точек: 8 точек куба, 6 аксиальных точек и центральные точки с $\alpha = 1$. Все операции с оборудованием выполнял один оператор, в то же время микробиологические процедуры проводил один специалист-микробиолог для обеспечения гомогенности получаемых данных.

Валидация оптимальных режимов стерилизации предполагала проведение серии из 10 независимых повторов для каждого режима с последующим расчетом log-reduction относительно контроля (N_0). При наличии более двух моделей и соответствующих оптимальных режимов планировался сравнительный анализ значений log-reduction между группами для статистической оценки различий в эффективности стерилизации.

Экспериментальные точки выполняли согласно матрице ЦКП с контролем отклонений параметров процесса в пределах ± 2 °C по температуре, ± 5 атм по давлению и ± 2 мин по времени экспозиции.

Экспериментальная процедура

Каждый эксперимент включал подготовку двух образцов (на матрице в виде титановых дисков размерами 8×1 мм): контрольного и тестового (экспериментального). Тест-образцы для исследования режима CD упаковывались в крафт-бумагу (рис. 2А), а для режимов CDHP и CDPAA дополнительно полностью погружались в 15 мл соответствующего раствора добавки в открытых пробирках, размещаемых в реакционной камере (рис. 2Б).

Экспериментальная процедура включала подготовку образцов и их загрузку в рабочую камеру с последующей герметизацией и достижением заданных условий по температуре и давлению CO_2 . После



Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Подготовка титановых дисков для газодинамической обработки: А — индивидуальная упаковка контаминированного титанового диска в крафт-пакет; Б — размещение упакованного диска в пробирке с раствором окислителя для проведения обработки по режимам CDHP или CDPAA

поддержания целевых условий в течение заданного времени экспозиции проводили контролируемую декомпрессию (≤ 10 атм/мин для минимизации эффектов механической инактивации), извлечение образцов и микробиологический анализ.

Параметры процесса (температуру, давление, время) контролировали вручную с использованием дублированных аналоговых и цифровых датчиков. Эксперименты проводили при температуре 20–25 °C и относительной влажности $50 \pm 10\%$.

Статистический анализ

В качестве отклик-переменной используется логарифмическое снижение (log-reduction), рассчитываемое по формуле (1):

$$\log - \text{reduction} = \log_{10} \left(\frac{N_0}{N} \right), \quad (1)$$

где N_0 — количество жизнеспособных микроорганизмов в контрольном образце;
 N — после обработки.

Для выявления зависимости эффективности стерилизации от параметров процесса применяется методология поверхностей отклика с построением полноквадратичных моделей.

Для каждой экспериментальной группы предполагалась предварительная оценка распределения данных с использованием теста Андерсона – Дарлинга (AD). В зависимости от результата проверки нормальности для сравнения контрольных и обработанных образцов планировалось применение либо двухвыборочного t -теста (при отсутствии значимых отклонений), либо непараметрического критерия Манна – Уитни, с поправкой на совпадения (MW). Стерильность медицинских изделий считается обеспеченной при log-reduction ≥ 6 , что соответствует уровню гарантии стерильности (SAL) $\leq 10^{-6}$ согласно требованиям ГОСТ².

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты для группы CD

Исходные данные и распределение отклика. В эксперименте по обработке спор *Bacillus subtilis* чистым CO₂ было проведено 20 опытов с варьированием температурных режимов (от 35 до 60 °C), давления (от 70 до 120 атм) и времени экспозиции (от 60 до 120 мин). Среднее значение log-reduction составило $0,52 \pm 0,35$ (AD: $p > 0,05$).

DOE-анализ: полноквадратичная модель. Анализ дисперсии (ANOVA) показал отсутствие статистической значимости модели ($F = 0,26$; $p = 0,972$; $R^2 = 19,1\%$, $adj R^2 = 0\%$), только 19% изменчивости объясняется факторами (температура, давление, время экспозиции), остальные 81% обусловлены случайной ошибкой. Ни один из коэффициентов, включая основные, квадратичные и взаимодействующие члены, не был статистически значим (все $p > 0,2$).

Для проверки устойчивости вывода о статистической незначимости полноквадратичной модели

дополнительно применяли поэтапную процедуру исключения переменных (методом обратного исключения) при $\alpha = [0,1; 0,3]$ (шаг = 0,1). Во всех случаях итоговая модель сводилась к константе, так как ни одна переменная не достигла статистической значимости (минимальное $p = 0,24$), а объясненная дисперсия не превышала 10%.

Статистический анализ различий между группами

В контрольной группе CD (N_0) медиана числа жизнеспособных спор составила $4,34 \times 10^3$ [2940; 5245] КОЕ/мл, в обработанной группе CD (N) — $1,57 \times 10^3$ [556; 2678] КОЕ/мл.

Проверка нормальности распределения данных показала отсутствие отклонений от нормального закона в обработанной группе (AD: $p > 0,05$), однако для контрольной группы выявлено статистически значимое отклонение (AD: $p < 0,05$). В связи с этим для сравнения между группами применен непараметрический критерий, который выявил статистически значимое различие (MW: $p < 0,001$). Таким образом, снижение числа жизнеспособных спор после обработки чистым CO₂ является статистически значимым.

Результаты для группы CDHP

Исходные данные и динамика расширения экспериментальной серии. В исходной серии экспериментов по обработке спор *Bacillus subtilis* смесью CO₂ и перекиси водорода (CDHP) было выполнено 20 опытов с варьированием температуры (30–45 °C), давления (90–110 атм) и времени экспозиции (10–30 мин). Анализ построенной регрессионной модели выявил низкое значение объясненной дисперсии ($R^2 = 45\%$; $adj R^2 = 0\%$), все коэффициенты, включая линейные, квадратичные и взаимодействующие эффекты, оказались статистически незначимыми ($p > 0,4$), а тест lack-of-fit показал высокое значение ($p = 0,94$), что свидетельствует о неспособности модели объяснять вариацию экспериментальных данных. Процедура пошагового исключения факторов (методом обратного исключения) не позволила отобрать ни одного предиктора, а итоговая модель включала только константу.

Структура исходного экспериментального плана была несбалансированной: основная часть повторов приходилась на центральную точку (7 повторов), в то время как на экстремальных значениях факторов (давление 90 и 110 атм; время экспозиции 10 и 30 мин) было выполнено лишь по 2 эксперимента, а по ряду сочетаний факторов отсутствовали независимые повторы.

В совокупности эти результаты указывали на недостаточную информативность исходного дизайна и обосновывали необходимость целевого расширения серии. В связи с этим были добавлены пять дополнительных точек, расположенных в центральной области и на границах варьироваемых факторов (табл. 3, № 21–25). В расширенной выборке ($n = 25$) отмечалось незначительное улучшение параметров модели ($R^2 = 40\%$; $adj R^2 = 4\%$), однако ключевые эффекты

² ГОСТ Р ИСО 14937-2012 (ISO 14937:2009). Стерилизация медицинской продукции. Общие требования к определению характеристик стерилизующего агента и к разработке, валидации и текущему контролю процесса стерилизации медицинских изделий. М.: Стандартиформ; 2013.

по-прежнему оставались незначимыми ($p > 0,25$ для всех факторов; lack-of-fit: $p = 0,97$), и процедура пошагового исключения вновь не позволила выделить статистически значимые предикторы. Для дополнительной проверки влияния давления на эффективность стерилизации были добавлены еще шесть точек с экстремальными значениями давления (70 и 120 атм, при фиксированной температуре 38 °C). Медианное значение log-reduction для полной выборки ($n = 31$) составило 1,31 [0,50; 2,61] (AD: $p < 0,05$).

Итоговый анализ экспериментальной серии ($n = 31$): модель и статистические параметры

Для определения влияния факторов на эффективность инактивации спор была построена множественная регрессионная модель с применением процедуры пошагового обратного исключения факторов ($\alpha = 0,1$). В итоговую модель вошли линейные и квадратичные эффекты температуры и давления, а также линейный эффект времени экспозиции. Взаимодействия между факторами были исключены как незначимые. Регрессионное уравнение предсказанного значения log-reduction для группы CDHP (Y_{CDHP}) имеет вид:

$$Y_{CDHP} = 1,60 + 0,387 \times t_C - 0,1800 \times P_{atm} + 0,01542 \times T_{min} - 0,00511 \times t_C^2 + 0,000996 \times P_{atm}^2. \quad (2)$$

Объясняющая способность модели увеличилась до 58,5% ($R^2 = 58,5\%$; $adj R^2 = 50,2\%$; $pred R^2 = 38,5\%$; lack-of-fit: $p = 0,32$). Статистически значимыми оказались квадратичные члены температуры ($p < 0,05$) и давления ($p < 0,001$), а также линейный эффект давления ($p < 0,05$), тогда как все остальные переменные были исключены на этапе отбора из-за отсутствия значимости ($p > 0,1$).

Статистический анализ различий между группами

В контрольной группе CDHP (N_0 , $n = 31$) медиана числа жизнеспособных спор составила $3,1 \times 10^3$ [2950; 3680] КОЕ/мл, в обработанной группе (N , $n = 31$) — $1,9 \times 10^2$ [101; 474] КОЕ/мл. Проверка

нормальности распределения КОЕ/мл выявила статистически значимые отклонения от нормального закона в обеих группах (AD: $p < 0,005$). Учитывая это, для сравнения между группами был применен непараметрический критерий, результаты которого показали статистически значимое различие между группами (MW: $p < 0,0001$). Наглядная демонстрация эффекта обработки приведена в сопоставлении внешнего вида контрольного и обработанного образцов (рис. 3).

Поиск оптимальных условий обработки

Для определения оптимального режима стерилизации был проведен анализ полученной регрессионной модели (Y_{CDHP}). В качестве критерия оптимальности использовалось максимальное значение log-reduction в пределах диапазона исследованных факторов (рис. 4).

По результатам расчета определено, что максимальный эффект достигается при температуре 37,9 °C, давлении 120 атм и времени экспозиции 30 мин (рис. 5). При этих условиях предсказанное значение log-reduction составляет 2,14 (95% ДИ: [1,78; 2,50]; 95% ПИ (предсказательный интервал): [1,42; 2,87]), а интегральный критерий оптимальности (D) для найденного решения составил 0,78.

Диагностика модели

Диагностика финальной регрессионной модели ($n = 31$) осуществлена на основании визуального анализа распределения остатков. Нормальный вероятностный график (рис. 6А) показал наличие отклонения остатков от нормального закона, однако явных выбросов или структурных паттернов выявлено не было. Аналогично на графике остатков по предсказанным значениям (рис. 6Б) не выявлено систематических трендов или признаков гетероскедастичности.

Результаты для группы CDPAА

Исходные данные и распределение отклика. В эксперименте по обработке спор *B. subtilis* смесью CO_2

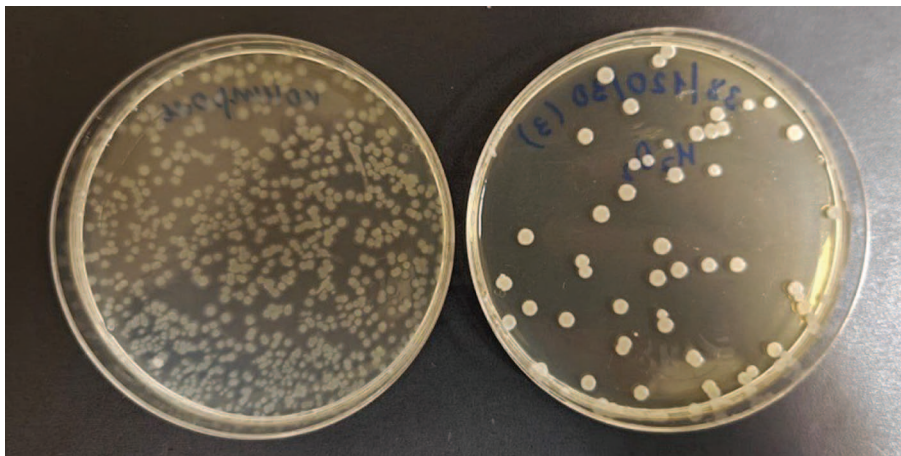


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Пример внешнего вида чашек Петри: контрольный образец (слева) и образец после обработки по одному из исследованных режимов CDHP (справа)

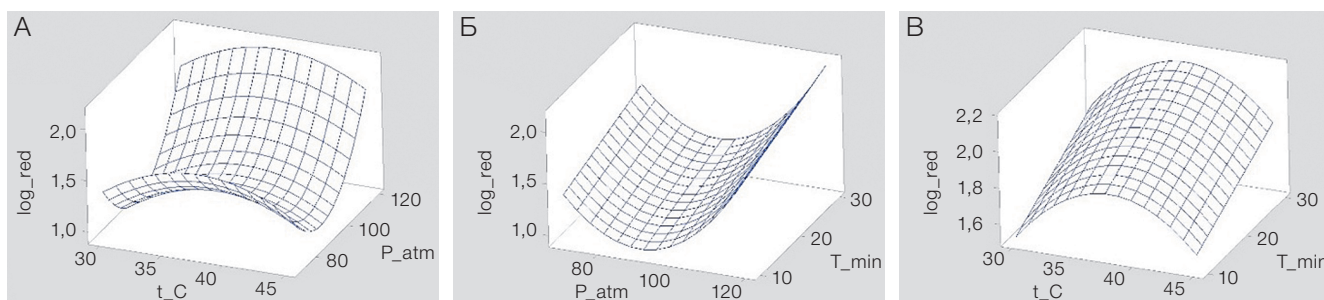


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Поверхности отклика показателя log-reduction по регрессионной модели для группы CDHP (n = 31): А — P_atm и t_C при фиксированном T (30 мин); Б — P_atm и T_min при фиксированном t (37,9 °C); В — t_C и T_min при фиксированном P (120 атм); t_C — температура; P_atm — давление, атм; T_min — время экспозиции, мин; log_red — отклик: log₁₀-снижение (log₁₀-ед)

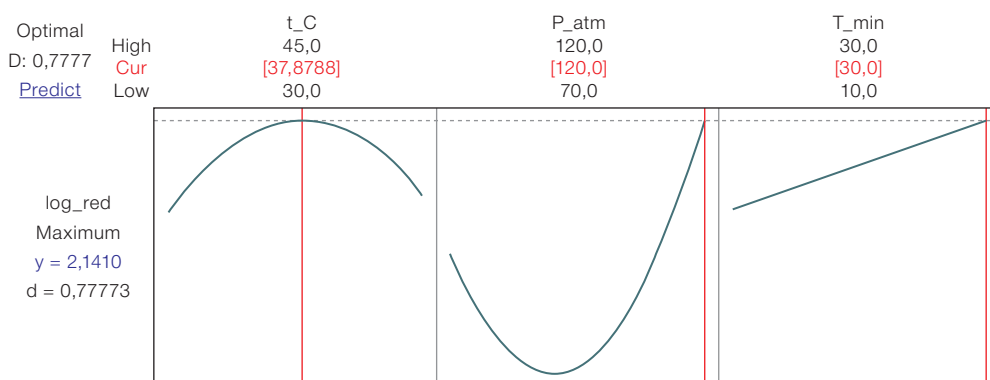


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. График поиска оптимальных условий обработки для группы CDHP: n = 31; t_C — температура, °C; P_atm — давление, атм; T_min — время экспозиции, мин; log_red — log₁₀-снижение; D — интегральная желательность; вертикальные линии — оптимальные уровни факторов

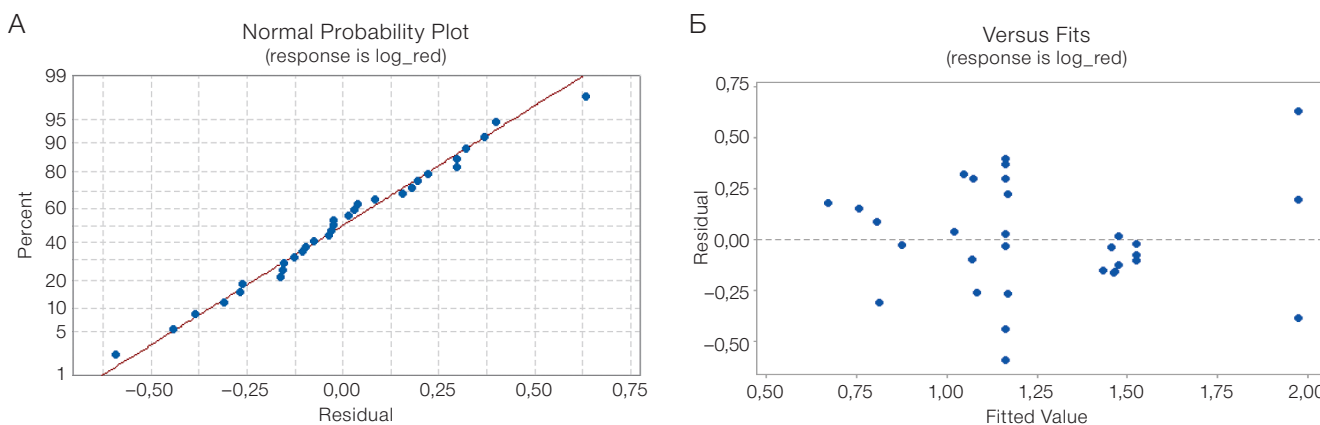


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 6. Диагностика остатков модели log-reduction (группа CDHP, n = 31): А — нормальный вероятностный график (ось X: остатки, log₁₀-ед.; ось Y: процент, %); Б — график остатков по предсказанным значениям (ось X: предсказанные значения log₁₀-снижения, log₁₀-ед.; ось Y: остатки, log₁₀-ед)

и надуксусной кислоты (CDPAA) было проведено 20 опытов с варьированием температуры (30–45 °C), давления (90–110 атм) и времени экспозиции (10–30 мин). Среднее значение log-reduction составило 2,10 ± 0,90 (AD: p > 0,05).

DOE-анализ: полноквадратичная модель

В отличие от предыдущих экспериментальных серий, для режима CDPAA было решено не упрощать полноквадратичную модель в связи с тем, что показатели

качества данной модели оказались удовлетворительными ($R^2 = 78,0\%$; $adj R^2 = 47,6\%$; lack-of-fit: $p = 0,08$). Регрессионное уравнение предсказанного значения log-reduction для группы CDPAA (Y_{CDPAA}) имеет вид:

$$Y_{CDPAA} = -19,80 + 0,163 \times t_C + 0,387 \times P_{atm} - 0,106 \times T_{min} - 0,00219 \times t_C^2 - 0,00263 \times P_{atm}^2 + 0,00027 \times t_C^2 + 0,00190 \times t_C \times P_{atm} - 0,00347 \times t_C \times T_{min} + 0,00207 \times P_{atm} \times T_{min}. \quad (3)$$

Из всех включенных в модель факторов только линейный эффект температуры оказался статистически значимым ($p < 0,05$), в то время как влияние давления ($p > 0,05$), времени экспозиции ($p > 0,05$), квадратичные и взаимодействующие члены не достигли статистической значимости (все $p > 0,22$).

Статистический анализ различий между группами

В контрольной группе CDPAA (N_0 , $n = 20$) медиана числа жизнеспособных спор составила $2,13 \times 10^3$ [1600; 3973] КОЕ/мл, в экспериментальной группе (N , $n = 20$) — $2,21 \times 10^1$ [12,5; 41,1] КОЕ/мл (AD: $p < 0,005$). Статистический анализ значимости различий определил достоверное снижение числа жизнеспособных

спор после обработки (MW: $p < 0,0001$). На рисунке 7 приведено сравнение внешнего вида контрольного и обработанного образцов.

Поиск оптимальных условий обработки

Для определения оптимального режима стерилизации по критерию максимизации log-reduction была использована полноквадратичная модель Y_{CDPAA} (рис. 8).

По результатам оптимизации наивысшее ожидаемое значение log-reduction соответствует 3,60 (95% ДИ: [2,37; 4,82]; 95% ПИ: [1,65; 5,54]) и достигается при температуре 45 °С, давлении 94 атм и времени экспозиции 10 мин. Для этих условий интегральный критерий оптимальности модели составляет 0,95 (D), что указывает на высокую степень соответствия выбранного режима заданным параметрам (рис. 9).

Диагностика модели

В результате оценки нормального вероятностного графика остатков (рис. 10А), а также графика остатков по предсказанным значениям (рис. 10Б) не выявлено отклонений от нормального распределения и признаков гетероскедастичности.

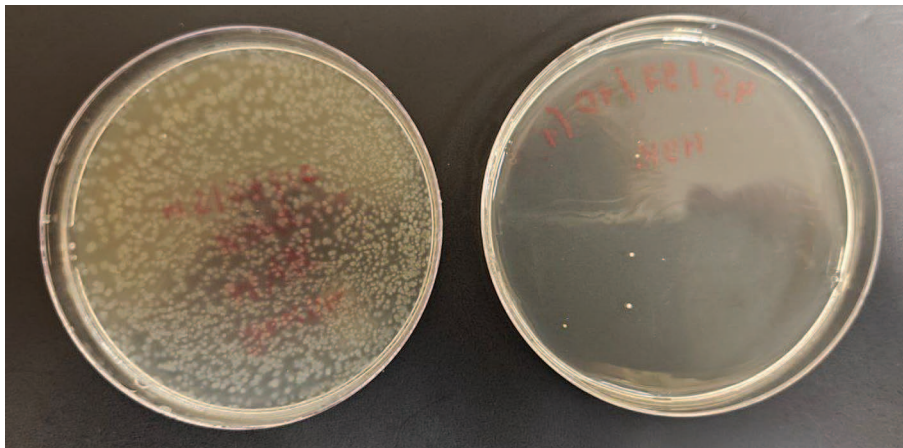


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 7. Пример внешнего вида чашек Петри: контрольный образец (слева) и образец после обработки по одному из исследованных режимов CDPAA (справа)

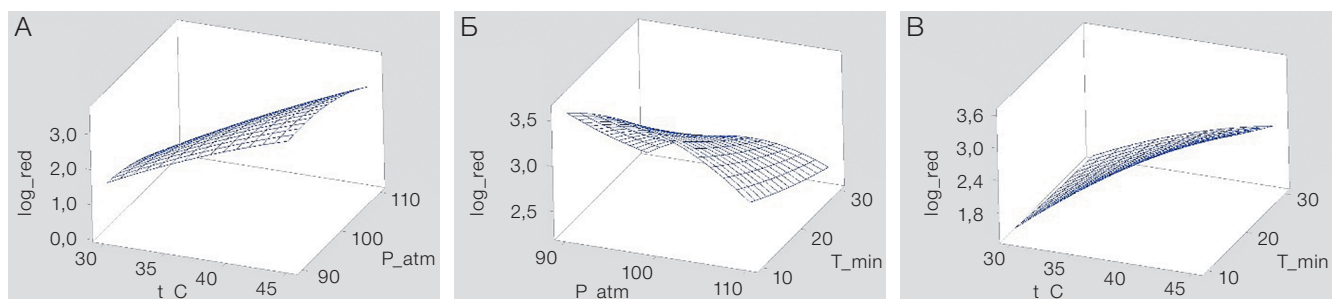


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 8. Поверхности отклика показателя log-reduction по регрессионной модели для группы CDPAA: А — P_{atm} и t_C при фиксированном T (10 мин); Б — P_{atm} и T_{min} при фиксированном t (45 °С); В — t_C и T_{min} при фиксированном P (94 атм); t_C — температура, °С; P_{atm} — давление, атм; T_{min} — время экспозиции, мин; log_{red} — отклик: log_{10} -снижение (log_{10} -ед)

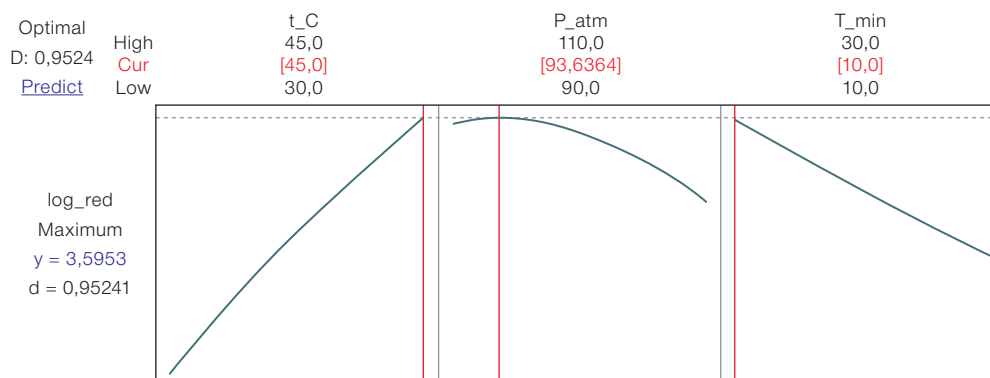


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 9. График поиска оптимальных условий обработки для группы CDPAА: t_{C} — температура, °C; P_{atm} — давление, атм; T_{min} — время экспозиции, мин; \log_{red} — \log_{10} -снижение; D — интегральная желательность; вертикальные линии — оптимальные уровни факторов

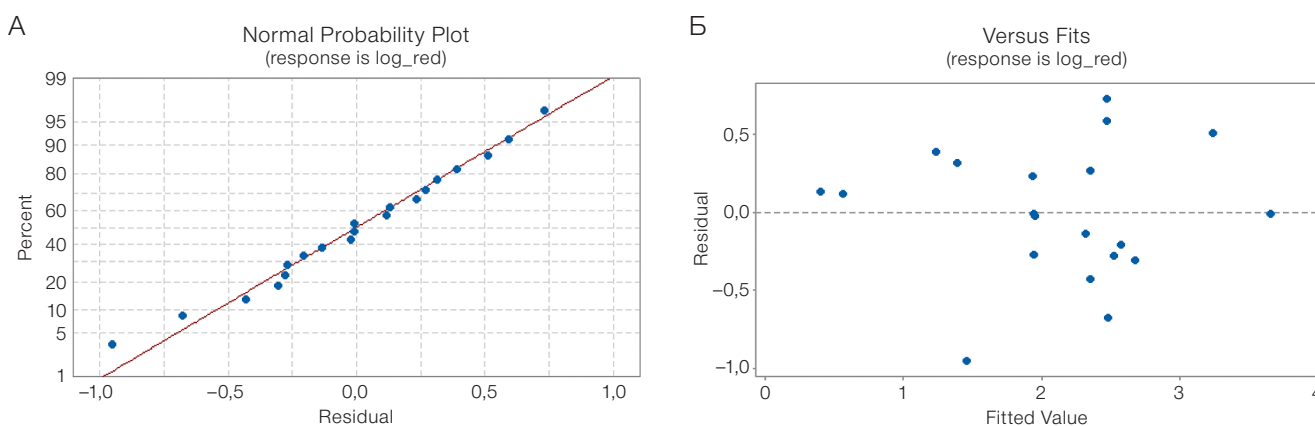


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 10. Диагностика остатков модели log-reduction (группа CDPAА): А — нормальный вероятностный график (ось X: остатки, \log_{10} -ед.; ось Y: процент, %); Б — график остатков по предсказанным значениям (ось X: предсказанные значения \log_{10} -снижения, \log_{10} -ед.; ось Y: остатки, \log_{10} -ед.)

Валидация оптимальных режимов стерилизации

Для подтверждения эффективности оптимальных условий стерилизации и оценки повторяемости метода были проведены валидационные эксперименты с десятью независимыми повторами для каждого режима. В режиме CDHP (37,9 °C, 120 атм, 30 мин, 200 ppm H_2O_2) среднее значение \log -reduction составило $4,4 \pm 0,3$ при коэффициенте вариации 7,3%. Для режима CDPAА (45 °C, 94 атм, 10 мин, 50 ppm PAA) среднее значение \log -reduction было $6,0 \pm 0,3$, а коэффициент вариации — 4,9%. Во всех экспериментах значения \log -reduction превышали предел обнаружения методики (1 КОЕ/мл).

Распределение данных в обеих группах соответствовало нормальному закону (AD: $p > 0,05$), что позволило использовать t -тест для сравнения эффективности режимов. Было установлено, что режим CDPAА обеспечивает статистически значимо более высокую инактивацию спор по сравнению с CDHP (разность средних 1,60 (\log -reduction); 95% ДИ: [1,31; 1,89]; $p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе сравнительной оценки стерилизующего действия сверхкритического CO_2 и его комбинаций с окислителями в отношении спор *B. subtilis* установлено, что применение только CO_2 (режим CD) не позволило добиться значимого снижения жизнеспособности: во всех протестированных сочетаниях параметров уровень инактивации не превышал 0,8 \log -порядка. Введение окислителей — перекиси водорода (CDHP) и надуксусной кислоты (CDPAА) — обеспечило принципиально иной результат. По данным валидационных серий, для режима CDHP среднее снижение составило $4,42 \pm 0,32$ \log -порядка (CV = 7,30%) при 37,9 °C, 120 атм, 30 мин, а для CDPAА — $6,02 \pm 0,30$ \log -порядка (CV = 4,98%) при 45 °C, 94 атм, 10 мин.

Коэффициенты вариации рассчитаны по серии из десяти независимых повторов для режимов с окислителями; для режима CD отдельные валидационные эксперименты не проводились, поскольку оптимальных условий, обеспечивающих высокую степень инактивации, выявить не удалось.

Достигнутое в настоящем исследовании снижение числа жизнеспособных спор *B. subtilis* на четыре порядка и более при обработке с использованием scCO_2 и перекиси водорода указывает на потенциал этого подхода для решения задач высокоуровневой дезинфекции полукритических медицинских изделий [1, 13]. Такой уровень инактивации рассматривается в современных международных рекомендациях как приемлемый для обеспечения микробиологической безопасности изделий, для которых достижение абсолютной стерильности не требуется, однако необходима эффективная защита от большинства патогенов [13–15]. Следует подчеркнуть, что в данной работе оценивали в первую очередь инактивацию спор, поэтому для практического внедрения метода необходим дальнейший анализ антимикробной активности в отношении других клинически значимых микроорганизмов.

Низкая эффективность стерилизации спор *Bacillus subtilis* чистым CO_2 , наблюдаемая в изученном диапазоне температур (35–60 °C), давлении (70–120 атм) и времени экспозиции (1–2 ч), полностью согласуется с результатами ряда независимых исследований. В работе S. Spilimbergo и соавт. [5] при 36 °C, 80 атм и длительной экспозиции (до 48 ч) log-reduction для спор *B. subtilis* составлял 0,5–0,9, что сопоставимо с нашими значениями 0,4–0,8 при существенно более коротком времени обработки. A.K. Dillow и соавт. [16] показали, что при 205 бар (~200 атм), 34 °C и экспозиции 2 ч для спор *Bacillus cereus* показатель log-reduction не превышал 1–2 у.е.; только при 60 °C и увеличении времени до 4 ч удавалось достичь log-reduction 5–8 у.е., что выходит за рамки большинства применимых для медицинских изделий режимов. A. White и соавт. [17] подтвердили, что даже при 96–103 атм и 35–60 °C log-reduction спор *B. subtilis* и *B. stearothermophilus* оставался близким к нулю даже за 72 ч; значимая инактивация наблюдалась только при добавлении окислителей или воды.

Совокупность этих данных подтверждает, что стерилизация спор чистым CO_2 неэффективна при «мягких» и средних режимах, а переход к практическим уровням инактивации требует либо экстремального повышения температуры, либо значительного увеличения времени обработки, что зачастую невозможно или экономически неоправданно при работе с медицинскими материалами. Диапазон параметров был выбран исходя из ограничений экспериментальной установки и задач, связанных с применением метода к обработке медицинских изделий, что соответствует реальным условиям производства и перспективам последующего внедрения технологии.

Совпадение полученных нами значений log-reduction с диапазонами, опубликованными в ряде независимых исследований для спор *Bacillus spp.* при аналогичных условиях [5, 16, 17], может указывать на определенную воспроизводимость эффекта низкой эффективности чистого CO_2 в изученных режимах. Несмотря на различия в экспериментальных моделях, объектах и деталях протоколов, значимых расхождений в достигнутом уровне инактивации не отмечено. Тем не менее для окончательных выводов о воспроизводимости требуются специально спланированные межлабораторные исследования с контролем критических параметров.

Следует отметить, что нам не удалось выявить в литературе другие публикации об использовании

штамма *B. subtilis* и сопоставимых условий обработки (200 ppm H_2O_2 , температура, давление), за исключением работы V. Warambourg и соавт. [6], на параметры которой мы ориентировались при планировании собственных экспериментов. В нашем исследовании оптимальные параметры процесса (120 бар, 37,9 °C, 30 мин, 200 ppm H_2O_2) отличались от условий, описанных у V. Warambourg и соавт. [6] (110 бар, 40 °C, 20 мин, 200 ppm H_2O_2), однако находились в близком диапазоне. Совпадение диапазонов оптимальных условий, определенных независимо, может рассматриваться как проявление частичной воспроизводимости «оптимального окна» стерилизации scCO_2 с H_2O_2 для *B. subtilis*. Вместе с тем достигнутые значения log-reduction существенно различаются (4,42 против 8,73), что указывает на ограничения количественной воспроизводимости между разными лабораториями и подчеркивает важность стандартизации экспериментальных методик и объектов.

В части применения CDPAA наиболее близкими по условиям к настоящему исследованию являются эксперименты B. Setlow и соавт., где для *B. subtilis* при 35–55 ppm PAA, 35 °C, 100 бар и времени экспозиции 25 мин наблюдали снижение жизнеспособности более чем на 6 log-порядков [12]. В нашем исследовании оптимальные параметры составили 45 °C, 94 бар, 10 мин, 50 ppm PAA. Таким образом, диапазоны концентраций, давления и температуры, при которых достигается выраженная инактивация, оказались близкими, однако различия во времени экспозиции и деталях протокола не позволяют говорить о воспроизводимости в строгом смысле и затрудняют прямое количественное сопоставление эффективности.

Несмотря на частичное совпадение ключевых параметров с опубликованными работами, корректное количественное сопоставление эффективности затруднено. Основные причины обусловлены различиями в используемых штаммах, геометрии и материале подложки, способе и объеме нанесения инокуляма, процедуре смыва, а также деталях экспериментальных протоколов. Такая вариабельность подчеркивает необходимость дальнейшей стандартизации и межлабораторного согласования ключевых параметров исследований по scCO_2 -стерилизации.

Доступные литературные данные по инактивации спор с использованием scCO_2 в сочетании с окислителями (перекись водорода, надуксусная кислота) чрезвычайно разнородны. В большинстве публикаций изучаются различные штаммы *Bacillus* (чаще всего *B. atrophaeus*, *B. pumilus*, *G. stearothermophilus*), применяются существенно отличные концентрации окислителей и различные экспериментальные протоколы [18]. Работ, в которых бы одновременно использовались низкие концентрации окислителей, условия, сопоставимые с настоящим исследованием по температуре и давлению, а также *B. subtilis* в качестве тест-организма, нам выявить не удалось. Такая разрозненность и отсутствие стандартизации затрудняют корректное количественное сравнение эффективности между результатами настоящей работы и большинством опубликованных данных. Необходимость дальнейших исследований с использованием идентичных биологических объектов и согласованных режимов подчеркивается в ряде современных обзоров [12, 18].

Анализ вклада отдельных факторов показал, что в режиме CDHP давление оказывало высокозначимое влияние как в линейном ($p < 0,05$), так и в квадратичном ($p < 0,001$) выражении, причем квадратичный эффект был наиболее выражен. В режиме CDPAA линейный эффект давления не достиг статистической значимости ($p > 0,226$), что, вероятно, связано не только с различиями в химических свойствах окислителей, но и с особенностями матрицы и локальной доступности стерилизующего агента [9]. Полученные нами данные частично согласуются с данными M.S. Hossain и соавт., где давление было определяющим фактором для инактивации бактерий в условиях обработки чистым $scCO_2$, однако в этой работе изучались преимущественно вегетативные формы, а не споры [8]. По данным J. Zhang и соавт., давление усиливает растворимость и проникновение CO_2 через клеточные барьеры, но для спор эффективность этого процесса может существенно различаться [7, 9].

Температура продемонстрировала устойчивую значимость в обеих моделях: для CDHP — как линейный ($p < 0,01$) и квадратичный ($p < 0,05$) эффект, для CDPAA — как доминирующий линейный фактор ($p < 0,05$). Это подчеркивает ведущую роль температуры при добавлении окислителей для преодоления споровых барьеров. Значимость температурного фактора, выявленная в нашем исследовании для режима с надуксусной кислотой, согласуется с данными J. Zhang и соавт., согласно которым повышение температуры увеличивает диффузию CO_2 и текучесть клеточных структур [7].

Время экспозиции оказалось статистически значимым только для CDHP ($p < 0,05$), но не для CDPAA ($p > 0,407$), что также согласуется с литературными данными о сравнительно меньшем вкладе продолжительности воздействия по сравнению с давлением и температурой [7, 9]. Более быстрое действие надуксусной кислоты может объяснять снижение зависимости от времени экспозиции.

Взаимодействие давления и температуры было статистически значимым для обоих режимов (CDHP: $p < 0,05$; CDPAA: $p < 0,05$), что указывает на синергетический эффект параметров. По-видимому, на давлениях выше критического для CO_2 диффузия определяется именно давлением, а повышение температуры дополнительно увеличивает текучесть оболочек и активирует окислительные процессы [7, 8].

В настоящем исследовании резкая декомпрессия после обработки намеренно была исключена, чтобы минимизировать вклад механического повреждения спор и получить более объективную оценку химического действия $scCO_2$ и окислителей. Этот подход обоснован результатами ряда работ, в которых показано, что резкая декомпрессия может вносить существенный

вклад в инактивацию за счет физических эффектов, не связанных с действием самого агента [5, 7, 8]. По нашему мнению, такой подход позволяет получить более достоверные данные о механизмах инактивации.

Результаты валидационных экспериментов показали значения log-reduction, существенно превышающие верхние границы предсказательных интервалов, рассчитанных по основной серии при поисках оптимальных режимов. Это связано не только с применением оптимальных режимов, но и с тем, что в обеих сериях использовались разные микробиологические подходы: при построении модели исходная концентрация спор была ниже (для стабильной работы автоматического счетчика), тогда как валидация проводилась при нормативной нагрузке ($N_0 \geq 10^6$), необходимой для расчета SAL [14, 15].

Представленное исследование имеет ряд ограничений, которые следует учитывать при интерпретации и практическом использовании полученных данных. Работа выполнена на одной лабораторной установке с максимальным давлением 120 атм, что ограничивает диапазон исследованных режимов; эксперименты проведены только с одним модельным организмом (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633) и на титановых дисках, поэтому эффективность метода для других микроорганизмов и материалов не оценивалась. Повторяемость результатов определялась только в условиях одной лаборатории, а межлабораторная воспроизводимость не изучалась. Влияние стерилизации на функциональные свойства и биосовместимость медицинских изделий также не исследовалось. Все эти ограничения следует учитывать при планировании дальнейших работ и переносе лабораторных результатов в практику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных экспериментальных исследований с использованием сверхкритического диоксида углерода ($scCO_2$), включая чистый $scCO_2$, $scCO_2$ с перекисью водорода (H_2O_2) и $scCO_2$ с надуксусной кислотой (PAA), были валидированы режимы инактивации спор *Bacillus subtilis* на титановых дисках. Экспериментально обоснованы оптимальные условия для низкотемпературной обработки термочувствительных медицинских материалов, соответствующие современным международным требованиям. Режим $scCO_2$ с надуксусной кислотой обеспечивает достижение уровня $SAL \leq 10^{-6}$, необходимого для стерилизации медицинских изделий. Режим $scCO_2$ с перекисью водорода обеспечивает превышение $SAL \leq 10^{-4}$, что соответствует высокоуровневой дезинфекции. Использование только чистого $scCO_2$ оказалось недостаточно эффективным (максимум 0,8 log-reduction).

Литература / References

- Rowan NJ, Kremer T, McDonnell G. A review of Spaulding's classification system for effective cleaning, disinfection and sterilization of reusable medical devices: viewed through a modern-day lens that will inform and enable future sustainability. *Science of the Total Environment*. 2023;878:162976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162976>
- Spaulding AB, Watson D, Dreyfus J, Heaton P, Grapentine S, Bendel-Stenzel E, et al. Epidemiology of bloodstream infections in hospitalized children in the United States, 2009–2016. *Clinical Infect Diseases*. 2019;69(6):995–1002. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1030>
- Stewart S, Robertson C, Pan J, Kennedy S, Dancer S, Haahr L, et al. Epidemiology of healthcare-associated infection reported from a hospital-wide incidence study: considerations for infection prevention and control planning. *Journal of Hospital Infection Society*. 2021;114:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.03.031>
- Арутюнов СД, Янушевич ОО, Корсунский АМ, Подпорин МС, Салимон АИ, Романенко ИИ и др. Сравнительный анализ эффективности современных

- методов стерилизации инструментов и место газовой динамической обработки диоксидом углерода. *Российская стоматология*. 2022;15(1):12–9.
- Arutyunov SD, Yanushevich OO, Korsunsky AM, Podporin MS, Salimon AI, Romanenko II, et al. Comparative analysis of the effectiveness of modern methods of sterilization of instruments and the place of gas-dynamic treatment with carbon dioxide. *Russian Journal of Stomatology*. 2022;15(1):12–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/rosstomat20221501112>
5. Spilimbergo S, Bertuccio A, Lauro FM, Bertoloni G. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2003;4(2):161–5. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00089-9)
 6. Warambourg V, Mouahid A, Crampon C, Galinier A, Claeys-Bruno M, Badens E. Supercritical CO₂ sterilization under low temperature and pressure conditions. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2023;4(2):106084. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2023.106084>
 7. Zhang J, Davis TA, Matthews MA, Drews MJ, LaBerge M, An YH. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006;38(3):354–72. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.05.005>
 8. Hossain MS, Nik Ab Rahman NN, Balakrishnan V, Alkarkhi AFM, Rajion ZA, Ab Kadir MO. Optimizing supercritical carbon dioxide in the inactivation of bacteria in clinical solid waste by using response surface methodology. *Waste Management*. 2015;43:402–9. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.003>
 9. Qiu QQ, Leamy P, Brittingham J, Pomerleau J, Kabaria N, Connor J. Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials*. 2009;91B(2):572–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31431>
 10. Salimon AI, Statnik ES, Kan Y, Yanushevich OO, Tsarev VN, Podporin MS, et al. Comparative study of biomaterial surface modification due to subcritical CO₂ and autoclave disinfection treatments. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2022;191:105789. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105789>
 11. McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*. 1907;49(14):1176–8. <https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
 12. Setlow B, Korza G, Blatt KMS, Fey JP, Setlow P. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation by and resistance to supercritical CO₂ plus peracetic acid. *Journal of Applied Microbiology*. 2016;120(1):57–69. <https://doi.org/10.1111/jam.12995>
 13. von Woedtke T, Kramer A. The limits of sterility assurance. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. 2008;3(3):Doc19.
 14. Rutala WA, Weber DJ. Sterilization, high-level disinfection, and environmental cleaning. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2011;25(1):45–76. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.11.009>
 15. Shenoy ES, Weber DJ, McMullen K, Rubin Z, Sampathkumar P, Schaffzin JK, et al. Multisociety guidance for sterilization and high-level disinfection. *Infection Control Hospital Epidemiology*. 2025. <https://doi.org/10.1017/ice.2025.41>
 16. Dillow AK, Dehghani F, Hrkach JS, Foster NR, Langer R. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *PNAS*. 1999;96(18):10344–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10344>
 17. White A, Burns D, Christensen TW. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *Journal of Biotechnology*. 2006;123(4):504–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.12.033>
 18. Soares GC, Learmonth DA, Vallejo MC, Davila SP, González P, Sousa RA, et al. Supercritical CO₂ technology: The next standard sterilization technique? *Material Science and Engineering: C*. 2019;99:520–40. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.121>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Р.Ш. Гветадзе — административное руководство проектом, рецензирование и редактирование рукописи; М.С. Галстян — проведение экспериментов на установке, обработка первичных данных, написание первоначального варианта статьи, подготовка иллюстративного материала; Я.Н. Харах — разработка статистического дизайна исследования, статистический анализ и интерпретация результатов; П.Ю. Колесников — выполнение микробиологических исследований, культивирование микроорганизмов, проведение микробиологического анализа; Л.Г. Киракосян — техническое обеспечение экспериментов, проведение валидационных экспериментов, написание разделов методологии и результатов; М.С. Подпорин — планирование экспериментов по оптимизации режимов, научно-методическое сопровождение; В.Н. Царев — концепция микробиологической части исследования, предоставление лабораторных ресурсов, научное редактирование; С.Д. Арутюнов — концептуализация исследования, разработка методологии, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

ОБ АВТОРАХ

Гветадзе Рамаз Шалвович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН
<https://orcid.org/0000-0003-0508-7072>
ramaz-gvetadze@yandex.ru

Галстян Мариам Сереевна
<https://orcid.org/0000-0002-3372-5775>
galstyan.mariam17@gmail.com

Харах Ясер Насерович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-7181-8211>
c.kharakh@gmail.com

Колесников Петр Юрьевич
<https://orcid.org/0000-0003-2947-726X>
petsr8@mail.ru

Киракосян Левон Гамлетович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-5380-1475>
dr.lkirakosyan@gmail.com

Подпорин Михаил Сергеевич, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>
podporin.mikhail@yandex.ru

Царев Виктор Николаевич, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>
nikola777@rambler.ru

Арутюнов Сергей Дарчоевич, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0001-6512-8724>
sd.arutyunov@mail.ru