

---

---

# Dezenfektanların Mikroorganizmalar Üzerine Etkinliğini Ölçen Testler

*Prof. Dr. Ufuk ABBASOĞLU*

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

---

---

**D**ezenfeksiyon, mikrobiyal kontaminasyonu en aza indirmekten sterilizasyona kadar uzanan geniş bir kavramdır ve genellikle dezenfektan denilen maddeler aracılığıyla uygulanır.

Dezenfektanlar; 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 olabileceğinden belli aralıklarla durum değerlendirmesi yapılmalıdır.

Dezenfektan madde özellikle bir mikroorganizmaya karşı kullanılacaksa, imalatçıdan belge istenmelidir. Dezenfektan maddenin referans laboratuvarında mikrobiyolojik aktivite tayininin yapılmış olması gerekir. Bunun yanında toksik, alerjik ve tahriş edici bilgileri de içermelidir.

Dezenfektan maddelerin etkinliğini belirlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Tüm yöntemlerin amacı aynıdır. Dezenfektan maddenin formülasyonuna, dezenfektanın kullanma alanına, etkili olabileceği mikroorganizma spektrumuna, ortamda bulunabilecek organik ya da inorganik bulaşlara bağlı olarak bu yöntemlerden biri veya birkaçı kullanılır.

Ülkelerarası farklı kuruluşlar benzer standartlara yer vermiştir. “American Association of Official Analytical Chemist (AOAC)”, “German Society for Hygien and Mikrobiology [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 belli aralıklarla belirlediği yöntem standartları kullanılmaktadır.

Tüm yöntemlerdeki genel prensip, denenecek dezenfektan maddenin sulandırılmalarının, belirli mikroorganizmalarla karşılaştırılmasıdır. Çeşitli temas süreleri sonunda mikroorganizmanın canlı kalması, ne kadarının öldüğü ve hangi yoğunluktaki dezenfektanın etki gösterdiği testin sonucunu belirler. Testlerdeki dezenfektan sulandırma sınırları, seçilen mikroorganizma suşları ve yoğunlukları, temas süreleri, ortamdaki bozucu ve organik maddeler seçilen yöntemlere göre değişiklik gösterse de sonuçlar ve yorumlar benzer şekilde değerlendirilir.

Dezenfektanların antimikrobiyal etkisini belirlemede çeşitli safhalar ve ardından izlenecek adımlar vardır. Dezenfektanın temel aktivitesi için süspansiyon deneyleri safha 1; uygulamadaki kullanımı temsil eden koşullar altındaki süspansiyon deneyleri safha 2-adım 1; uygulama koşulları benzeyen el yıkama, yüzey deneyleri gibi çalışmalar safha 2-adım 2; uygulama koşullarındaki alan deneyleri safha 3 olarak nitelendirilir. Her birinin detayları monografılarla belirlenir.

Genel amaçlı ve ilk inceleme safhasında dezenfektan maddenin antimikrobiyal etkisinin varlığı araştırılır. Ön tarama testi olarak kullanılan bu testlerde dezenfektanın etkili yoğunluğu ve mikroorganizma ile en az temas süresinin saptanması belirlenir. Dezenfektanların inhibisyon kat sayılarını, inferior letal kat sayılarını, süperior letal kat sayılarını ve fenol kat sayılarını belirleme testleri safha 1 grubunda yer alan testlerdir.

Daha sonraki safhada yapay, kontamine bir alan hazırlanır ve dezenfektanla bu ortam belirli sürelerde temasa bırakılır. Bu süre sonunda canlı kalan mikroorganizmalar sayılarak, dezenfektanın etkisi kantitatif olarak belirlenir. Bu safhanın önemli bir adımı da, ortama inorganik ya da organik maddeler katarak, dezenfektanın gücünün belirlenmesidir. Tüm uygulanan testler “seyreltme-nötralleştirme yöntemi” denilen aynı prensipteki testlerdir. Uygun bir nötralleştirici bulunmadığı zaman “membran süzme yöntemi” kullanılır. Vejetatif bakterilere, mantar ve mayalara, bakteri sporlarına, mikobakterilere ve virüslere karşı etkileri belirlenecek dezenfektanlar için benzer prensipler uygulanır. Yalnızca mikroorganizma çeşitleri, üretme besiyerleri, sulandırma sınırları, inkübasyon sıcaklık ve sürelerinde farklılıklar vardır. Kaynaklarda dezenfektan maddelerin aktivite ölçüm yöntemlerini sınıflandırırken de bu etki spektrumu öne çıkmıştır.

Tüm testlerde amaç ve uygulama sırası çok benzer şekildedir. Dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “seyreltme-nötra-

lizasyon ve membran filtre tekniği”nde uygulanan aşamalar aşağıda bildirildiği şekildedir.

### **Seyreltme-Nötralizasyon ve Membran Filtre Testinin Yapılışı**

a.  $6 \times 10^2$ - $3 \times 10^3$  “colony forming unit (cfu)"/mL'lik bakteri süspansiyonu hazırlanır.  $10^{-1}$ 'lik çözeltiliden iki ayrı petriye 1 mL konur.  $45^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş 12-15 mL TSA ilave edilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

b. Seçilen bozucu madde (1 mL),  $6 \times 10^2$ - $3 \times 10^3$  cfu/mL'lik bakteri süspansiyonu (1 mL) ile birlikte tüpe konur. İki dakika  $0^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda tutulur. Süre sonunda 8 mL sert su ilave edilir. Kronometre çalıştırılır. Belirli temas süreleri sonunda iki ayrı petriye 1 mL'lik örnekler konur.  $45^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş 12-15 mL TSA ilave edilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

c. Seçilen bozucu madde (1 mL) ve  $6 \times 10^2$ - $3 \times 10^3$  cfu/mL'lik bakteri süspansiyonu (1 mL) ile birlikte tüpe konur. İki dakika  $0^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda tutulur. Süre sonunda 8 mL sert su ilave edilir. Kronometre çalıştırılır. Belirli temas süreleri sonunda iki ayrı petriye 1 mL'lik örnekler konur ve 50 mL durulama sıvısı içeren ve membranlı iki ayrı süzme cihazına aktarılır, süzülür. 50 mL su ile durulanır. Membranlar iki ayrı TSA'lı petri kutularına yerleştirilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

d. Nötralleştirici (1 mL) ve  $6 \times 10^2$ - $3 \times 10^3$  cfu/mL'lik bakteri süspansiyonu (1 mL) ile birlikte tüpe konur. Kronometre çalıştırılır. Karışım beş dakika  $20^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda tutulur. Temas süresi sonunda karışımdan iki ayrı 1 mL'lik örnek iki ayrı petriye konur.  $45^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş 12-15 mL TSA ilave edilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

e.  $6 \times 10^2$ - $3 \times 10^3$  cfu/mL'lik bakteri süspansiyonundan iki ayrı 0.1 mL'lik örnekler, membranlı 50 mL durulama sıvısı bulunan, iki ayrı süzme cihazına aktarılır. 50 mL su ile durulanır. Membranlar iki ayrı TSA'lı petri kutularına yerleştirilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

f. Bozucu madde (1 mL), seyreltici (1 mL) ile karıştırılır. En yoğun dezenfektan çözeltilisinden (8 mL) ilave edilir. Karışımdan 1 mL,  $20^\circ\text{C}$ 'deki 8 mL nötralleştirici içeren tüpe alınır. Beş dakika tutulur. Üzerine  $6 \times 10^2$ - $3 \times 10^3$  cfu/mL'lik bakteri süspansiyonu (1 mL) konur. Otuz dakika  $20^\circ\text{C}$ 'de bırakılır. Süre sonunda iki ayrı petriye 1 mL'lik örnekler konur.  $45^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş 12-15 mL TSA ilave edilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

g. Bozucu madde (1 mL), seyreltici (1 mL) ile karıştırılır. En yoğun dezenfektan çözeltilisinden (8 mL) ilave edilir. İki ayrı 0.1 mL'lik örnekler, membranlı 50 mL durulama sıvısı bulunan, iki ayrı süzme cihazına aktarılır. 50 mL su ile durulanır.

İçinde durulama sıvısı bulunan kaplardaki membranlar üzerine  $6 \times 10^2 - 3 \times 10^3$  cfu/mL'lik bakteri süspansiyonu (0.1 mL) ilave edilir. Süzülür, durulandıktan sonra iki ayrı TSA yüzeyine yerleştirilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

h. İçinde cam boncuk (5 g) olan 100 mL'lik balona seyreltici (10 mL) konur. Üzerine ikinci veya üçüncü pasajı yapılmış bakteri kültüründen bir öze dolusu konur. Üç dakika karıştırarak süspense edilir. Cam boncuklardan ayrılan kültür,  $1.5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$  cfu/mL'ye seyreltici ile ayarlanır. Seyreltici ile  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ 'lik seyreltikler hazırlanır. Her seyreltikten 1 mL iki ayrı örnek alınır ve petrilere konur.  $45^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş 12-15 mL TSA ilave edilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

i. Bozucu madde (1 mL) üzerine,  $1.5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$  cfu/mL'lik bakteri süspansiyonundan (1 mL) konur. Sonra denenecek dezenfektandan (8 mL) ilave edilir. Kronometre çalıştırılarak belirli temas süreleri sonunda, içinde nötralleştirici (8 mL) ve su (1 mL) içeren bir tüpe 1 mL alınır.  $20^\circ\text{C}$ 'de beş dakika nötralleştirme sonunda iki ayrı 1 mL'lik örnek ayrı petrilere konur. Üzerine  $45^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş 12-15 mL TSA ilave edilir.  $36^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Birinci ve ikinci günlerde canlı bakteriler sayılır.

mL'deki canlı bakteri (koloni oluşturan) sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır.

$$\frac{c}{(n_1 + 0.1 n_2)d}$$

c: Değerlendirmeye alınan bütün petrilere koloniler toplamı.

$n_1$ : İlk seyreltikte değerlendirmeye alınan örnek petri sayısı.

$n_2$ : İkinci seyreltikte değerlendirmeye alınan örnek petri sayısı.

d: Hesaba katılan ilk seyreltmeye karşılık gelen seyreltme faktörü.

Sonuç olarak cfu/mL sayısı, 1.0 ve 9.9 arasında bir sayı ve 10'un uygun bir kuvvetinin çarpımı şeklinde ifade edilir.

Dezenfektan etkinliğinin ölçülmesinde kullanılan testler farklı kriterlere göre sınıflandırılmıştır.

#### A. Test mikroorganizmalarına 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, Sporistatik-sporisidal, 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 ve derinin dezenfeksiyonunun yeterliliğini saptama testleri
  3. Uygulama testleri
- D. Testin amacına göre sınıflandırma
1. İlk test aşaması: İlk adım testleri, tarama testleri
    - Kimyasal maddenin veya preparatın antibakteriyel özelliğinin olup olmadığının saptanması
    - Maruz kalma süresi ve dezenfektan solüsyonuyla ilişkili bir etkinliğin saptanması
    - Organik madde, serum varlığının etkisi
  2. İkinci test aşaması: Özel kullanımlar için dezenfektanın kullanılan dilüsyonun 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.

Mikroorganizmalara göre yapılan sınıflandırmaya göre dezenfeksiyon testleri aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

### 1. Bakterisidal Aktivite Testi

Vejetatif bakterilerle yapılan testlerde; *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10536 ve *E. hirae* ATCC 10541 suşları kullanılır. Suşla-

rın çoğaltılması ve canlı bakteri sayımı için Tripton Soya Agar (TSA) besiyeri kullanılır. Bu standartta tarif edilen bakterisidal etki, dezenfektanın belirli koşullar altındaki, yukarıda belirtilen suşlara ait canlı bakteri sayısında en azından  $10^5$ 'lik bir azalma meydana getirme gücüdür. Azalma oranları desimal logaritma olarak ifade edilir.

## 2. Fungisidal Aktivite Testi

Test organizması olarak *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, besiyeri olarak Malt Ekstrakt Agar (MEA) kullanılır. Deneyde *C. albicans*'ın vejetatif hücreleri, *A. niger*'in ise sporları  $1.5 \times 10^7$ - $5 \times 10^7$  cfu/mL yoğunluğunda kullanılır. İnkübasyonları da  $30^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saattir. Deney sonunda test organizmaları 60 dakikada  $10^4$  veya daha fazla canlılıkta azalma göstermişlerse, dezenfektan için "fungisidal aktiviteye sahip" denir.

## 3. Tüberkülosit Aktivite Testi

Hızlı üreyen *Mycobacterium smegmatis* CIP 7326 referans suşu test bakterisi olarak kullanılır. Taşıyıcı olarak porselen silindirlerin kullanıldığı testlerde, ilk olarak 10 dakikalık temas süresi denir. İleri adım deneylerinde, dezenfektan sert su ile seyreltilerek ortama serum ilave edilir. On taşıyıcıdaki test organizmasını öldüren en yüksek dezenfektan seyreltiğine "tüberkülosit etkili dezenfektan" denir.

## 4. Virüsidal Aktivite Testi

Bakteriler ve fungiden farklı olarak, besiyeri olarak doku kültürleri, embriyolu yumurta ve deney hayvanları kullanılır. Testlerde kullanılan virüslerin lipid zarlı oluşları, revers transkriptaz enzimi taşımaları, doku kültürlerinde "Cyto Pathogen Effect (CPE)" yapabilmeleri seçilecek besiyerini ve yöntemi belirler. Son yıllarda bakteriyofajlar da dezenfektan etki çalışmalarında kullanıma girmiştir. Esas test öncesi kullanılan virüsün, %50 infeksiyon oluşturma kapasitesini belirlemek için titresi saptanır. Dezenfektanla temas ettikten sonra bu titredeki azalma, dezenfektanın etki gücünü ortaya koyar. Dezenfektanların virüsleri inaktive edip etmediklerini belirlemek için en yaygın olarak kullanılan testler doku kültürlerinde uygulanmaktadır. Virüse etkisinin araştırılmasında, belirlenen bu toksik olmayan yaygın olarak kullanılan testler doku kültürlerinde uygulanmaktadır. Denenen dezenfektan dilüsyonları önce doku kültürü yüzeyinde tutularak, dezenfektanın dokuya toksik olmadığı en yüksek konsantrasyon belirlenir. Virüse etkisinin araştırılmasında, belirlenen bu toksik olmayan konsantrasyondaki dezenfektan, belirlenmiş infeksiyözitedeki virüsle karıştırılıp doku kültürlerine inoküle edilir. Farklı virüsler ve bu virüslerin üreyebildiği doku kültürleri ile çalışılır. Dezenfektanın etkisi, virüsün infeksiyözitesindeki azalma yanında, doku kültüründe oluşturduğu hasara göre de değerlendirilir. Ayrıca, şişedeki besiyeri dökülüp, canlı kalan virüsler boyanarak saptanan plak sayıları makroskobik olarak da görülür.

Hepatit B virüsü (HBV) ile ancak deney hayvanlarında çalışmalar yapılmaktadır. Deney hayvanı olarak şempanzelerin kullanıldığı bir testte, dezenfektanla temas ettirilmiş ve ettirilmemiş HBV ile şempanzeler infekte edilmiş, hayvanın kanında HBsAg gösterilmesi virüsün canlı kaldığını göstermiştir. Benzer şekilde ördük HBV ile ördüklerde *in vivo* çalışmalar vardır.

Dezenfektanla temastan sonra virüsün, elektron mikroskopundaki morfolojik değişime uğraması da belirlenebilir.

Materyaller üzerindeki artık virüsün jel filtrasyonla saptanması, selüloz nitrat filtratlara adsorbe edilmiş virüsün belirlenmesi şeklindeki testler kullanılmaktadır. Uluslararası bir standardizasyonu gerçekleştirilmemiş olan virüsidal testlerde kontrollerin kullanılması yanında, en az üç paralel seri ile çalışılmalıdır.

### 5. Sporisit Aktivite Tayini

Dezenfektan ve nötralizan ile spor süspansiyonu karışımının belirli sıcaklık ve sürede inkübasyonundan sonra karışımdaki kolonilerin sayılması esasına dayanır.

*Bacillus cereus* CIP 7803 ve *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, CIP 7718 48 saat, 30°C'de, *Clostridium sporogenes* CIP 7939 48 saat, 36°C'de inkübe edilerek kullanılır. Her suş için mL'de 2-6 x 10<sup>3</sup> canlı spor taşıyan süspansiyonlar hazırlanır. Sporların hazırlanması: Besiyerine [maya özütü (2.5 g), tripton (5 g), glikoz (1 g), su (1000 mL)] 10<sup>6</sup> bakteri sporu ekilir ve 30°C'de inkübe edilir. 10<sup>7</sup> bakteri/mL'lik kültür hazırlanır. İçinde et özütü (10 g), maya özütü (2 g), mangansülfat (0.04 g), agar agar (25 g) ve su (1000 mL) olan şişelere, bu kültürden 2-3 mL konarak 30°C'de 8-10 saat inkübe edilir. Kültür dört kez yıkanarak santrifüjlenir. Sonuncu süspansiyon 4°C'de korunur. Suyu seyreltilen sporlar, kristal viyole ile üç-dört dakika boyanarak mikroskopta sayılır. Esas test için, aminoasit (1 g), nişasta (1 g), glikoz (2.5 g), et özütü (5 g), demir-2-sülfat (0.1 g), mangansülfat (0.0001 g), agar agar (18 g) ve su (1000 mL) içeriğindeki, pH 6.8 olan besiyeri kullanılır. Anaerop sporlu bakteriler için besiyeri ve inkübasyon koşulları farklıdır.

Deneyler her mikroorganizma için ayrı yapılır. 1, 5, 15, 30, 45 veya 60 dakikalık süreler için denir. Deneyde kullanılan bozucu maddenin, nötralleştiricinin, seyrelticinin mikroorganizma karşısındaki kontrolleri de yapılır. Bu maddelerin mikroorganizmayı etkilememesi yani canlı sayısı deney öncesiyle aynı kalmalıdır. Deney başlangıcındaki mikroorganizma sayısı mutlaka belirlenir ve esas test sonrası azalan mikroorganizma oranı değerlendirilir.

Seçilen tüm testlerde, kullanılan suyun taze damıtık, steril su olması gerekir. İleri adım çalışmalarında dezenfektanın sulandırımı sert suyla yapılır. Dezenfektanları seyreltmek için kullanılan sert su; çözelti A (19.84 g susuz MgCl<sub>2</sub> ve 46.24 g susuz CaCl<sub>2</sub>/L)'nin 6 mL'sine 600 mL su ve 8 mL çözelti B (35.02 g/L NaHCO<sub>3</sub> sudaki çözeltisi) ilave edilip, suyla 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır. Filtrasyonla sterilize edilip kullanılır. Test edilecek dezenfektanın iki katlı sulandırımı tercih edilir. Katı ürünlerden en az 1 g alınıp, su ile hacim/hacim şeklinde hazırlanır.

Raporda deney konsantrasyonu hacim/hacim veya ağırlık/hacim şeklinde kaydedilir. Kullanılan mikroorganizmaların çalışma kültürleri stok kültürlerden iki veya üç pasaj yapıldıktan sonra kullanılır. Testte kullanılan tüm çözücü, sulandırıcı ve besiyerleri ile  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de çalışılır. Seyreltici olarak tripton sodyum klorür çözeltisi veya su kullanılır. Test sırasında zaman, sıcaklık ve ilave suşlar da katılabilir. Nötralleştirici madde olarak dezenfektan formülasyonuna uygun olarak seçilen aşağıdaki maddelerden herhangi birinin kullanılması önerilmektedir.

**Fenol yapılı dezenfektanlar için:**

Tween80 (3 mL), sodyum lauril sülfat (0.4 g), lesitin (0.3 g), su (100 mL)

Taze yumurta sarısı (0.5-5 mL), su (100 mL)

Taze yumurta sarısı (5 mL), tween80 (4 mL), lesitin (0.3 mL), su (100 mL)

**Aldehid yapılı dezenfektanlar için:**

Tween80 (3 mL), lesitin (0.3 g), 2-histidin (0.1 g), su (100 mL)

**Dört değerli amonyum yapılı dezenfektanlar için**

Taze yumurta sarısı (5 mL), tween80 (3 mL), su (100 mL)

Tween80 (3 mL), lesitin (0.5 mL), su (100 mL)

**Peroksit esaslı dezenfektanlar için:**

Katalaz veya peroksidaz enzimleri; bu enzimlerin bir birimi  $25^\circ\text{C}$  ve pH 7'de bir dakikada 1.4 mol hidrojen peroksiti parçalayacak aktivitede olmalıdır.

**Halojen yapılı dezenfektanlar:**

Sodyum tiyosülfatın %0.5 (m/V) çözeltisi

**Ağır metal taşıyan dezenfektanlar için:**

Sodyum tiyoglikolat, 0.5 g/L veya 5 g/L

%0.075 (V/V) tiyomalik asit (NaOH kullanarak pH'sı 7.2'ye ayarlanmış)

Sodyum tiyoglikolat, 0.5 g/L veya 5 g/L

L-sistein, 0.8 g/L veya 1.5 g/L

Testlerde yıkama sıvısı olarak kullanılan bazı çözeltiler ise:

Su ve tampon çözeltileri, %0.5'lik (V/V) tween80'in sulu çözeltisi ve 0.7 g/L le-sitindir.

Dezenfektan aktivite araştırma testlerinde, ortama konulan bozucu maddelerin, deneydeki son konsantrasyonun 10 katı olacak yoğunlukta hazırlanması gerekir. Bu amaçla; bovin albumin (0.3 g/L), süt (%1 V/V), maya özütü (10 g/L), sakkaroz (10 g/L), sodyum lauril sülfat (5 g/L) gibi maddeler kullanılmaktadır.

Test yapısına göre ise, benzer amaç ve işlemler fakat daha ayrıntılı testler uygulanmaktadır.



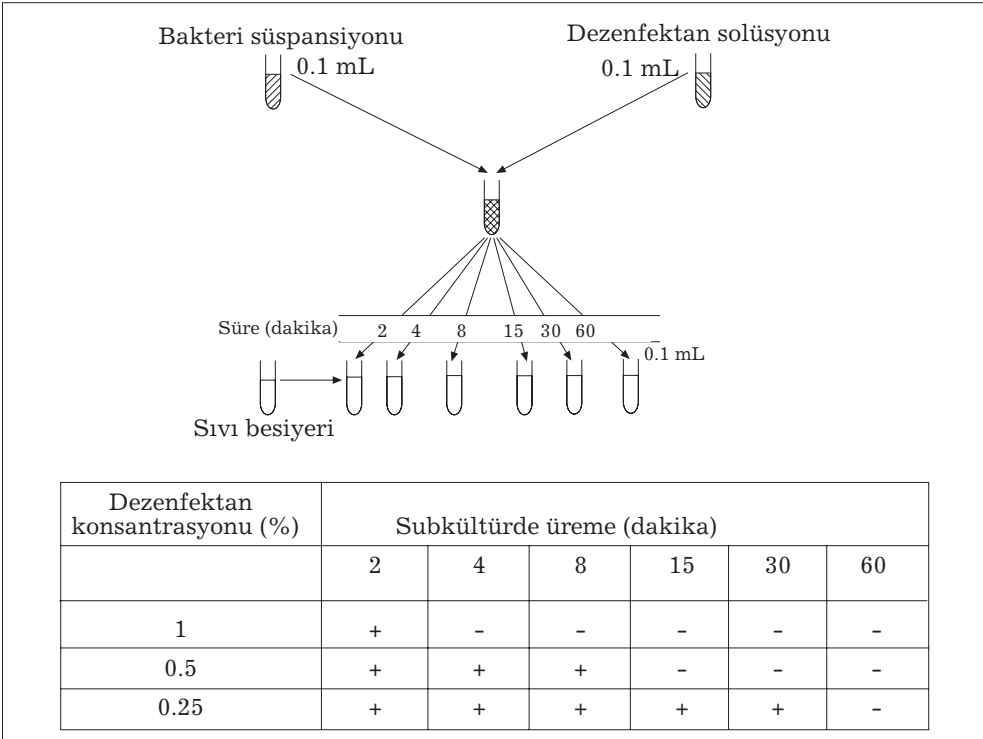
## SÜSPANSİYON TESTLERİ

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

Uygun bakteri volümü, inokulum miktarı, test edilecek dezenfektan konsantrasyonu, temas süresi ve bakterinin ölüp 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 ve değişik sürelerde test edilebilir. Organik maddeler veya sabun gibi potansiyel inhibitör maddeler eklenebilir veya sert su ve diğer faktörlerin etkisi incelenebilir.

### Kalitatif Süspansiyon Testi

Dezenfektanla bakterinin belirli bir süre temasından sonra pasajlanması esasına dayanan bu testte dezenfektanın yeterli veya yetersiz düzeyde olduğunun kanısına varılır. *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11229, *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşları kullanılarak, 2-60 dakikalık sürelerde çalışılır.

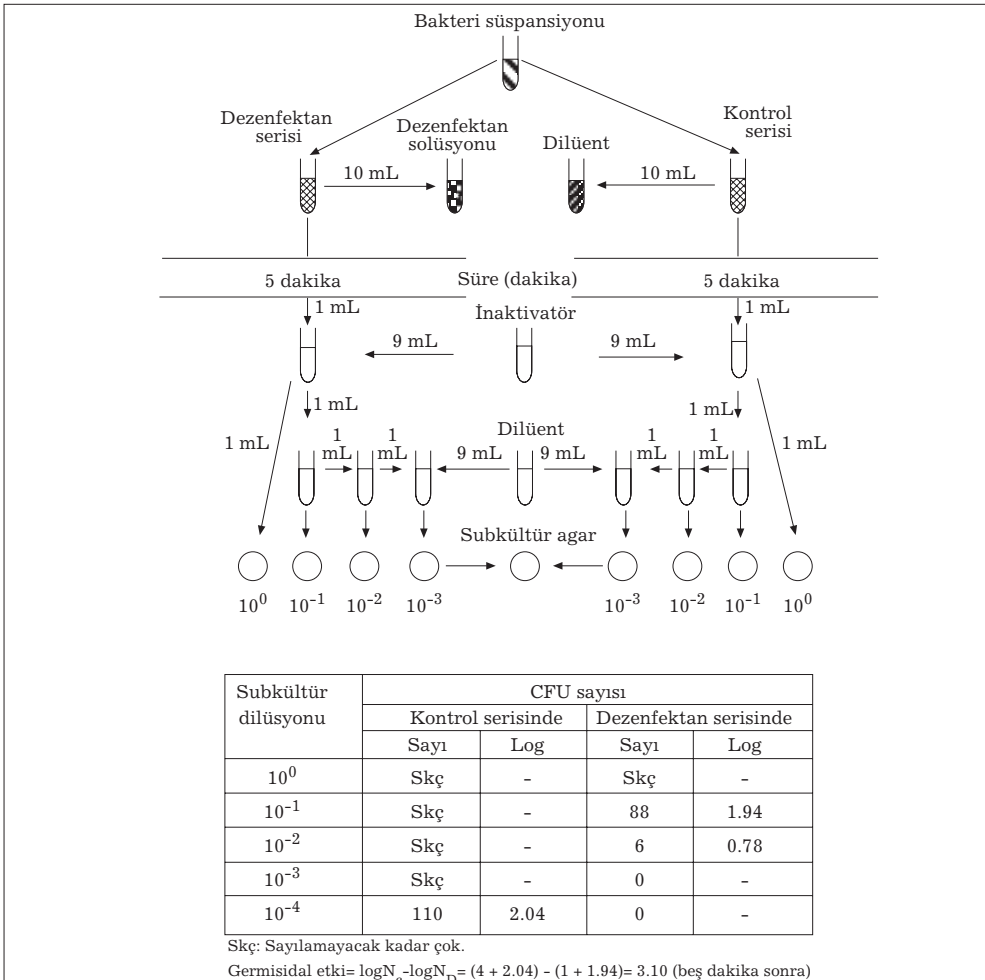


Şekil 1. Kalitatif süspansiyon testi (DGHM testi).

### Kantitatif Süspansiyon Testi

İlk inokulumdaki bilinen sayıdaki mikroorganizma ile, dezenfektanla temas ettikten sonra canlı kalan mikroorganizma sayısının kıyaslanmasına dayanan bir testtir. Beş mikroorganizma ile çalışılır. Testin amacına göre ortama süt katılır.

Bakteri dezenfektana maruz bırakıldıktan sonra canlı kalan bakteriler doğrudan kültür ya da membran filtre tekniğiyle sayılmaktadır. Doğrudan kültür tekniğinde 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 oluş-



**Şekil 2. Kantitatif süspansiyon testi: İn vitro test.**

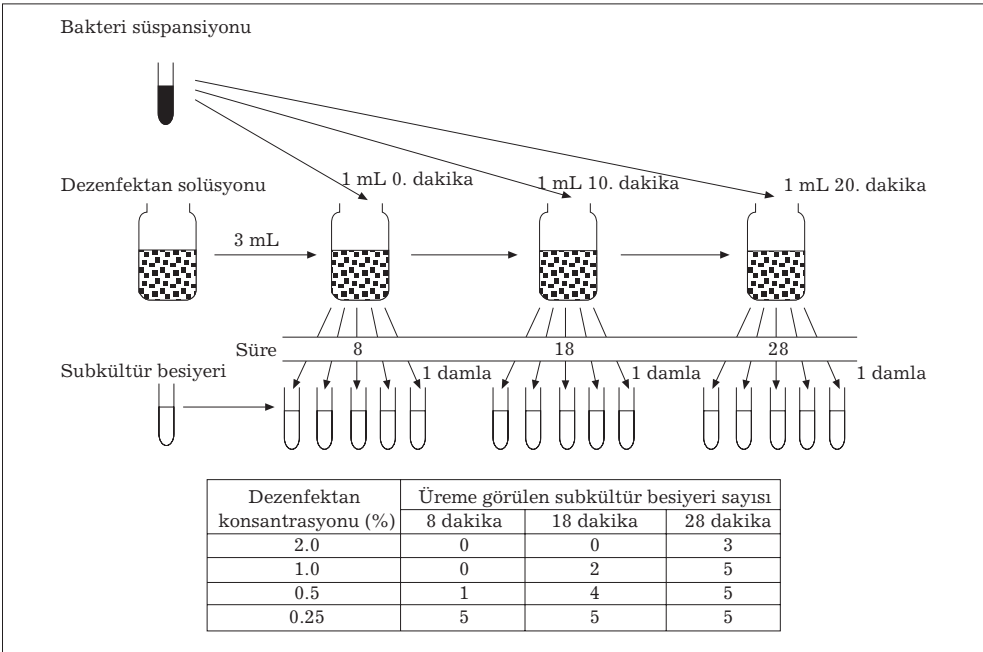
turan ünit,  $N_D$  ise denek grubunda dezenfektana maruz kaldıktan sonra oluşan koloni sayısıdır. Dökme plak tekniği de yüzey plak sayımı yerine kullanılabilir.

Hollanda'nın standart süspansiyon testi, Mossel modifikasyonuna dayanır. Bu test gıda endüstrisi için geliştirilmiştir ve bakteri dezenfektana maruz bırakılmadan önce albuminde süspansiyon edilmiştir. 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 beş test organizması (*Pseudomonas*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *S. cerevisiae*) test edilir. Beş dakika temas süresi uygulanır ve beş logaritmik etkiye 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.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de kullanılmaktadır.

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

### Kapasite Testi

Bu gruptaki en gelişmiş test "Kelsey Sykes" testidir. Dezenfektana birkaç kez bakteri eklenerek, dezenfektanın bakterileri öldürme kapasitesi gözlenir. Bu



Şekil 3. Kapasite testi: Kelsey-Sykes testi.

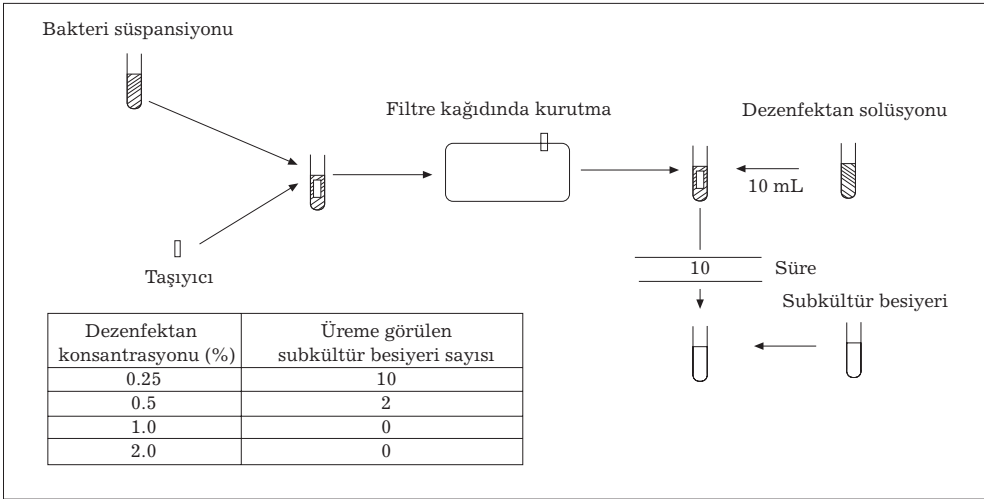
amaçla dezenfektana kontamine edilmiş bir materyal veya cihaz atılır. Artan mikroorganizma fazlalığı karşısında dezenfektanın aktivitesini koruması, kapasitesinin göstergesidir. Test bakterileri olarak *P. aeruginosa* NCTC 6749, *P. vulgaris* NCTC 4635, *E. coli* NCTC 8196 ve *S. aureus* NCTC 4163 kullanılır. Sert su ve organik materyal eklenir.

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 önceden 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 subkültürler 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 süspense edilir. Dezenfektan sert suyla sulandırılır ve 3 mL’lik başlangıç volümü ile başlanır (sert su: WHO hard water: 17.5 mL  $CaCl_2$  + 5 mL  $MgSO_4$ , 3300 mL saf suda çözülüp otoklavlanarak hazırlanır).

Başlangıç zamanı sekiz dakikadır. 1 mL bakteri süspansiyonu eklenir ve iki 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 eklemeden 30 saniye sonra pasaj yapılır.

### Taşıyıcı Testler

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 yirmi 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.



Şekil 4. Taşıyıcı testi: AOAC testi.

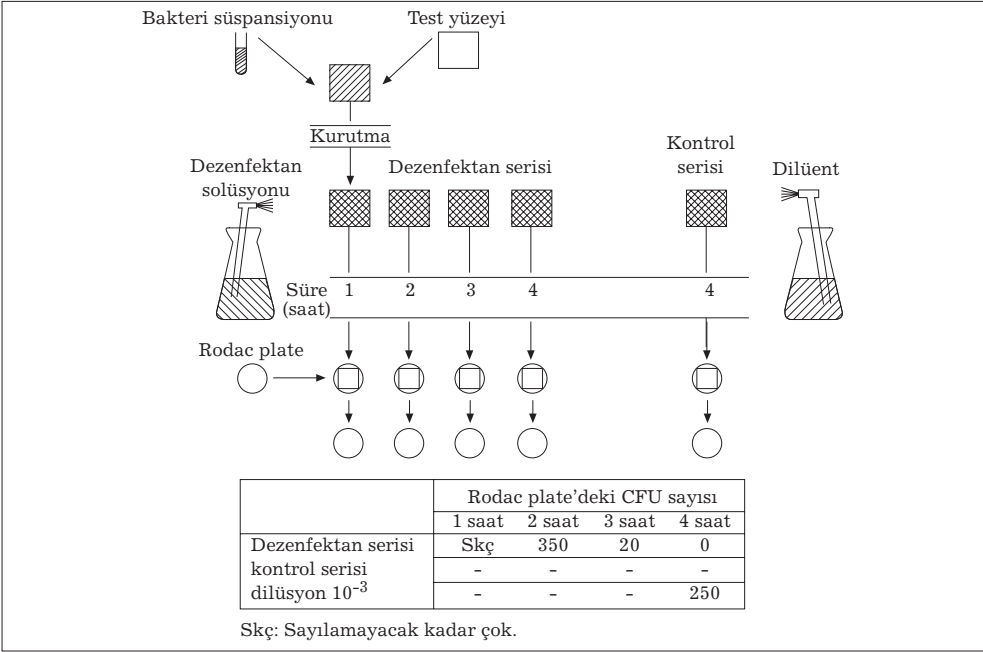
Sonra pasaj yapılır. Bu test fenol kat sayısı test sonucunu konfirme eder ve uygulama için en etkili konsantrasyonu belirler.

Metal parçaları, kateter gibi seçilen taşıyıcılar, yapay olarak kontamine edilip, dezenfektan seyreltiklerine batırılır. Belirli temas süresi sonrası sıvı besiyerine inokülasyonlar yapılır. Test bakterileri olarak *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *S. aureus* ATCC 6538 ve *P. aeruginosa* ATCC 15442 kullanılır. Deneyde 1 cm<sup>2</sup>'lik pamuk parçası, 15 dakika süre için bakteri süspansiyonuna daldırılır. Çalışmada beş bakteri kullanılır. Islak pamuk petriye alınıp, 15 mL dezenfektan eklenir. İki-yüz yirmi dakikalık her temas süresi sonunda pamuk taşıyıcı, nötralleştirici içeren bir sıvı besiyerine konur, yıkanır. Yeni besiyerine pasajlanır. Bu test, fenol kat sayısını belirleme test sonuçlarıyla doğrulanarak, dezenfektanın en yüksek seyreltiği belirlenir. Alet, yüzey, dokuma ve hava gibi mikroorganizma taşıyıcının farklı özellikte olduğu durumlarda da yöntemler benzerlik gösterir.

#### YÜZEY DEZENFEKSİYON TESTİ

Uygulama odasındaki çeşitli materyalden yapılmış malzemeler beş test bakterisiyle kontamine edilir. Belirli sıcaklık ve nem ortamında kurutulduktan sonra dezenfektan solüsyonu, aktif olmadığı belirlenen bir yüzeye püskürtülür. Otuz, 45, 60 ve 90 dakika veya bir, iki ve dört saat temastan sonra mikroorganizmalar kazıma, karıştırma veya ultrasonik işlemlerle geri alınır. Geri alma sıvısında seyreltme ve katı besiyerine inokülasyon sonrası canlı bakteriler sayılır.

Dezenfektanların kullanım etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, temizlikten sonra artık suyun toplandığı kovadan veya aletlerin bulunduğu kaptan bir miktar alınır. Ringer solüsyonuyla 1/10'luk çözeltisi hazırlanır. 0.02 mL'lik 10 damla, katı besiyeri yüzeyine damlatılır. 30-32°C'de 48 saat sonra, 10 damlanın beşinde veya fazlasında üreme yoksa, dezenfeksiyon işlemi yeterli kabul edilir.



**Şekil 5. Yüzeysel dezenfeksiyon testi (DGHM).**

Dezenfektanın etkilediği mikroorganizmaları saptamak amacıyla da bir sınıflama yapılabilir.

Yüzeysel dezenfeksiyonu bazı ülkelerde in vitro testler içinde değerlendirilir (Hollanda'da standart süspansiyon testi, İngiltere'de KS testi, Amerika'da use-dilution testi). Almanya'da yüzeysel 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 Enstitüsünce birkaç değişiklikle geliştirilmiştir. Kısaca şöyle yapılır: Uygulama odasında yer karoları PVC taban, sentetik materyal kapları beş test bakterisiyle 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 bir, iki, üç ve dört 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 kullanılmamaktadır.

## 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 edilebilir avantajları vardır. Formülasyonu ve uygulaması zor değildir. Fakat, verimliliğinin azlığı nedeniyle çoğunun kullanımı sınırlıdır. Bakterilerin dezenfektanlara direncini etkileyen faktörler in vitro testlerle daha iyi belirlenir. Fakat standardize edilmedikleri taktirde 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, mikroorganizmanın 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 süspansiyon 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 bir dakika için daldırılır ve sonra 37°C'de dört 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 yedi gün tutulur. Bu yolla aktif konsantrasyonun en düşük sınırı belirlenir. Taşıyıcı testinden farkı, daha fazla organik madde konması ve dezenfektanın sert su ile sulandırımıdır.

### DOKUMA DEZENFEKSİYON TESTLERİ

Her üç test kullanılabilir. Çamaşırın ek bakterisidal aktivitesi olup olmadığı da süspansiyon 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 çamaşırını ile birlikte yıkanır. Sonra bunun 500 mL'lik yıkama suyu kantitatif olarak canlı kalan bakteri için incelenir. Çama-

şır 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 dilüent içinde homojenize edilir. Canlı kalan bakteri açısından incelenir. Amerika'da 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 isopropanol 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 VİVO TESTLER**

Bu testlerde, lökositlere karşı toksisiteye bakılır. Koryoallantoik membranın infekte edilmesi, yara infeksiyon dezenfektanlarının değerlendirilmesi için yararlı bir metottur. Yaraya uygulanan bir preparatın ilaç emilimine bağlı bir genel toksikoza neden olup olmayacağının 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 belirlenir. 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 ısı ve 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 iki fazda incelenmektedir. İlk fazda bir preparasyonun 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 semikantitatif 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 üç yöntem karşılaştırıldığında bu yöntemlerin tam olarak eşit sonuçlar vermediği çünkü her testin daha önemle üzerinde durduğu noktaların farklı olduğu bilinmektedir.

### **Bu üç testin yapılarına bakılacak olursa;**

Birinci aşamada, her üç 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 beş 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 iki farklı bekleme süresini takiben yüzey, inaktivatör eklenmiş olan TSA besiyeri içeren Rodac plaklarına yerleştirilir. Üzerine steril bir ağırlık konup iki dakika beklenir. Sonra örnek alınıp başka bir Rodac plağına koyulur ve iki dakika sonra da alınıp diğer plağa koyulur. 37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonrasında bu üç plaktaki canlı kalan mikroorganizma sayısı hesaplanır.

Sonuç olarak, bu üç 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 oldukları bildirilmektedir. Bunun ötesinde elbetteki

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 üç 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.

Amerika’da ise durum Avrupa’ya benzemektedir. Seksen yıldır Amerikan 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 amaçlamaktadır. 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 altı seride toplam 59 subkültür tüpünde üreme olmaması durumunda denenen preparat testi geçmiş demektir.

Kelsey Sykes testinde ise aynı dezenfektan solüsyonuna üç kez, sekiz dakika arayla mikroorganizma eklenir ve her ekleme sonrasında örnek, sıvı besiyeri içeren beş subkültür tüpüne alınır. Bu orjinal yöntem, ATCC suşu, hazırlık kültürü için Tryptic Soy Sıvı Besiyeri ve test besiyeri olarak Lethen besiyeri kullanılması ve inkübasyonun 37°C’de yapılması zorunluğu getirilerek modifiye edilmiştir. Sonuç olarak ilk ya da ikinci kez mikroorganizma eklendiğinde beş tüpten ikisinde ya da daha azında üreme varsa preparat testi geçmiş sayılır.

**Tablo 1. Beş test tekniğinin kıyaslanması**

	AFNOR	DGHM	Leuven	QCT	QSDT
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

Reybrouck'un yayınlamış olduğu bir makalede, AOAC use-dilution testi ve Kelsey Sykes testlerinin temiz koşullarda birbirleriyle uyumlu oldukları ve aynı zamanda Avrupa süspansiyon testleriyle 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. cholerasuis* 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 tüberkülosidal aktivite için kullanılabilir AOAC yöntemleri de mevcuttur. Fungusidal aktivite testinde test organizması olarak *Trichophyton mentagrophytes*

**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 AOAC testi	Taşıyıcı testi	8	22
Yüzey dezenfeksiyon testi DGHM testi	Pratik test	4	3
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

ATCC 9533 konidia süspansiyonu, sporosidal test için test organizması olarak *B. subtilis* ya da *C. sporogenes* ATCC suşlarının sporları, tüberkülosidal 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 “American Society for Testing and Materials (ASTM)” 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. Amerikan Standardı: AOAC International: Disinfection. 18<sup>th</sup> ed. 2005
3. Bellamy K. A review of the test methods used to establish virucidal activity. J Hosp Infect 1995;30(Suppl):389-96.
4. Bydzovska O. Screening the viricidal efficiency of antiseptics, disinfection and chemical sterilization-a draft methodology for practice. J Hyg Epidemiol Immunol 1987;31:375-80.
5. Cole EC, Rutala WA, Samsa GP. Disinfectants. J Assoc Off Anal Chem 1988;71:6.
6. Çağlar K. Dezenfektanların etkinliğini ölçen testlerin birbirlerine avantajları ve dezavantajları. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003:334-43.
6. Deva AK, Vickery K, Zou J, West RH, Harris JP, Cossart YE. Establishment of an in-use testing method for evaluating disinfection of surgical instruments using the duck hepatitis B model. J Hosp Infect 1996;33:119-30.
7. Fransa Standardı: 1986: NF-T72-281
8. Garrigue G. In vitro virucidal activity of antiseptics and disinfectants. I. Draft of the AF-NOI virucidal activity standard. Pathol Biol 1984;32(5Pt2):640-2.
9. Gelinat P, Goulet J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. J App Bacteriol 1983;54:243-7.
10. Gröschel DHM. Disinfectants testing in the USA. J Hos Inf 1991;18(Suppl A):274-9.
11. Lepage C, Romond C. Determination of virucidal activity, value of the bacteriophage as a viral model. Pathol Biol 1984;32(5Pt2):631-5.
12. Maillard JY, Beggs TS, Day MJ, Hudson RA, Russell AD. The use of an automated assay to assess phage survival after a biocidal treatment. J Appl Bacteriol 1996;80:605-10.
13. Maris P. 2 Methods of studying in vitro the virucidal action of disinfectants. Ann Rech Vet 1986;17:115-22.
14. Özalp M. Dezenfektan aktivite testleri. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı. 12-16 Eylül 2006:352-7.
15. Papageorgiou GT, Moce-Llivina L, Jofre L. New method for evaluation of virucidal activity of antiseptics and disinfectants. Appl Environ Microbiol 2001;67:5844-8.
16. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants. I. Zbl Hyg 1990;190:479-91.

17. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants, II. Zbl Hyg 1990;190:492-9.
18. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants, III. Zbl Hyg 1990;190:500-10.
19. Reybrouck G. International standardisation of disinfectant testing: is it possible? J Hos Inf 1991;18(Suppl A):280-8.
20. Reybrouck G. The assessment of the bacterial activity of surface disinfectants, IV. Zbl Hyg 1992;192:432-7.
20. Reybrouck G. The testing of disinfectants. Int Biodeterioration Biodegradation 1998;41:269-72.
21. Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation., p:134—57, Blackwell Scientific Publication, 1982-London Sultan, N.: Dezenfektanların mikroorganizmalar Üzerine etkilerinin ölçümü ve pratikteki önemi., s:27-39,: (Günaydın, M., Esen, Ş., Saniç, A., Leblebicioğlu, H. Sterilizasyon, dezenfeksiyon ve hastane enfeksiyonları), Samsun: Simad Yay, 2002:27-39.
22. Sultan N. Dezenfektan etkinlik testlerinde hangisini, hangi durumlarda kullanmalıyız, 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003:344-53.
23. Türk Standardı: TS 6776, 1989.
24. Türk Standardı: TS 12451, 1998.
25. Türk Standardı: TS EN 1040, 1999.
26. Türk Standardı: TS EN 1275, 1999.
27. Türk Standardı: TS EN 1276, 2001.
28. Türk Standardı: TS EN 1650, 2002.
29. Trout JR. Statistical examination of AQAC use-dilution method for testing disinfectant efficacy. J Assoc Off Anal Chem 1985;68:763-5.