

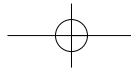
## Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Ölçümü ve Pratikteki Önemi

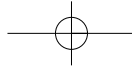
◆ Prof. Dr. Nedim Sultan

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Ankara

Günümüzde hastane enfeksiyonları giderek önem kazanan bir konudur. Hastane enfeksiyonları, yoğun antibiyotik ve dezenfektanların kullanıldığı hastane ortamında duyarlı bakterilerin yok edilmesi, buna karşılık bu maddelere direnebilen ve belirli derecelerde dirençli hale gelenlerin seçilmesi ve hastane ortamına yerleşmesi sonucu meydana gelmektedir. Pahalı teknoloji gerektiren zor ameliyatlara, bir bakterinin ameliyat olan hastada enfeksiyon oluşturmasıyla başarısızlığa uğrar ve hiç bir enfeksiyon sorunu olmayan hasta bu enfeksiyon nedeniyle kaybedilebilir. Bakterilerde antibiyotiklere karşı hızla direnç gelişmektedir. Bakteriler sadece antibiyotiklere değil kullanılan dezenfektan ve antiseptiklere de direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptirler. Antibiyotik kullanımı ile tek bir hastanın enfeksiyon hastalığı tedavi edilmektedir. Hastane ortamının dezenfektanlarla mikroorganizmalardan temizlenmesi ise yeni bir çok enfeksiyonun ortaya çıkmasını önleyebilmektedir. Genel anlamda doğru dezenfektanla ortam ve malzemelerin dezenfekte edilmesi bu tip bir çok enfeksiyonun ortaya çıkmasını önleyebilecektir. Bu durumda dezenfektan ve antiseptiklerin doğru seçilip uygulanması antibiyotik kullanımından daha etkili sonuçların alınmasını sağlamaktadır. Doğru dezenfektanın seçilmesi ise dezenfektanın hastane ortamında bulunabilen mikroorganizmalara etkili olduğunun güvenilir testlerle gösterilmesi, uygulama yöntemi ve uygulama konsantrasyonlarının doğru olarak belirlenebilmesiyle mümkün olabilmektedir (1). Son yıllarda metisiline dirençli stafilokoklarda dezenfektanlara karşı belirlenen direnç düzeyi sorunun önemini ortaya koymaktadır (2,3).

Dezenfeksiyon, istenmeyen mikroorganizmaların selektif eliminasyonudur. İnfeksiyon veya kontaminasyonu (zararlı bakterilerin) önlemek olarak da tarif edilir. Dezen-



**◆ Nedim Sultan**

fektanların etkisinin değerlendirilmesi basit olarak, bakterinin, dezenfektanın test konsantrasyonu üzerine eklenmesi, bir süre maruz bırakılması ve daha sonra ölüp ölmediklerinin incelenmesine dayanır. Testlerin geliştirilmesi, olaya bir çok faktörün karışması nedeniyle oldukça zordur (Test organizmasının seçilmesi, hücre süspan-siyonunun yapılması, pasajda dezenfektanın nötralize olması gibi). Antiseptik ve de-zenfektanlar bakteriyolojinin altın çağından önce erken tarihlerde bulunmuş olmalarına rağmen halen uluslararası kabul gören test şemaları oluşturulamamıştır. Tersine günümüzde halen değişik ülkelerde değişik prensiplere dayanan farklı testler uygulanmaktadır. Çoğu kez bir ülkede alınan farklı sonuçlar diğer ülke bilim çevreleri tarafından kabul edilmeyebilmektedir (1,4).

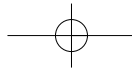
Dezenfektan testleri ile ilgili çalışmalar dezenfektan kinetiğine dayandırılmaktadır. Gözlemler, bakterinin dezenfektan tarafından öldürülmesinin, fenol katsayısı, veya taşıyıcı testlerinde olduğu gibi dezenfektan konsantrasyonu ve bakterinin dezenfektanla temas süresine bağlı olduğunu göstermiştir. Son yıllarda konuyla ilgili pratik uygulamalar geliştirilmiştir. Kapasite testleri ve uygulamalı testler, gerçek yaşam ortamı taklit edilerek ve kullanılan konsantrasyonlarda uygulama ortamında yapılan ve daha gerçekçi sonuç veren testlerdir. Bu testlerde, ürünün kullanım amacına göre değişik mikroorganizmalar ve temas süreleri kullanılmaktadır. Aynı zamanda sert su etkisi de incelenmektedir. Bazı Avrupa ülkelerinde sadece dezenfektanın kendi etkisi değil, kullanım alanı veya dezenfeksiyon işlemi de test edilmektedir (5,6,7).

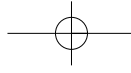
Buna rağmen her ülke koşullarına uygun farklı alanlarda (gıda, tıp, ilaç) farklı teknikler kullanılmaktadır. Bazı yerlerde alışılmışın dışında yerel test şemaları oluşturulmuştur. En iyi bilinen örnek, Amerikan Association of Official Analytical Chemist (AOAC) ve German Society for Hygien and Microbiology'nin farklı test yöntemleri önermeleridir. AOAC, dezenfektanlarla ilgili bir bölümdür. Alman kuruluşunda 1958 den beri faaliyettedir. Alman kuruluşu 1972 den beri kılavuz ve tavsiyeler içeren broşürler yayınlamaktadır. Fransa Hollanda ve İngiltere'nin bazı test metodlarını yayınlayan benzer normalizasyon kuruluşları bulunmaktadır. Bu konuda birbirine göre farklılığı olan sayısız test tanımlanmıştır (8,9,10).

Ortamın ısı ve pH'sı, inokulum büyüklüğü, öldürülmesi amaçlanan mikroorganizmanın cinsi ve fizyolojik durumu, mikroorganizmanın yüzey yapısı, kullanılan dezenfektanın konsantrasyonu, ortamda dezenfektan etkisini interfere eden maddelerin bulunması, dezenfeksiyonun uygulanma şekli ve süresi dezenfeksiyon başarısını etkileyen başlıca faktörlerdir (1,10).

**Dezenfektan Testlerinin Sınıflandırılması**

Bütün testlerin final amacı aynıdır. Kimyasal maddelerin antibakteriyel etkinliğini ölçerler. Testlerin yapılış özellikleri ve farklı uygulama alanlarına göre alt bölümlere ayrılmışlardır. Tablo 1 de dezenfektan testlerinin genel bir sınıflandırılması verilmiştir.





## Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Ölçümü ve Pratikteki Önemi ◆

**Tablo 1.** Dezenfektan aktivite ölçüm testlerinin klasifikasyonu (1)

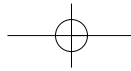
<b>A. Test organizmlerine göre sınıflama</b>	
1.	Antibakteriyel aktivitenin gösterilmesi: Aside dirençli olmayan vejetatif bakteriler (bakterisidal testler), aside dirençli bakteriler, (tuberkülosidal testler); bakteriyel sporlar (sporosidal testler)
2.	Antifungal aktivitenin gösterilmesi: fungusidal testler
3.	Antiviral aktivitenin gösterilmesi: virusidal testler
<b>B. Etki tarzına göre sınıflandırma: bakteriyostatik ve bakterisidal, tuberkülostatik ve tuberkülosidal, sporostatik ve sporosidal, fungistatik ve fungusidal, virustatik ve virusidal testler</b>	
<b>C. Test yapısına göre sınıflandırma</b>	
1.	In-vitro testler: süspansiyon içinde test hücreleri: Süspansiyon testleri Dezenfektana bir kaç kez bakteri süspansiyonu eklenmesi: Kapasite testleri Taşıyıcı üzerinde test organizmleri: Taşıyıcı testleri
2.	Uygulama Testleri: Oda yüzeyleri, dokuma, çıkartı, el ve deri üzerine dezenfektanların etkisini ölçen testler,
3.	Kullanımdaki etkinliği ölçen (In-use) testler
<b>D. Amaçlarına göre testlerin sınıflandırılması</b>	
1.	Birinci test safhası: İlk testler, tarama testleri: Bir kimyasal maddenin antibakteriyel etkisinin olup olmadığını gösteren testler Temas süresi ve dezenfektan konsantrasyonunun ilişkisini gösteren testler Serum gibi organik maddelerin etkisini inceleyen testler
2.	İkinci Test Safhası: Spesifik bir uygulama için kullanım konsantrasyonunu belirleyen testler
3.	Üçüncü Test Safhası: Uygulama alanı için testler, dış ortam ve doku için dezenfektanın pratikte kullanım uygunluğunu inceleyen testler

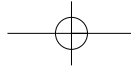
Dezenfektanların antimikrobik etkisi 3 safhada araştırılabilir. İlk safha, maddenin antimikrobik etkisi olup olmadığının belirlenmesidir. Bu ilk tarama testlerini kapsar. Süspansiyon ve fenol katsayısı gibi basit testlerin çoğu birinci safha ön testleridir. İkinci safhada, laboratuvar ortamında gerçek yaşam ortamı taklit edilerek inceleme yapılır. Bu aşamada dezenfeksiyon işlemi ve dezenfektanlar incelenir. Son safha, alana uygulamadır. Cansız ya da canlı ortamlarda test yapılır. Bu kısım daha az kullanılır. Zira alanda tam standardizasyon mümkün değildir (1,10).

### Vejetatif Bakterilere Karşı Dezenfektan Aktivitesini Gösteren Testler

*İn-vitro testler:* Bir dezenfektandan beklenen vazgeçilmez özellik maddenin vejetatif bakterilere etkili olmasıdır. O nedenle dezenfektan testi öncelikle antibakteriyel aktivite açısından başlar.

*Bakteriyostatik aktiviteyi belirleyen testler:* Dezenfektanın bakteriyostatik aktivitesi MIC'in gösterilmesiyle olur. Bu basit bir test olup, bakteri üremesinin inhibisyonunun ölçümüne dayanır ve antibiyotik duyarlılığının ölçüldüğü seri tüp dilüsyonuna benzer. Dezenfektan, nutrient broth ile azalan konsantrasyonlarda karıştırılır, tüplere bakteri inokule edilir ve uygun süre inkube edilir. MIC değeri, bakterinin üremesini durduran en düşük konsantrasyon olarak tespit edilir. Pasaj yapılırken, ortamda de-



**◆ Nedim Sultan**

zenfektan kalıntısının yada üremeyi olumsuz etkileyecek bir etkinin bulunmamasından emin olmak çok önemlidir. Bu testler, dezenfektandan daha çok bakterisidal etki beklendiğinden nadir yapılmaktadır (1,10,11).

**Süspansiyon Testleri**

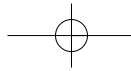
Uygun bakteri volümü, inokulum miktarı, dezenfektan konsantrasyonu, ve temas süresinin belirlenmesi ve bakterinin ölüp ölmediğinin test edilmesi aşamalarını kapsar. Kalitatif (uygulama sonrası subkültürde üreme olması veya olmaması) veya kantitatif (orijinal ekim büyüklüğüne göre canlı kalan bakteri sayısı tesbiti) olarak yapılabilirler. Test yapısı kolaylıkla genişletilerek, değişik konsantrasyonlarda, değişik sürelerde test edilebilir. Testlerde organik maddeler veya sabun gibi potansiyel inhibitör maddelerin veya sert su ve diğer faktörlerin etkisi incelenebilir (1).

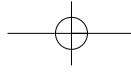
**Kalitatif Süspansiyon Testleri**

Dezenfektanla bakterinin 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 testte, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Escherichia coli 11229, Proteus mirabilis 14153, Klebsiella pneumoniae 4352 ve Pseudomonas aeruginosa 15442 bakterileri test bakterileri olarak kullanılmaktadır(1).

**Fenol-Katsayısı Testleri**

Rideal-Walker (RW) testi, fenol ile karşılaştırılarak dezenfektan etkinliğinin ölçülmesine dayanan kalitatif bir yöntemdir.1903 te Rideal ve Walker tarafından geliştirilmiştir. Orijinal test organizması Salmonella typhi'dir. Fenoliklere oldukça duyarlıdır. 2,5, 5, 7.5 ve 10 dak.lık 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 olmuşsa; Fenol Katsayısı=1200/100=12.0 olarak bulunur. Chick Martin (CM) testi organik maddelerin ortamda bulunduğu koşulda uygulanabilen benzer bir testtir. CM modifikasyonunda, bakteri hücreleri dezenfektana maruz bırakılmadan önce maya hücreleri ile karıştırılarak organik madde yüklenirler. RW ve CM testleri uzun zaman alan, tüm dezenfektanlar için standart olarak kullanılan yöntemlerdir. Fenoller dezenfektan olarak kullanıldıktan sonra hemen hemen değişmeden kalırlar. Günümüzde azalmış olsada halen var olan tifo için oda ısısında yüzey ve odaların dezenfeksiyonunda kullanılırlar. RW ve CM testlerinin en önemli dezavantajı, diğer koşullardaki verilerin ve diğer dezenfektanların fenolden farklı oluşudur. Örneğin fenollerin 37 °C'de deride serum gibi organik madde varlığında stafi-





### Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkiliğinin Ölçümü ve Pratikteki Önemi ◆

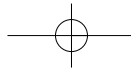
lokokları öldürdükleri söylenemez. Fenol sıvı ortamda organik madde yokluğunda S.typhi için 17-18 °C'de etkili olmaktadır. Fenol katsayısının kullanıldığı testler, etki tarzları bilinmiyorsa nonfenolik dezenfektanlar için bu tür bir beklentiye cevap veremiyebilir. Bu nedenle RW ve CM testlerinin bazı koşullarda kullanımının başarısızlıkla sonuçlanması şaşırtıcı olmayacaktır. Buna karşın RW testi British Standartları Enstitüsüne önerilen bir testtir. AOAC'nin önerdiği RW test yöntemi, Salmonella typhi 6539, S.aureus 6538 ve P.aeruginosa 15442 kullanılacak şekilde detaylandırılmıştır. Kalitatif test olması dezavantajdır. Tüm dünyada kullanılmaktadır. Ancak yerine kantitatif bir test konması daha iyi olacaktır (1,2,6,12).

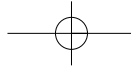
#### Kantitatif Süspansiyon Testleri

Son 50 yılda geliştirilmişlerdir. Bu tip testler bakterisidal, sporoidal ve fungisidal aktivite belirleme araştırmalarında kullanılır. Bakteri kütlesiyle ilgili bilgi, belirli aralıklarla ortamdaki canlı bakteri sayımıyla elde edilir. Canlı sayım tekniği uygulanmalı bakteriyolojinin bütün dallarında kullanılır. Esas olarak katı besiyerine bakteri yayılıp enkube edilir. Koloninin bir tek canlı hücreden geliştiği gerçeğine dayanarak oluşan koloni sayılarak bakteri sayısı belirlenir. Belirlenen süre sonunda canlı kalan bakteri sayı ve oranı sık olarak bakterisidal aktivite için bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Direkt kültür tekniğinde dezenfektana maruz bırakılan karışımdan örnek alınarak katı besiyerine ekilir Üreyen koloni sayısı başlangıç kontrol bakteri sayısı ile karşılaştırılır. Onluk azalma oranı yada Germisidal Etki (GE);  $GE = \log N_c - \log N_D$  formülüne göre hesaplanabilir.  $N_c$ , kontrol serisinde dezenfektan yerine su kullanılan ortamdan alınan örnekteki koloni sayısı,  $N_D$  ise, denek grubunda dezenfektana maruz kaldıktan sonra oluşan koloni sayısıdır.

Avrupa da bu tip değişik bir kaç test kullanılmaktadır. Hollandanın standart süspansiyon testi Mossel modifikasyonuna dayanır. Bu test gıda endüstrisi için dizayn edilmiştir ve bakteri dezenfektana maruz bırakılmadan önce albuminde süspansiyon edilmiştir. Organik madde eklenmesiyle yapılan bu test diğer testlerden daha iyi fikir verir. 5 dakikalık temas sonunda dökme plakta 32 °C'de inkubasyonla kültür yapılır. Hastane için, veteriner ve gıda teknolojisi alanlarında kullanımı için versiyonları vardır. 5-5-5 testi olarak isimlendirilir. Bu standart süspansiyon testinde 5 test organizmi (P.aeruginosa, E.coli, S.aureus, Bacillus cereus ve Saccaromyces cerevisiae) test edilir. 5 dakika temas süresi uygulanır ve 5 li logaritma ile GE hesaplanır. Son hastane versiyonunda P.aeruginosa, P.mirabilis, S.typhimurium ve S.aureus kullanılır. Streptococcus faecalis'inde test bakterisi olarak eklendiği şekliyle Fransız standardına da uyarlanmıştır. 1979'da Alman test kılavuzunda Reybrouck ve Werner tarafından geliştirilmiş modifikasyonu yer almıştır. Bütün kantitatif testleri bir çok noktada birbirine benzemektedir.

Bazı ülkelerde membran filtre tekniği tercih edilmektedir. Filtrasyondan sonra, filtre besiyeri yüzeyine konur ve oluşan koloni sayılır. Filtre, dezenfektandan arıtılmak



**◆ Nedim Sultan**

için bol salin ile yıkanır. Oldukça duyarlı bir teknik olmasına karşın yüzey aktif dezenfektanların ortamdaki uzaklaştırılması gibi bir zorluğu bulunmaktadır.

Daha çok kullanılan bir parametrede, seçilen süre sonunda canlı bakterilerin %99, %99.9, %99.99 veya %99.999'unu öldüren dezenfektan konsantrasyonunun tesbitidir. Öldürme oranının hesaplandığı bu yöntemde 3 desimalli sonuçların elde edilmesi güç sanılsada büyük miktarda bakteri kullanılıncaya işlem kolaylaşır. Böylece öldürme oranı %99.999 ise, verilen sürede 1 000 000 bakteri ölmüş olsa bile hala 10 bakterinin canlı kaldığı hesaplanır. Başka bir ifade ile, %90, 99, 99.9, 99.99 ve 99.99 oranındaki ölüm Log<sub>10</sub>'unun 1, 2, 3, 4 ve 5 oranında düşme gösterdiği tarzında söylenebilir (1,13).

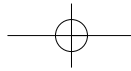
Testler aynı zamanda organik madde (albumin gibi) varlığında ve sert suda yapılabilir. Canlı bakteri sayımı için örnekle hemen çalışılması gerekmektedir. Ya da dezenfeksiyon işlemi bazı nötralizan maddeler tarafından durdurulupta yapılabilir.

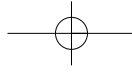
Bakteri kümelenmelerine bağlı sayım hatası yapılabilmesi majör bir hata kaynağıdır. Çoğu antibakteriyel ajan yüzeyi etkilemekte bakteri yüzey yükünü değiştirmekte ve kümelenmeye sebep olarak bu yanlışlığı körüklemektedir. Setrimid gibi dörtlü amonyum bileşikler, aynı zamanda bisbigünidine ve klorheksidin kümelenmeyi körükleyen ajanlardır. Ortama, lesitinle beraber lubrol W eklenirse bu durum önlenebilir.

Dezenfektana maruz bırakılan bakterilerin subkültürü yapılmadan önce dezenfektan aktivitesini nötralize eden inaktivatörlerle, dezenfektan etkisinin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Çeşitli dezenfektanları nötralize eden maddeler tanımlanmıştır. Örneğin Kloroheksidin etkisi, Lubrol W, yumurta lesitini ve Tween 80 ile Formaldehit etkisi, Amonyum iyonları ile Glutaraldehit etkisinde glisin ile nötralize edilebilmektedir (1,14).

**Kapasite Testleri**

RW ve CM testlerinin bir kaç dezavantajı bu metodların geliştirilmeye çalışıldığı 1960'lı yıllarda farkedilmiştir. Bunun üzerine 1965'te Kelsey ve arkadaşları yeni bir test için çalışmaya başlamış ve Kelsey Sykes (KS) testini geliştirmişlerdir. KS testi bir kapasite testidir. Kapasite testinde, dezenfektana birkaç kez bakteri eklenir ve bakterileri öldürme kapasitesi test edilir. Kirli bir enstrümanın dezenfektan solüsyonuna tekrar daldırılmasıyla, solüsyona bir miktar kir yada bakteri eklenmiş olur. Artan bakteri ve kir yükü karşısında dezenfektanın aktivitesini koruması kapasitesinin göstergesidir. Kapasite testleri enstrüman dezenfeksiyonu ve ortam temizliğinin uygulamalı olarak taklidi tarzında yapılır. Daha önceden belirlenmiş miktar bakteri dezenfektanın uygulama solüsyonuna ilave edilir, bir süre maruz bırakılır ve daha sonra örnek alınarak yarı kantitatif yolla bir kaç sıvı besiyerine aktarılır. Belli süre sonra ikinci bakteri eklenmesi yapılır ve ikinci subkültürler yapılır.





### Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Ölçümü ve Pratikteki Önemi ◆

Test edilen dezenfektan fenol gibi bir dezenfektanla karşılaştırılarak değerlendirilir. KS süspansiyon testi bir kapasite testi olduğu için RW ve CM testlerinden farklıdır. Dezenfektan için sonuç iyi veya yetersiz diye belirlenir. Bu testte katsayı gibi sayısal bir değer kullanılmamakta ve değişik mikroorganizmalar test edilebilmektedir. Kirli ve temiz koşullardaki dezenfektan etkisinin gösterilmesi ise testin en önemli yanındır.

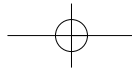
Avrupa ve İngiltere’de en çok kullanılan kapasite testi KS testidir. Son versiyonunda *Ps.aeruginosa*, *P.vulgaris*, *E.coli* ve *S.aureus* kullanılmaktadır. Bakteriler temiz koşullardaki etki için standart sert suyla (Sert su: WHO standart hard water: 17.5 ml  $CaCl_2$  + 5 ml  $MgSO_4$ , 3300 ml saf suda çözülüp otoklavlanarak hazırlanır.) ve kirli koşullarda etki için maya unda süspansiyon edilirler. Dezenfektan sert suyla sulandırılır ve 3 ml’lik başlangıç volümüne 1 ml bakteri süspansiyonu eklenir ve 2 dak sonra pasaj yapılır. Aralıklarla yeni bakteri eklemeleri ve subkültürler sürdürülerek dezenfektan kapasitesi hesaplanır. Bu test genel olarak süspansiyon testinden dezenfeksiyon etki ölçümü için daha yararlı olur. Organik madde ve su sertliğinin etkisini de belirler (15,16,17).

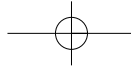
#### Taşıyıcı Testleri (Carrier Testleri)

Enstrüman dezenfeksiyonu için tasarlanan preparatların değerlendirilmesi için değerlidirler. Metal, kateter gibi parçalar yapay olarak kontamine edilip kullanılan dezenfektan dilusyonuna daldırılır, sonra bakterilerin ölüp ölmediği test edilir. Kumaş ve benzeri dokuma parçaları dezenfektanla ıslatılarak test edilir. Bu testler in vitro testlerdir. Testin yapılması basittir. Taşıyıcı dezenfektan sulandırımına aktarılır. Sabit temas süresi sonrası nutrient broth’a transfer edilir. Genellikle 10 çeşit taşıyıcı test edilir. Alman Hijyen ve Mikrobiyoloji Cemiyeti tarafından bildirilen ve AOAC’nin önerdiği in-use testleri en çok kullanılan taşıyıcı testleridir. Alman kuruluşunun önerisine göre, 1 cm<sup>2</sup>’lik standart pamuk parçası taşıyıcı önce yapay olarak kontamine edilir. Sonra 15 dakika bakteri süspansiyonu içinde ıslatılır: Her testte 5 test bakterisi kullanılır. Islak pamuk petri plağına yerleştirilir ve 15 ml dezenfektan eklenir. 2 ile 120 dakikalık her temas süresinden sonra pamuk taşıyıcılar nötralizörlü bir sıvı besiyerine aktarılıp yıkanır ve sonra 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. Bir başka uygulamada her testte 10 temiz çelik küçük silindir taşıyıcı kontamine edilir ve 10 dakika için 10 ml dezenfektana daldırılır. Sonra pasaj yapılır. Bu test fenol katsayısı test sonucunu konfirmer ve uygulama için en etkili konsantrasyonu belirler (1,6,11).

#### Uygulama Testleri

Uygulama testleri gerçek yaşam koşullarında yapılan ikinci safha testleridir. Zaman-konsantrasyon ilişkisi in vitro testlerle ölçüldükten sonra bu uygulama testleri pratik-



**◆ Nedim Sultan**

te kullanılmakta olan konsantrasyonda ve gerçek uygulama alanlarında yapılır. Laboratuvar uygulamalarında yer alabilir ve daha iyi standardize edilebilme avantajları vardır. Formülasyonu ve uygulaması zor değildir. Fakat kullanımları sınırlıdır. Bakterilerin dezenfektanlara direncini etkileyen faktörlerin 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 hemde ölümlerine neden olur. Kurutma zamanı, aletin ısısı, nispi nemi ayrıca sulandırıcı besiyeri, organizmin üreme fazı gibi faktörler sonuçları etkiler. Değişik laboratuvarlar arasında farklı sonuçlar alınmaktadır.

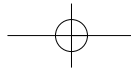
Bu test her uygulama alanı için (alet ve yüzeyler, oda köşeleri, hava, balgam, dışkı, el ve deri, yüzme havuzu ve diğerlerini kapsayacak tarzda) uygulanmaktadır (1,6).

**Alet (Enstrüman) Dezenfeksiyon Testleri**

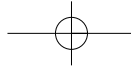
Bu teknik taşıyıcı testine benzer olarak standardize metal parçası veya kateter kullanılarak yapılır. Almanlara göre spesifik enstrüman dezenfeksiyon testleri taşıyıcı testlerinden farklı olarak tarif edilmiştir. Aynı test organizmleri sıvı besiyerinde süspansiyon edilir ve %20 oranında sığır kanı ile 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 1 dakika için daldırılır ve sonra 37 °C'de 4 saat kurutulur. Daha sonra dezenfektan solüsyonuna 15, 30, 45 ve 60 dakikalık süreler için 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, daha fazla organik madde konması ve dezenfektanın sert su ile sulandırılması ile ayrılır (1,6).

**Yüzey Dezenfeksiyonu İçin Testler**

Yüzey dezenfeksiyonu bazı ülkelerde in-vitro testler içinde değerlendirilir. Hollanda'da Standart süspansiyon Testi, İngiltere'de KS testi, Amerika'da kullanım etkinliği (use-dilution) testi, Almanya'da yüzey dezenfeksiyonu testi uygulama koşulları altında yapılır. Bu testler geliştirilirken, Heicken'in farklı bakterilerle enfekte dışkı, ağaç, cam, kaplama ağaç gibi taşıyıcılar üzerinde kurutulmasıyla dezenfektan etkilerini incelediği çalışmadan esinlenilmiştir. Alman Hijyen Enstitüsü bir kaç 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 spreylenebilir. Hızlı etki için 30, 45, 60, 90 dakika veya uzun etki için 1, 2, ve 4 saat temastan sonra canlı kalan bakteri sayısı belirlenir (1,5).





**Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Ölçümü ve Pratikteki Önemi****Dokuma Dezenfeksiyon Testleri**

Her 3 test kullanılabilir. Çamaşırın ek bakterisidal aktivitesi olup olmadığında süspan-siyon testiyle gösterilebilir (birinci safha). İkinci safhada aynı ısı ve aynı dezenfek-tan konsantrasyonunda yıkama makinelerindeki yıkama sikluslarında taşıyıcı testi kullanılır. Böyle testlerde yıkama sıvısında etkili olduğu halde dokumaya etkili ol-mayan preparatların varlığı kanıtlanabilir. Bu farklılık in vivo testlerle gösterilemez. Uygulamada 3.safha testlerde gereklidir. Yıkama sistemi özelliği laboratuvar orta-mında ölçülemeyebilir. Bu özellikle sürekli yıkama yapan makineler için geçerlidir.

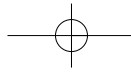
Alman ekolüne göre kimyasal dokuma için uygulama testleri carrier testinden iki noktada farklıdır: Dezenfektan standart sert suda %0.1'lik sığır albumini varlığında sulandırılır ve 12-14 °C'de 4, 6 ve 12 saat tutulur. Test, uzun zaman için oda ısısın-da uygulanır. Bir başka testte, (kemotermal çamaşır için) kontamine test parçası di-ğer hastane çamaşır ile birlikte yıkanır. Sonra bunun 500 ml'lik yıkama suyu kanti-tatif 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 ısısında kurutulur. Bir yıkama siklusundan sonra 12x12 mm'lik kısmı kesilip 5 ml diluent içinde homojeni-ze edilir. Canlı kalan bakteri açısından incelenir. Amerika'da buna ek olarak çama-şırın bakteriyostatik etkiside incelenmektedir (1).

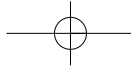
**Hava Dezenfektanlarının Değerlendirilmesi**

Bakteri enfeksiyonlarının bir geçiş yolu da hava yoludur. Koğuşlar, sinema, yatak odaları gibi kapalı ortamlar bu yolla bulaş için uygun ortamlardır. Hastanelerde giri-şimlerin bakterilerden arınmış ortamda yapılması istenir. Atmosferin dezenfeksiyo-nu oldukça önemlidir. İşin yapılacağı ortamda dezenfektanlar gaz, buhar tarzında ya-da aerosol olarak kullanılırlar ve uygulama sonunda hava canlı mikroorganizmaları incelenir.

Havadaki canlı mikroorganizmaların ölçülmesi: En basit yöntem Koch tarafından 1881'de geliştirilen, içinde katı besiyeri olan petri plağının açık bir şekilde hava ile temasta tutulması ve sonra enkübasyonu tarzında yapılan testtir. Bu metod gerçek olarak havada duran mikroorganizmaların yer çekimi etkisiyle plağa düşmesine ba-ğlı olup hava temizliğini ölçmek için kullanılmaktadır. Özellikle aseptik işlemlerin ya-pılacağı ortamlarda uygulanmaktadır. Daha sağlıklı veriler yer çekiminden daha de-ğişik bir gücün kullanılmasıyla elde edilebilir. Sayım için daha erken sonuç almak için değişik düzeneklerde kullanılabilir. Havaya tutulan plak doğrudan enku-be edilip oluşan koloniler sayılır. Böylece alınan hava miktarına göre ölçüm yapılır.

Uygun örnek alma yöntemiyle dar bir odada havada bulunan canlı bakteri sayısının dezenfektan etkisine cevabının ölçülmesi tarzında (UV, kimyasal buhar veya aero-sol) belirli aralıklarla yapılır (1,6).



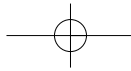
**◆ Nedim Sultan****Kullanım Etkinliği (In-Use) Testleri**

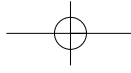
Bakterisidal ürünlerin güvenilirliği, sadece kabul edilen testlerle, kullanım koşullarında kontaminasyon yada enfeksiyon geçişini önlemeleri test edilerek değerlendirilebilir. Bu kriterler kullanılarak bir dezenfektanın etkinliğinin pratik olarak değerlendirilmesi olanaksızdır. Enfeksiyon bir çok faktörden etkilenir. Ancak bu faktörlerden bir kaçını bulunup değerlendirilebilir. Bu gün 100 sene önceki Semmelweis'in yöntemiyle enfeksiyon oranı düşmesine bağlı olarak el antisepsisinin değerini ölçemeyiz. In-use testi bir dezenfektanla yapılan çevre dezenfeksiyonunun dolaylı olarak mikrobiyolojik yönden değerlendirilmesidir. Her ne kadar çevre bakteriyel kontaminasyonunun azalması enfeksiyon sıklığının azalmasına bir kanıt teşkil etmezse de, tersine olarak enfeksiyon sıklığının azalması çevredeki hijyen ölçümlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Bu anlamda, bir yüzeyin dezenfeksiyonundan sonra o yüzeyin kontaminasyon derecesi uygulanan prosedürün geçerliliğini gösterir. Bu test ile dezenfeksiyon işleminin yetersizliği doğrudan gösterilebilir. Bu testte, etkili bir maddenin kullanım konsantrasyonu, yüzey ve aletlerin dezenfeksiyonundan sonra bakteri kalmaması ile gösterilebilir. Ortamda kir serum gibi maddelerin varlığında bile kısa sürede bakterileri öldüren madde bakterisid kabul edilir. Kelsey ve Maurer'in geliştirdiği, daha sonra Prince ve Ayliffe'nin modifiye ettiği yöntemde, temizlikten sonra kir suyu toplanan kovadan yada aletlerin bulunduğu kaptan bir miktar alınır, dezenfektan etkisini inaktive eden madde ile 1 ile 10 misli kadar sulandırılır ve 5 ya da 10'ar damla olarak plak yüzeyine ekilir. Eğer sporsuz bakteri ürerse dezenfektanın kullanılan dilüsyonunun çok düşük olduğu hükmüne varılır. Membran filtrasyon tekniğinde bu amaçla kullanılabilir. In-use testi, hastanelerde dezenfeksiyon işleminin yeterliliğini ölçmede çok yararlı bir yöntem olmasına karşılık genellikle rutin olarak kullanılmamaktadır (1,6,18).

**Mikobakterisidal Aktivite İçin Testler**

Hidrofobik yapıları nedeniyle mikobakterilerin homojen süspansiyonlarını yapmak zordur. Çevre koşulları etkisine daha dirençlidirler. Mikobakteriler çok yavaş ürerler. O nedenle hızlı üreyen Mycobacterium smegmatis ve Mycobacterium terrae test organizmi olarak kullanılırlar. Süspansiyon kapasite, taşıyıcı ve ayrıca in-use testleri mikobakteriler içinde uyarlanmışlardır.

AOAC mikobakterisidal aktivite ölçümü için sadece taşıyıcı testini önerir. Bu testte, Mycobacterium smegmatis ve konfirmatif olarak Mycobacterium tuberculosis var. bovis (BCG) kullanılır. Taşıyıcı olarak porselen parçaları kullanılır. Her testte 10 taşıyıcı kullanılır. Taşıyıcılar kontamine edilir ve 10 dakika dezenfektana maruz bırakılırlar. Daha sonra her parça taşıyıcı 10 ml serum yada nötralizör olan tüpe transfer edilir. Sonra 2'şer ml serum alınıp pasaj yapılır. 10 parçadaki tüm bakterileri öldüren maksimum dilüsyon, maksimum güvenli uygulama konsantrasyonu olarak belirlenir.





### Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Ölçümü ve Pratikteki Önemi ◆

En çok kullanılan yöntem Alman hijyen ve Mikrobiyoloji cemiyetinin önerdiği yöntemdir. İlk safha testi olarak taşıyıcı testinde bir parça pamuklu dokuma, test organizmi olarak *M.tuberculosis* 25618 kullanılır. Kontamine taşıyıcı 2 ile 120 dakika dezenfektan solüsyonunda bekletilir. İki kere nötralizör ile yıkanıp Löwenstein-Jensen besiyerine aktarılır. İkinci safhada, dokuma, yüzey, enstrüman ve balgam dezenfeksiyonu incelenir. İlk safhadaki taşıyıcı ve dokumalar yapay balgam ile (bakteri buluşturulmuş) kontamine edilirler. Bol basil bulunan gerçek balgamda kullanılabilir. Dezenfektan ile temastan sonra kontamine materyal kobaya inokule edilir. Mikobakteriler için kullanılan test metodlarındaki prensipler diğer sporsuz bakterilerdeki gibidir (19,20).

#### Sporosidal Aktivite İçin Dezenfeksiyon Testleri

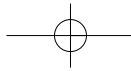
Dezenfektanların sporosidal etkilerinin incelenmesi çok önemlidir. Kimyasal ajanlara diğer bakterilerden çok daha dayanıklı olmaları nedeniyle sporları öldürebilen maddelerin sterilant oldukları söylenebilir. Dezenfektan ile temas sonrası optimal koşullarda sporların canlı kalıp kalmadıkları incelenir. Bazı bakterisidal testler sporosidal test olarak modifiye edilmişlerdir. Hollanda da standart süspansiyon testinde *B.cereus* 9139 kullanılır. Sporlar suda süspansiyon edilir ve 60 saniye için 80 °C'de ısıtılırlar. Bir bakterisidal dezenfektandan 5 dakikada 5 logaritmik etki göstermesi beklenir.

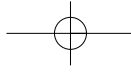
En ünlü sporosidal test AOAC'nin carrier testidir. Porselen küçük silindirler yada ipek süturlar taşıyıcı olarak, *Bacillus subtilis* ya da *Clostridium perfringens* sporları ise standart suşlar olarak kullanılırlar. Bakteri sporları 2.5 N'lik HCL ye dirençliliklerine göre standardize edilmişlerdir. Testte 10 taşıyıcı kullanılır. Bir preperata sporosidal denebilmesi için en az 60 uygulamanın 59'unda sporların tümünü öldürmesi gereklidir.

Sporosidal aktivite ya sıvı süspansiyon içinde yada taşıyıcıda kuru spor varlığında incelenir. Prensip olarak testler diğer bakterisidal testler gibidir. Ancak işlem sporun germinasyonuna yol açabilir. O nedenle enkübasyonun bir kaç gün için sürdürülmesi gerekir (1,8,11).

#### Mantarlara Karşı Dezenfektan Etkisinin Ölçülmesi

Bazı bakterisidal testler mantarlar için modifiye edilmiştir. *S.cerevisiae*, *Candida albicans* ve *Trichophyton mentagrophytes* test organizmleri olarak kullanılır. Yüzey dezenfeksiyonu için iki test kullanılır. Kirli koşul için yapılan testte, 2x20x2 mm ebatında bir tahta parçası mantar içeren süspansiyon ile kontamine edilir, 1, 2, 3 ve 4 saat süre ile dezenfektana maruz bırakılır ve sonra nötralizasyon işlemi uygulanır. Son aşamada Sabouraud nutrient agar'da üreme semikantitatif olarak değerlendirilir.



**◆ Nedim Sultan**

En yaygın fungisidal test AOAC'nin önerdiği modifiye fenol-katsayısı kalitatif süspansiyon testidir. Bunda T.mentagrophytes kullanılır. 5, 10, ve 15 dakikalık dezenfektan ile temas sonrası nötralizasyon uygulanır ve sonra dextroz broth'a ekimle canlılık kontrolü yapılır. 10 dakikada mantarları öldüren en yüksek dilusyondaki dezenfektanın, patojen mantarlarla bulaşık yüzeyleri dezenfekte edeceği kabul edilir.

Funguslar potansiyel patojen olup farmasötik preparatları kontamine edebilirler. Testler antibakteriyel aktivite testlerine benzersede mantarların üreme ihtiyaçlarına göre yapılır. Tipik besiyeri Sabouraud likit besiyeri ve Czapek-Dox besiyerleridir. Gerekirse iki besiyeride agarla katılaştırılabilirler.

Fungal spor yada miçelyum test solüsyonuna eklenir. Kantitatif değerlendirme bakterilerdeki gibidir. Test maddeleri tüm kontaminantları inhibe eden nitelikte seçilirler. Toz ve toprakta karışık inokulum kaynağı olarak kullanılabilirler (1).

**Viruslara Karşı Dezenfektan Etkisinin Ölçülmesi**

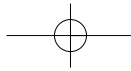
Bu konuda büyük teknik problemler vardır. Viruslar zorunlu hücre içi parazitleridir. Ortamda canlı kalabilir ancak çoğalamazlar. Yapay besiyerlerinde üremedikleri gibi bazıları hücre kültürlerinde de üretilmemektedir. O nedenle dezenfeksiyon testlerinde doku kültürleri kullanılır. Bu teknik zordur. Ekipman ve kalifiye ekip gerektirir. Öte yandan dezenfektanlar canlı hücrelere toksik etkilidir. O nedenle bu tip zor testler ancak Amerika, Fransa, Almanya gibi ülkelerde geliştirilebilmişlerdir. Test hayvanlarda yapılır ve canlı kalan viruslar yönünden inceleme yapılır. Bu in-vivo testlerde her zaman in-vitro testlerdekine benzer sonuçlar alınmamaktadır. AOAC'nin in-vitro bakterisidal testine benzer bir testi uygulanmaktadır.

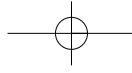
Almanya Essen'de HBV'ye karşı dezenfektan etkisini inceleyen bir test geliştirilmiştir. Bu testte, Dane partikülündeki morfolojik değişim elektron mikroskopla belirlenmekte ve virulans kaybını göstermektedir.

*Doku Kültürü veya Yumurta İnokulasyonu:* Standart virus süspansiyonu kullanılır. Maya süspansiyonu olan ortamda sert suda uygun dezenfektan konsantrasyonu yapılır. Uygun zaman için inaktive at serumu ile sulandırılan virus süspansiyonu doku kültürüne yada embriyonlu yumurtaya eklenir. Sonuçlar dezenfektansız virus inoküle edilmiş kontrol kültürüyle karşılaştırılarak değerlendirilir.

Dezenfektanın kendisinde doku kültürüne toksik olabileceğinden toksisite testide yapılmalıdır. İnaktive serumla sulandırılan dezenfektan canlı sisteme eklenip günlük olarak yaptığı zarar açısından incelenir.

*Plak Sayımı:* Poliovirus, herpesvirus, rota virus gibi sınırlı sayıda virus için kullanılabilir. Virus değişik konsantrasyonda dezenfektanla karıştırılıp üzerinde monolayer Yavru Hamster Böbrek hücreleri üremiş ve suyu dökülmüş şişelere konur. Sonra canlı kalan viruslar için plak sayımı yapılır. Kontrol serisinde de virus eklenen şişelerde oluşan plaklar sayılır.





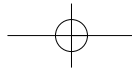
### Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Ölçümü ve Pratikteki Önemi ◆

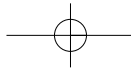
*Hayvan Modeli:* HBV, hücre kültüründe üremez. Test şempanzede yapılır. Şempanze dezenfektanla işlenmiş ve işlenmemiş virus ile infekte edilir. Ördek HBV'si, insan HBV'si için uygun bir model olabilir. Test viral DNA polimerazının dezenfektan tarafından inaktive edilmesine dayanır. Enzimin madde tarafından inaktive edilmesi infektiviteyi engeller. Dane partikülü HBsAg, HBcAg ve HBeAg denen 3 antijen taşır. HBsAg nin gösterilmesi canlı virus varlığına kanıt kabul edilir. Dezenfektan eğer HBsAg oluşumunu engellemişse virusa etkilidir. Formaldehit ve glutaraldehit fiksatif olarak kullanılırlar. Bunların bakterileri öldüren konsantrasyonlarında virus reaktivitesi etkilenmemekte ve bu iş için genellikle daha uzun sürelere gereksinim duyulmaktadır. Virus morfolojisindeki değişim de virüsidal aktiviteyi göstermektedir.

*Endojen Revers Transkriptaz:* Bu enzime sahip virüslerde, dezenfektanların, RNA-bağımlı DNA polimeraz (RT) enzimine etkilerine bakılır. RNA, RT aracılığıyla önce DNA'ya dönüştürülür. Dezenfektan etkinliği virusun T lenfositlerinde yaptığı sitopatik etkinin ölçülmesiyle değerlendirilir. Bakteriyofajlar, virüsidal aktivite incelenmesi için kullanılabilen daha kolay sistemler oluştururlar (1,21).

#### Kaynaklar

1. Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ: Principles and practice of disinfection preservation and sterilisation, P:134-157, Blackwell Scietific Publication, 1982, London
2. Sasatsu M, Shimizu K et al: Evaluation of antiseptics by the modified Phenol coefficient Method: Sensitivity of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Biol Pharm Bull, 1994, 17:136-138
3. Sultan N, Türet S, İmir T: Metisiline dirençli ve duyarlı stafilocokların bazı antiseptiklere duyarlılıklarının incelenmesi, FABAD Farm Bil Derg, 1991, 16:167-174
4. Gröschel DHM:Disinfectant Testing in USA, J Hosp Infect, 1991, 18(Suppl A):274-79
5. Van Klingeren B: Disinfectant testing on surfaces, J Hosp Infect, 1995, 30:397-408
6. Miner N: Principle to guide international standard tests for liquid chemical germicides:a proposal, J AOAC Int, 1999, 82:669-75
7. Maureen B, Springhorpe S, Sattar SA: Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: Studies with a mixture of five types of microorganisms, Am J Infect Control, 1994, 22:152-62
8. Danielson JW, Thompson RD, Bell E: Sporocidal testing of commercial germicides using a chemical standard and a calibrated bioindicator, J AOAC Int, 1999, 82:151-9
9. Peters J, Spicher G: Model tests for the efficiency of disinfectants on surfaces.IV communication: dependence of test results on the amount of contamination and the kind of active substance. Zentralbl Hyg Umwelmed, 1998, 201:311-23
10. Reybrouck G: International standardisation of disinfectant testing: is it possible?, Hosp Infect J, 1991, 18(Suppl A): 280-88
11. Reybrouck G: A Theoretical approach of disinfectant testing, Zbl Bakt Hyg, 1975, 160:342-367
12. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, İzmir, Barış Yayınevi, 1996
13. Reybrouck G:A comparison of the Quantitative suspension tests for the assesment of disinfectants, Zbl Bakt Hyg, 1980, 170:449-456
14. Kampf G, Hofer M,Ruden H: Inactivation of chlorhexidine for in-vitro testing of disinfectants, Zentralbl Hyg Umwelmed, 1998, 200:457-64





◆ **Nedim Sultan**

15. Kelsey JC, Maurer IM: An improved (1974) Kelsey-Sykes test for disinfectants, *The Pharmaceutical Journal*, 1974, 30:528-530
16. Cowen RA: Kelsey-Sykes capacity test: a critical review: *The Pharmaceutical Journal*, 1978,4:202-204
17. Hegna IK, Clausen OG: An investigation of the bactericidal and fungicidal effects of certain disinfectants by use of a capacity test, 1987, 139:473-83
18. Prince J, Ayliffe GAJ: In-use testing of disinfectants in hospital, *J Clin Path*, 1972, 25:586-89
19. Sattar SA, Best M et al.:Mycobactericidal testing of disinfectant: an update, *J Hosp Infect*, 1995, 30: 372-82
20. Griffiths PA, Babb JR, Frais AP: *M.terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test, *J Hosp Infect*, 1998, 38: 183-92
21. Bellamy K: A review of the test methods used to established virucidal activity, *J Hosp Infect*, 1995, 30:389-96

