

---

# Dezenfektan Direncini Belirleyen Testlere Global Bir Bakış. Hangi Testler Hangi Sıra ile Yapılmalıdır? En Ucuz ve Kesin Sonuç Nasıl Elde Edilir?

*Prof. Dr. Ufuk ABBASOĞLU*

*Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA*

---

**D**ezenfektanlar; patojen mikroorganizmaların bulunduğu ya da bulunmasından kuşku duyulan yerler ve kontaminasyon kaynağı olabilecek cihaz ya da malzemeler için kullanılan kimyasal maddelerdir. Kullanılacak dezenfektanın seçimi birçok faktöre bağlıdır. Mikroorganizma türü, dezenfektanın kullanılacağı ortamın kirlilik durumu, dezenfekte edilecek yüzey ve ekipmanın yapısı, dezenfektanın yapısı ve maliyet göz önüne alınarak bu seçim yapılmaktadır. Seçilen bir dezenfektanın da sürekli kullanımı dirençli mikroorganizmaların gelişebilmesine neden olduğundan belli aralıklarla durum değerlendirmesi yapılmalıdır.

Dezenfektanların etkinliğini belirlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Ülkelerarası farklı kuruluşlar benzer standartlara yer vermiştir. “American Association of Official Analytical Chemist (AOAC)”, “German Society for Hygien and Microbiology (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Microbiologie (DGHM)”, “Association French of Normalisation (AFNOR)”, “British Standards Institution (BSI)”, “European Free Trade Association (EFTA)”, “Comite Europee de Normalisation (CEN)” ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE)’nün belirlediği yöntemler kullanılmaktadır.

Tüm yöntemlerdeki genel prensip, denenecek dezenfektan maddenin sulandırımının, belirli mikroorganizmalarla karşılaştırılmasıdır. Çeşitli temas süreleri sonunda mikroorganizmanın canlı kalması, ne kadarının öldüğü, hangi yoğunluktaki dezenfektanın etki gösterdiği testin sonucunu belirler. Testlerdeki dezenfektan sulandırma sınırları, seçilen mikroorganizma suşları ve yoğunlukları, temas sü-

releri, ortamdaki bozucu ve organik maddeler seçilen yönteme göre değişiklik gösterse de sonuçlar ve yorumlar benzer şekilde değerlendirilir.

Uygulanan tüm testler seyreltme-nötralleştirme yöntemi adı verilen aynı prensipteki testlerdir. Dezenfektana uygun bir nötralleştirici bulunmadığı zaman membran süzme yöntemi önerilmektedir.

Dezenfektan etkinliğinin ölçülmesinde kullanılan testler farklı kriterlere göre sınıflandırılmıştır.

**A. Test organizmalarına göre sınıflandırma:**

1. Antimikrobiyal aktivitenin saptanması,
  - Vejetatif bakteriler için bakterisidal testler,
  - Aside dirençli bakteriler için tüberkülosidal testler,
  - Bakteri sporları için sporosidal testler,
2. Antifungal aktivitenin saptanması için fungusidal testler,
3. Antiviral aktivitenin saptanması için antiviral testler.

**B. Aktivite tipine göre sınıflandırma:**

Bakteriyostatik-bakterisidal, tüberkülostatik-tüberkülosidal, sporostatik-sporosidal, fungustatik-fungusidal, virüstatik-virüsidal testler.

**C. Test yapısına göre sınıflandırma:**

1. İn vitro testler,
  - Süspansiyon testler,
  - Kapasite testler,
  - Taşıyıcı testler,
2. Pratik testler, (Yüzeyin, aletlerin, kumaşın, elin, derinin dezenfeksiyonunun yeterliliğini saptama testleri)
3. Uygulama testleri.

**D. Testin amacına göre sınıflandırma:**

1. *İlk test aşaması:* İlk adım testleri, tarama testleri;
  - a. Kimyasal maddenin veya preparatın antibakteriyel özelliğinin olup olmadığının saptanması,
  - b. Maruz kalma süresi ve dezenfektan solüsyonuyla ilişkili bir etkinliğin saptanması,
  - c. Organik madde, serum varlığının etkisi.
2. *İkinci test aşaması:* Özel kullanımlar için dezenfektanın kullanılan dilüsyonunun saptanması testleri,

### 3. Üçüncü test aşaması:

- Saha testleri.
- Pratikteki dezenfektanın kullanılabilirliğinin saptanması,
- Klinik etkinlik çalışmaları.

Antibakteriyel testlerde genellikle *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus hirae* ATCC 10541 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 suşları önerilmektedir.

Dezenfektan testlerinde mikrobisidal aktivite log redüksiyon faktörü (RF) ile ifade edilmektedir. RT, dezenfektan maruziyeti öncesindeki mikroorganizma sayısının logaritması ile dezenfektanla muamele sonrasındaki canlı kalan mikroorganizma sayısının logaritması arasındaki farktır. Başlangıçtaki mikroorganizma sayısı  $10^9$ /mL veya üzerinde olmalıdır.

Genellikle 1 dakika maruziyet sonrası 5 log RF'lik bir azalma olması gerekmektedir. Ancak bazı biyofilm oluşturan bakterilerde 3 log'luk azalma yeterli olmaktadır.

Dezenfektanların letal etkilerinin bilinmesi önemlidir. MİK değerlerinin çalışılması az önem taşımaktadır. Ancak sürekli kullanılan bir dezenfektanın direnç oluşturduğunun incelenmesinde MİK değerleri kontrol edilmelidir.

### SÜSPANSİYON TESTLERİ

Süspansiyon testleri, kapasite ve uygulama testlerine göre daha kolay uygulanabilir testlerdir. Ekonomiktir. Temas süresi, sıcaklık, mikroorganizma türleri, bozucu maddeler gibi aynı anda birçok değişken incelenebilir.

Uygun bakteri volümü, inokulum miktarı, test edilecek dezenfektan konsantrasyonu, temas süresi ve bakterinin ölüm ölmediğinin test edilmesi özelliklerini kapsar. Kalitatif (pasajda üreme olması veya olmaması) veya kantitatif (orjinal ekim büyüklüğüne göre canlı kalan bakteri sayısı tespiti) olarak yapılabilir. Bu basit test yapısı kolaylıkla genişletilerek, değişik konsantrasyonlarda, değişik sürelerde test edilebilir. Organik maddeler veya sabun gibi potansiyel inhibitör maddeler eklenebilir veya sert su ve diğer faktörlerin etkisi incelenebilir.

#### Kalitatif Süspansiyon Testleri

Sabit bir temas süresinden sonra dezenfektan ve bakteri karışımından örnek alınıp pasajlanır. Pasajda koloni gelişmesi dezenfektanın yetersizliğine bağlanır. Ancak tek bir canlı bakteri kalmış bile olsa aynı sonucu verir. Alman test kılavuzuna göre bu test, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* 11229, *Proteus mirabilis* 14153, *Klebsiella pneumoniae* 4352 ve *P. aeruginosa* 15442 bakterileri kontrol olarak kullanılarak yapılmaktadır.

#### Kantitatif Süspansiyon Testleri

Bakteri dezenfektana maruz bırakıldıktan sonra canlı kalan bakteriler doğrudan kültür ya da membran filtre tekniğiyle sayılmaktadırlar. Doğrudan kültür

teknikinde dezenfektana maruz bırakılan karışımdan örnek alınarak katı besiyerine ekilir. Üreyen koloni sayısı başlangıç kontrol bakteri sayısı ile karşılaştırılır. Germisidal etki GE, onluk azalma oranları halinde  $GE = \log N_C - \log N_D$  formülüne göre hesaplanır.  $N_C$ , kontrol serisindeki dezenfektana maruz kaldıktan sonra koloni oluşturan unit,  $N_D$  ise, denek grubunda dezenfektana maruz kaldıktan sonra oluşan koloni sayısıdır. Dökme plak tekniği de yüzey plak sayımı yerine kullanılabilir.

Hollanda'nın standart süspansiyon testi, Mossel modifikasyonuna dayanır. Bu test gıda endüstrisi için geliştirilmiştir ve bakteri dezenfektana maruz bırakılmadan önce albuminde süspanse edilmektedir. Organik yük eklenmesiyle yapılan bu test diğer testlerden daha iyi fikir verir. Beş dakikalık temas sonunda dökme plakta  $32^\circ\text{C}$ 'de inkübasyonla kültür yapılır. Hastane için, veteriner ve gıda teknolojisi alanlarında kullanımı için versiyonları vardır. 5-5-5 testi olarak da isimlendirilir. Bu standart süspansiyon testinde 5 test organizması (*Pseudomonas*, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* ve *S. cerevisiae*) test edilir. Beş dakika temas süresi uygulanır ve 5 logaritmik etkide GE hesaplanır. Son hastane versiyonunda *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* kullanılır. Fransız standardına da uyarlanmış ve *S. faecalis*'te test bakterisi olarak eklenmiştir.  $37^\circ\text{C}$  kullanılmaktadır.

Bazı ülkelerde membran filtre tekniği tercih edilmektedir. Filtrasyondan sonra, filtre besiyeri yüzeyine konur ve oluşan koloni sayılır. Filtre, dezenfektandan arıtmak için bol salin ile yıkanır. Oldukça duyarlı bir teknik olmasına karşın yüzey aktif dezenfektanların ortamdaki uzaklaştırılması gibi bir zorluğu bulunmaktadır.

#### **FENOL KATSAYISI TESTİ: RIDEAL WALKER (RW) TESTİ**

Fenol ile karşılaştırılarak dezenfektan etkinliğinin ölçülmesine dayanan kalitatif bir yöntemdir. 1903 yılında Rideal ve Walker tarafından geliştirilmiştir. Orjinal test organizması *S. typhi*'dir. Fenoliklere oldukça duyarlıdır. 2.5, 5, 7.5 ve 10 dakikalık temas süreleri uygulanır. İlk 5 dakikada üreme görülen ve 7.5 dakikada üreme görülmeyen en yüksek dezenfektan sulandırımından fenol katsayısı hesaplanır. Örneğin; bu üreme özellikleri 1/100 fenol ve 1/1200 dezenfektan sulandırımında olmuştur; Fenol Katsayısı =  $1200/100 = 12$  olarak bulunur. RW testi İngiliz Standartları Enstitüsü'nce önerilen bir testtir. Chick Martin modifikasyonunda, bakteri hücreleri dezenfektana maruz bırakılmadan önce maya hücreleri ile karıştırılarak organik madde yüklenirler. AOAC, RW test yönteminde *S. typhosa* 6539, *S. aureus* 6538 ve *P. aeruginosa* 15.442 kullanılacak şekilde detaylandırılmıştır. Kalitatif test olması dezavantajdır. Tüm dünyada kullanılmaktadır.

#### **KAPASİTE TESTLERİ**

Dezenfektan solüsyonuna kirli bir enstrümanın her daldırılmasında bir miktar kir ya da bakteri solüsyona eklenmiş olur. Artan yük karşısında aktivitesini korumak dezenfektanın kapasitesini gösterir. Kapasite testleri enstrüman dezenfeksiyonu ve ortam temizliğinin uygulamalı olarak taklidi tarzında yapılır. Daha önce-

den belirlenmiş miktar bakteri ajanın uygulama solüsyonuna ilave edilir, bir süre maruz bırakılır ve daha sonra örnek alınarak yarı kantitatif yolla birkaç sıvı besiyerine aktarılır. Belli süre sonra, ikinci bakteri eklenmesi yapılır ve ikinci sub-kültürler yapılır. İn vitro testler olsa da gerçek yaşama yakındır ve kullanılan konsantrasyonlarda uygulanır. Avrupa ve İngiltere’de en çok kullanılan kapasite testi Kelsey-Sykes testidir. Son versiyonunda *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *E. coli* ve *S. aureus* kullanılmaktadır. Bakteriler temiz koşullarda standart sert suyla, kirli koşullarda maya süspansiyonunda süspansiyon edilir. Dezenfektan sert suyla sulandırılır ve 3 mL’lik başlangıç volümü ile başlanır (Sert su: WHO hard water: 17.5 mL CaCl<sub>2</sub> + 5 mL MgSO<sub>4</sub>, 3300 mL saf suda çözülüp otoklavlanarak hazırlanır).

Başlangıç zamanı 8 dakikadır. 1 mL bakteri süspansiyonu eklenir ve 2 dakika sonra pasaj yapılır. Bu test genel olarak süspansiyon testinden dezenfeksiyon için daha etkilidir. Organik madde ve su sertliğinden etkilenir ve dezenfektanın yer temizliği etkinliği hakkında bilgi verir. Bir başka kapasite testinde 0.5 mL bakteri süspansiyonu 100 mL dezenfektan solüsyonuna konur. Birer dakikalık aralarla 10 ekleme yapılır ve her eklemekten 30 saniye sonra pasaj yapılır.

#### **TAŞIYICI TESTLERİ (CARRIER TESTLERİ)**

Enstrüman dezenfeksiyonu için tasarlanan preparatların değerlendirilmesinde önemli bir testtir. Metal, kateter gibi parçalar yapay olarak kontamine edilip kullanılan dezenfektan dilüsyonuna daldırılır, sonra bakterilerin ölüp ölmediği test edilir. Kumaş ve benzeri dokuma parçaları dezenfektanla ıslatılarak test edilir. Bu uygulamalı testte, bir taşıyıcının dezenfeksiyonu gerçekte kullanılmayan nesnelere yapılır (örneğin; porselen). O nedenle bu testler in vitro testlerdir. Testin yapısı basittir. Taşıyıcı, dezenfektan sulandırımına aktarılır. Sabit temas süresi sonrası “nutrient broth” a transfer edilir. Genellikle en az 10 çeşit taşıyıcı test edilir. 1 cm<sup>2</sup>’lik standart pamuk parçası taşıyıcı önce yapay olarak kontamine edilir. Sonra 15 dakika bakteri süspansiyonu içinde ıslatılır: Beş test bakterisi kullanılır. Islak pamuk petri plağına yerleştirilir ve 15 mL dezenfektan eklenir. İki ile 120 dakikalık her temas süresinden sonra pamuk nötralizörlü bir sıvı besiyerine aktarılıp yıkanır ve sonra en son bir başka sıvı besiyerine aktarılır. Bu Alman in vitro testi, temas süresi ve aktif konsantrasyon ilişkisini belirlemeye yarar. Bu testte *S. colerasuis*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* kullanılır. Her testte 10 temiz çelik küçük silindir kontamine edilir ve 10 dakika için 10 mL dezenfektana daldırılır. Sonra pasaj yapılır. Bu test fenol katsayısı test sonucunu konfirme eder ve uygulama için etkili konsantrasyonu belirler.

#### **UYGULAMA TESTLERİ**

Uygulamalı testler gerçek yaşam koşullarında yapılan ikinci safha testleridir. Zaman-konsantrasyon ilişkisi in vitro testlerle ölçüldükten sonra bu uygulama testleri halen kullanılagelen konsantrasyonda ve gerçek uygulama alanlarında yapılır. Laboratuvar uygulamalarında yer alabilir ve daha iyi standardize edilebilme avantajları vardır. Formülasyonu ve uygulaması zor değildir. Fakat, verimliliğinin azlığı nedeniyle çoğunun kullanımı sınırlıdır. Bakterilerin dezenfektanla-

ra direncini etkileyen faktörler in vitro testlerle daha iyi belirlenirler. Fakat standardize edilmedikleri takdirde uygulamalı testlerde bu zordur. Bakterilerin taşıyıcıda, el ve alet yüzeyinde kuruması hem bakteri sayısını azaltır hem de ölümlerine neden olur. Değişiklik, kurutma zamanı, aletin ısısı, nispi nemi ayrıca sulandırıcı besiyeri, organizmanın üreme fazı gibi faktörlerden etkilenir. Değişik laboratuvarlar arasında alınan farklı sonuçlar test verimliliğini azaltır. Bazı ülkelerde bu test, alet ve yüzeyler, oda köşeleri, hava, balgam, dışkı, el ve deri, yüzme havuzu ve diğerlerini kapsayacak şekilde her uygulama alanı için uygulanmaktadır.

### **ALET (ENSTRÜMAN) DEZENFEKSİYON TESTLERİ**

Bu teknik taşıyıcı testine benzer olarak standardize metal parçası veya kateter kullanılarak yapılır. Almanlara göre spesifik enstrüman dezenfeksiyon testleri taşıyıcı testlerinden farklı olarak tarif edilmiştir. Aynı test organizmaları sıvı besiyerinde süspanse edilir ve %20 oranında sığır kanı ile karıştırılır. Dezenfektan ise sert su ile sulandırılır ve buna %0.5 oranında sığır albumini ilave edilir. Standart yapıdaki ve ebatları belli lastik hortumlar kültür-kan karışımına 1 dakika için daldırılır ve sonra 37°C'de 4 saat kurutulur. Daha sonra dezenfektan solüsyonuna 15, 30, 45 ve 60 dakika konur. Bu temas sürelerinden sonra geri çekilir, nötralizörlü sıvı besiyeri ile yıkanır ve başka bir sıvı besiyerine pasajlanarak 7 gün tutulur. Bu yolla aktif konsantrasyonun en düşük sınırı belirlenir. Taşıyıcı testinden farkı, daha fazla organik madde konması ve dezenfektanın sert su ile sulandırımıdır.

### **YÜZEY DEZENFEKSİYONU İÇİN TESTLER**

Yüzey dezenfeksiyonu bazı ülkelerde in vitro testler içinde değerlendirilir. (Hollanda'da standart süspanسیون testi, İngiltere'de KS testi, ABD'de use-dilution testi). Almanya'da yüzey dezenfeksiyonu uygulama koşulları altında yapılır. Bu testlerde, Heicken'in farklı bakterilerle infekte dışkının, ağaç, cam, kaplama ağaç gibi taşıyıcılar üzerinde kurutulmasıyla dezenfektan etkilerini incelediği çalışmadan esinlenilmiştir. Hijyen Enstitüsü'nce birkaç değişiklikle geliştirilmiştir. Kısaca şöyle yapılır: Uygulama odasında yer karoları, PVC taban, sentetik materyal kapları beş test bakterisi ile kontamine edilir. Standart ısı ve nem koşullarında belirli süre kurutulduktan sonra dezenfektan solüsyonu taşıyıcılar üzerine püskürtülür. Hızlı etki için 30, 45, 60, 90 dakika veya uzun etki için 1, 2, 3 ve 4 saat temastan sonra canlı kalan bakteri sayısı belirlenir.

### **"In-Use" Testi**

1972 yılında Kelsey ve Maurer tarafından tanımlanmıştır. Temizlikten sonra yıkama suyundan bir miktar alınır. Bir ile 10 misli sulandırılır. Nötralizör ilave edildikten sonra plaklara 5-10 damla olarak ekilir. İnkübasyon sonrası sporsuz bakteriler ürerse kullanılan konsantrasyon çok düşüktür. Membran filtre tekniği de kullanılabilir. Bu testler çok yararlı olmalarına karşın rutin kullanılmamaktadırlar.

### **DOKUMA DEZENFEKSİYON TESTLERİ**

Her üç test kullanılabilir. Çamaşırın ek bakterisidal aktivitesi olup olmadığı da süspanسیون testiyle gösterilebilir (birinci safha). İkinci safhada aynı sıcaklık ve

aynı dezenfektan konsantrasyonunda yıkama makinelerindeki yıkama sikluslarında taşıyıcı testi kullanılır. Böyle testlerde yıkama sıvısında etkili olduğu halde dokumaya etkili olmayan preparatların varlığı kanıtlanabilir. Bu farklılık in vivo testlerle gösterilemez. Uygulamada üçüncü safha testler de gereklidir. Yıkama sistemi özelliği laboratuvar ortamında ölçülemeyebilir. Alman ekolüne göre kimyasal dokuma için uygulama testleri taşıyıcı testinden iki noktada farklıdır: Dezenfektan standart sert suda %0.1'lik sığır albumini varlığında sulandırılır ve 12-14°C'de 4, 6 ve 12 saat tutulur. Test, uzun zaman için oda sıcaklığında dokuma dezenfeksiyonu için durumu yansıtır. Bir başka testte (kemotermal çamaşır için), kontamine test parçası diğer hastane çamaşır ile birlikte yıkanır. Sonra bunun 500 mL'lik yıkama suyu kantitatif olarak canlı kalan bakteri için incelenir. Çamaşır için Uluslararası bilimsel ve teknoloji komitesinin önerisine göre, 12.5 cm çapındaki dokuma parçası at serumu içindeki *S. faecalis* NCTC 10927 ile bulaştırılır ve bir gece oda sıcaklığında kurutulur. Bir yıkama siklusundan sonra 12 x 12 mm'lik kısmı kesilip 5 mL diluent içinde homojenize edilir. Canlı kalan bakteri açısından incelenir. ABD'de buna ek olarak çamaşırın bakteriyostatik etkisi de incelenmektedir.

### DERİ TESTLERİ

Bakteriler elin arka yüzüne yerleştirilir ve bu kısma antiseptik uygulanır. Verilen süre sonunda sürüntü alınarak uygun besiyerlerine ekilir ve canlı bakteri sayımı yapılır. Kobay derisi üzerinde bakteri hücrelerinin solunumunun inhibisyonunu ölçen bir test tipi geliştirilmiştir. Burada hücre ölümü ile solunum durması arasındaki korelasyondan yararlanılmaktadır.

### HİJYENİK EL DEZENFEKSİYONU

Amacı, eldeki geçici flora bakterilerinin öldürülüp uzaklaştırılmasıdır. Hijyenik el dezenfeksiyonu etkinliği bu bakterilerin varlığı ile ölçülür. İki yolla yapılır.

1. Uygun dezenfektan ya da dezenfektan deterjanla eller 30 saniyeden fazla olmayan şekilde ovulur. Uygun test metodunda antiseptik %70'lik etanol ya da %60'lık izopropanol gibi standartlarla karşılaştırılır. Test edilen madde bu standartlardan kötü sonuç vermemelidir.

2. Eller, dezenfektan ya da dezenfektan-deterjanla 30 saniyeden çok olmamak üzere ovulur ve sonra su ile yıkanır. Değerlendirme, test edilen ürünün standart olarak su ve sabunla karşılaştırılmasıyla yapılır. Test edilen madde kontrolden daha etkili olmalıdır.

### CERRAHİ EL DEZENFEKSİYONU

Ameliyat öncesi cerrah eline uygulanan ve cerrahi yara infeksiyonunu önlemeyi amaçlayan işlemdir. İşlemden;

1. Kalıcı florayı en alt düzeye indirmesi,
2. Uzun etki sağlaması (birkaç saat),
3. Cilde en az zarar vermesi beklenir. Bu dezenfeksiyon işlemlerinde, işlem öncesi ve sonrası örnek alınarak kalıcı flora açısından test edilir.

## DİĞER İN VIVO TESTLER

Bu testlerde, lökositlere karşı toksisiteye bakılır. Korioallantoik membranın infekte edilmesi, yara infeksiyon dezenfektanlarının değerlendirilmesi için yararlı bir methodur. Yaraya uygulanan bir preparatın ilaç emilimine bağlı bir genel toksikoza neden olup olmayacağını incelendiği toksisite testleri de in vivo testlerdir. Zaman-konsantrasyon ilişkisi in vitro testlerle ölçüldükten sonra bu uygulama testleri halen kullanılagelen konsantrasyonda ve gerçek uygulama alanlarında yapılır. Laboratuvar uygulamalarında yer alabilir ve daha iyi standardize edilebilme avantajları vardır. Formülasyonu ve uygulaması zor değildir. Fakat, verimliliğinin azlığı nedeniyle çoğunun kullanımı sınırlıdır. Bakterilerin dezenfektanlara direncini etkileyen faktörler in vitro testlerle daha iyi belirlenirler. Fakat standardize edilmedikleri takdirde uygulamalı testlerde bu zordur. Bakterilerin taşıyıcıda, el ve alet yüzeyinde kuruması hem bakteri sayısını azaltır hem de ölümlerine neden olur. Değişiklik, kurutma zamanı, aletin ısısı, nispi nemi ayrıca sulandırıcı besiyeri, organizmanın üreme fazı gibi faktörlerden etkilenir. Değişik laboratuvarlar arasında alınan farklı sonuçlar test verimliliğini azaltır.

En gerçekçi doğala uyan testler DGHM'ce desteklenen ve Heicken tarafından geliştirilen testlerdir. Tahta, kiremit, lam gibi taşıyıcılar bakteri ile kontamine edilip yüzeylerine dezenfektan sürülüp yayılır. Son noktada 10 koloniden az üremesi değerlendirilir. Olayda spontan ölüme izin için de kurutma yapılır. Kalan canlı sayısı Rodac plağında ya da yıkanarak sayılır. Bugün bu tip kantitatif yüzey dezenfeksiyon testleri birçok Avrupa enstitülerince (DGHM, AFNOR vb.) tanımlanmıştır. Bu uygulamalı testler iki safhada gerçekleşir. İlk safhada preparatın antimikrobiyal aktivitesinin hangi konsantrasyon ve temas süresinde olacağı test edilir. Suyun sertlik derecesi, organik kir gibi interfere edici maddelerin etkisi test edilir. Bunun için kantitatif süspansiyon testi önerilir. İkinci aşamada çeşitli yüzeyler üzerinde dezenfektanın kullanılabilirliği incelenir.

Fransız AFNOR testi, Alman DGHM testi ve Leuven testinin karşılaştırıldığı bir araştırmada;

- AFNOR testinde aynı sayıdaki bakteriyi öldürebilmek için daha yüksek dezenfektan solüsyonu kullanılması gerektiği,
- Leuven testinde, bakteri inokulumunun daha fazla ve organik materyal ile çevrili olması nedeniyle yapılması daha zor bir test olduğu,
- Aynı dezenfektan solüsyonunda en az mikrobisidal etkinin Leuven testi ile saptandığı, bununla birlikte en iyi sonucun ise DGHM testi ile elde edildiği bildirilmiştir.

Yaklaşık 40 yıl önce Heicken'in geliştirdiği yüzey dezenfeksiyonunda dezenfektanların antibakteriyel etkisinin araştırıldığı yöntemde; dezenfektanlar yalnızca süspansiyon olarak kullanılmış ve taşıyıcı sistemi geliştirilmiştir. Daha sonra DGHM, bu tekniği hastanelere adapte etmiştir. DGHM testinde dezenfektanın etkisi 2 fazda incelenmektedir. İlk fazda bir preperasyonun antibakteriyel etkisi



olup olmadığına bakmak için kalitatif süspansiyon testi kullanılmaktadır. Esas testte ise hazırlanan preparasyonun konsantrasyonunun yüzey dezenfeksiyonu için uygun olup olmadığına anlaşılması için gerekli işlemler yapılır. Bu yöntem Leuven tekniği denilen semi-kantitatif test geliştirilerek hazırlanmıştır.

Van-Klingeren ilk olarak yıkama yöntemini kullanarak canlı kalan mikroorganizma sayısını saptama yöntemini uygulamıştır. DGHM yönteminde, araştırmacının yıkama yöntemini kullanarak ya da Rodac plaklarını kullanarak sayım yapabilmek gibi iki seçeneği vardır.

Daha yeni bir yöntem olan Fransız AFNOR testinde ise yüzey yıkanarak mikroorganizma sayısı hem yıkantı sıvısında hem de test edilen yüzeyden alınan örnekten sayılarak tespit edilir. Teorik olarak bu 3 yöntem karşılaştırıldığında bu yöntemlerin tam olarak eşit sonuçlar vermediği çünkü her testin daha önemle üzerinde durduğu noktaların farklı olduğu bilinmektedir.

Bu 3 testin yapıllarına bakılacak olursa; birinci aşamada, her 3 yöntemde de 37°C'de 24 saatte TSA besiyerinde üretilen bakteri kültürü kullanılır. Elde edilen bu mikroorganizmalar AFNOR testinde %0.1 tripton-%0.85 NaCl içeren solüsyonla yıkanır. DGHM ve Leuven testlerinde ise 10 mL tripton ile yıkanır. Sonraki aşamada AFNOR testinde, elde edilen yıkantı filtreden süzülür ve 19 mL bakteri süspansiyonuna 1 mL %10'luk "skim milk" eklenerek yoğunluk standardize edilir. DGHM ve Leuven testlerinde ise yıkantı sıvısının yoğunluğu  $10^8$  hücre/mL olacak şekilde ayarlanır.

Mikroorganizma inokülumları bu şekilde hazırlandıktan sonra bakteri süspansiyonu ile test edilen yüzeyler kontamine edilir. Bu işlem AFNOR testinde, bakteri süspansiyonunun 0.05 mL'si ile yapılır ve yüzey 45 dakika 37°C'de kurutulduktan sonra yüzeyin üzerine dezenfektan solüsyonu eklenir. AFNOR testinde bu işlem sırasında etüv ısısının kullanılmasına rağmen DGHM ve Leuven testlerinde gerçek koşulları sağlayabilmek amacıyla kurutma işlemi oda ısısında gerçekleştirilir. DGHM testinde kurutma süresi olarak 90 dakika beklenirken Leuven testinde bu süre 60 dakikadır. DGHM testinde bakteri süspansiyonu tüm yüzey alanını kaplayacak şekilde 0.1 mL olarak kullanılır. Leuven testinde ise yayma işlemini tam olarak gerçekleştirebilmek amacıyla drigalski kullanılır. Dezenfektanın dilüe edilmesi aşamasında DGHM testinde standart sertlikte su kullanılır. Dezenfeksiyon için dezenfekte edilmek istenen yüzey üzerine bu solüsyonun 0.2 mL'si tüm yüzeyi kaplayacak şekilde püskürtülür. AFNOR testinde yüzeyin üzerine 1 mL dezenfektan solüsyonu eklenir. Leuven testinde de yapılan işlem çok farklı değildir. Daha sonra AFNOR testinde 15 dakikalık bir bekleme süresini takiben yüzey 100 mL tripton içine daldırılır ve 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Daha sonra örnek, "Plate Count Agar (PCA)" üzerine yerleştirilir ve üzerine ince bir tabaka daha PCA dökülür. Yıkantı sıvısı ise 0.45 µm porları olan membran filtre ile süzülüp filtre kağıdı tripton ile yıkanarak PCA plağına konur. Tüm plaklar, 48 saat inkübe edilir. DGHM testinde ise 30 ve 60 dakikalık 2 farklı bekleme süresini takiben yüzey, inaktivatör eklenmiş olan TSA besiyeri içeren Ro-

dac plaklarına yerleştirilir. Üzerine steril bir ağırlık konup 2 dakika beklenir. Sonra örnek alınıp başka bir Rodac plağına koyulur ve 2 dakika sonra da alınıp diğer plağına koyulur. 37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonrasında bu 3 plaktaki canlı kalan mikroorganizma sayısı hesaplanır.

Sonuç olarak bu 3 test karşılaştırıldığında süre olarak, fiyat olarak ve çalışma zorluğu olarak aralarında çok önemli derecede fark yoktur. Ancak yapılan çalışmada birçok dezenfektanın Leuven testinde etkisiz bulunurken AFNOR ve DGHM testlerinde aktif buldukları bildirilmektedir. Bunun ötesinde elbette ki aynı marka altındaki tüm dezenfektanların her ülkede aynı içeriğe sahip olduğunun garantisini kimse veremez. Bu nedenle tespit edilen bu farklılıklar, testlerin farklı ülkelerde yapılmış olmasından da kaynaklanabilir. Aynı araştırmacının yayınladığı bir başka çalışmada ise bu 3 teste Hollanda QCT testi ve Hollanda-Belçika QSDT testleri eklenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu tekniklerde her ne kadar yöntem olarak Tablo 1'de görüldüğü gibi birtakım farklılıklar olsa da Kendall'ın nonparametrik analizi sonucunda istatistiksel olarak dördü arasında güçlü bir korelasyon olduğu saptanmıştır. AFNOR testi diğerleri ile korele çıkmamıştır.

ABD'de ise durum Avrupa'ya benzemektedir. Seksen yıldır ABD hükümeti bu konunun üzerinde hassasiyetle durmaktadır. AOAC "use-dilution" testi, dezenfektanların aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan en eski yöntemlerden biridir ve 1953 yılında Stuart, Ortenzio ve Friedl isimli araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. AOAC testi, pratikteki dezenfeksiyon işlemi için hala en etkili olan en düşük konsantrasyondaki dezenfektan miktarının hesaplanması amaçlanmaktadır. Son yıllarda bu testin 32'den fazla modifikasyonu ortaya çıkmıştır. AOAC testinde, taşıyıcı, test organizmasını içeren kültür içerisine yerleştirilip daha sonra kurutulur, dezenfeksiyon dilüsyonunun içerisine atılır ve 10 dakika sonra subkültür için sıvı besiyerine alınır. On paralel çalışmada ve 6 seride toplam 59 subkültür tüpünde üreme olmaması durumunda denenen preparat testi geçmiş demektir.

<b>Tablo 1. Beş test tekniğinin kıyaslanması.</b>					
	<b>AFNOR</b>	<b>DGHM</b>	<b>Leuven</b>	<b>QCT</b>	<b>QSDT</b>
Bakteri süspansiyonunun yüzey üzerinde kurutulma süresi	45 dakika	90 dakika	60 dakika	80 dakika	60 dakika
Sıcaklık	37°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Dezenfektan miktarı	1.0 mL	0.2 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Yüzey başına organik madde miktarı	0.30 mg	2.25 mg	2.25 mg	0.03 mg	2.25 mg
Dezenfektan hacmi (mL) başına organik madde miktarı	0.3 mg	11.2 mg	22.5 mg	0.3 mg	22.5 mg

**Tablo 2. Testlere göre 29 dezenfektandan başarısız bulunanlar.**

Test tekniği	Test tipi	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442
İn vitro test	Kantitatif süspansiyon testi	5	4
Avrupa süspansiyon testi	Kantitatif süspansiyon testi		
Temiz koşullar		3	6
Kirli koşullar		4	9
Kelsey Sykes testi	Kapasite testi	9	18
Temiz koşullar			
“Use-dilution” yöntemi	Taşıyıcı testi	8	22
AOAC testi			
Yüzey dezenfeksiyon testi	Pratik test	4	3
DGHM testi			
AFNOR testi	Pratik test	5	16
Leuven testi	Pratik test	8	19
Kantitatif taşıyıcı testi	Pratik test	8	13
Kantitatif yüzey dezenfeksiyon testi	Pratik test	9	4

Kelsey Sykes testinde ise aynı dezenfektan solüsyonuna 3 kez, 8 dakika arayla mikroorganizma eklenir ve her ekleme sonrasında örnek, sıvı besiyeri içeren 5 subkültür tüpüne alınır. Bu orjinal yöntem, ATCC suşu, hazırlık kültürü için trip-tik soy sıvı besiyeri ve test besiyeri olarak Lethen besiyeri kullanılması ve inkübasyonun 37°C’de yapılması zorunluluğu getirilerek modifiye edilmiştir. Sonuç olarak ilk ya da ikinci kez mikroorganizma eklendiğinde 5 tüpten 2’sinde ya da daha azında üreme varsa preparat testi geçmiş sayılır.

Reybrouck’un yayınlamış olduğu bir makalede, AOAC “use-dilution” testi ve Kelsey Sykes testlerinin temiz koşullarda birbirleri ile uyumlu oldukları ve aynı zamanda Avrupa süspansiyon testleri ile de korele oldukları (sadece *S. aureus* kullanıldığında) bildirilmiştir. AOAC testi ve AFNOR testi arasında iyi bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Süspansiyon testleri de taşıyıcı testleri ve kapasite testlerinde olduğu gibi QSDT ile AFNOR ve DGHM’ye kıyasla daha az korelasyon gösterir.

AOAC “use-dilution” testi, *P. aeruginosa* varlığında yüzey dezenfektanlarının etkinliğini ölçen en üstün testtir. *S. aureus* varlığında ise en üstün test Kelsey Sykes testidir. *S. aureus*, test organizması olarak kullanıldığında, AOAC’de QCT ve QSDT gibi temiz koşullarda en az Kelsey Sykes testi kadar başarılıdır.

Dezenfektanlar, gram-pozitif bir bakteri olan *S. aureus*, gram-negatif bir bakteri olan *S. choleraesuis* ile yapılan “use-dilution” testlerini geçtiklerinde Federal Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafında “sınırlı olarak dezenfeksiyon

sağlayan” ürün olarak, eğer üçüncü bir test organizması olarak *P. aeruginosa*’ya da etkili olarak bulunmuş ise “hastanede ve çevrede kullanılabilir dezenfektan” olarak onaylanmaktadır. Ancak mantarlara, virüslere ve sporlara olan etkinin ayrıca uygun test verileri ile belirtilmesi gerekmektedir. Fungusidal, sporosidal ve tuberkülosidal aktivite için kullanılabilir. AOAC yöntemleri de mevcuttur. Fungusidal aktivite testinde test organizması olarak *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 konidia süspansiyonu, sporosidal test için test organizması olarak *Bacillus subtilis* ya da *Clostridium sporogenes* ATCC suşlarının sporları, tuberkülosidal test için test organizması olarak *Mycobacterium bovis* kullanılır.

Virüsidal test için ise uzun yıllardır, 1963 yılında Klein ve Deforest tarafından geliştirilmiş olan yöntem kullanılmaktadır. Son yıllarda EPA ve ASTM (American Society for Testing and Materials) virüsler için standart metodu incelemeye almışlardır. Bu konuda test virüsleri, substratlar, substrat toksisitesi ve diğer birçok teknik problem vardır.

#### KAYNAKLAR

1. Abbasoğlu U. Dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine etkinliğini ölçen testler. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003:326-33
2. Cole EC, Rutala WA, Samsa GP. Disinfectants. J Assoc Off Anal Chem 1988;71:6.
3. Çağlar K. Dezenfektanların etkinliğini ölçen testlerin birbirlerine avantajları ve dezavantajları. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 334-43.
4. Gelinas P, Goulet J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. J App Bacteriol 1983;54:243-7.
5. Gröschel DHM. Disinfectants testing in the USA. J Hos Inf 1991;18(Suppl A): 274-9.
6. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants. I Zbl Hyg 1990;190:479-91.
7. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants. II Zbl Hyg 1990;190:492-9.
8. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants. III Zbl Hyg 1990;190:500-10.
9. Reybrouck G. International standardisation of disinfectant testing: Is it possible? J Hos Inf 18(Suppl A):280-8.
10. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants. IV Zbl Hyg 1992;192:432-7.
11. Reybrouck G. The testing of disinfectants. Int Biodeterioration Biodegradation 1998;41:269-72.
12. Sultan N. Dezenfektan etkinlik testlerinde hangisini, hangi durumlarda kullanmalıyız. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003:344-53.
13. Türk Standardı: TS 12451, 1998.
14. Türk Standardı: TS EN 1276, 2001.
15. Trout JR. Statistical examination of AQAC use-dilution method for testing disinfectant efficacy. J Assoc Off Anal Chem 1985;68:763-5.