
Dezenfektan Aktivitesini Etkileyen Faktörler ve Dezenfektan Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Prof. Dr. Nedim SULTAN

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Hastane infeksiyonları, yoğun antibiyotik ve dezenfektanların kullanıldığı hastane ortamında duyarlı bakterilerin yok edilmesi, buna karşılık bu maddelere karşı direnebilen ve direnç geliştirebilen mikroorganizmaların seçilmesi ve hastane ortamına yerleşmesi sonucu meydana gelmektedir. Bu infeksiyonların ortaya çıkması zorlu ameliyatları boşa çıkarabilmekte, hasta tedavisine ağır bir mali yük getirmekte, hastanede kalış süresini uzatmakta ve hastanın kaybedilmesine neden olabilmektedir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirebildiği bilinmektedir. Ancak bakterilerin sadece antibiyotiklere değil, kullanılan dezenfektan ve antiseptiklere de direnç geliştirebildikleri günümüzde bilinen bir gerçektir. Antibiyotik kullanımı ile tek bir hastanın infeksiyon hastalığı tedavi edilmektedir. Hastane ortamının dezenfektanlarla mikroorganizmalardan arındırılması ise yeni birçok infeksiyonun ortaya çıkmasını önleyebilmektedir. Doğru dezenfektanla ve doğru uygulamalarla ortam ve malzemelerin dezenfekte edilmesi bu tip birçok infeksiyonun ortaya çıkmasını önleyebilecektir. Bu durumda dezenfektan ve antiseptiklerin doğru seçilip uygulanması hastane infeksiyonları ile mücadelede antibiyotik kullanımından daha etkili sonuçların alınmasını sağlamaktadır. Bu sonuca ulaşabilmek için dezenfektanın hastane ortamında bulunabilen mikroorganizmalara etkili olduğunun güvenilir testlerle gösterilmesi, uygulama yöntemi ve uygulama konsantrasyonlarının doğru olarak belirlenebilmesi gerekmektedir (1).

Dezenfektanların etkisini değerlendiren testler yapılırken olaya birçok faktörün karışması nedeniyle dikkatli olunmalıdır. Test mikroorganizmasının doğru se-

çilmesi, hücre süspansiyonunun dikkatli yapılması, canlılık kontrolü yapılırken dezenfektanın etkisinin nötralizan maddelerle ortadan kaldırılması gerekmektedir. Antiseptik ve dezenfektanlar bakteriyolojinin altın çağından önce erken tarihlerde bulunmuş olmalarına rağmen uluslararası kabul gören test şemaları oluşturulabilmesi son yıllara kadar sürmüştür. Günümüzde halen değişik ülkelerde değişik prensiplere dayanan farklı testler uygulanmaktadır (1,2).

Dezenfektan testleri ile ilgili çalışmalar dezenfektan kinetiğine dayandırılmaktadır. Gözlemler, bakterinin dezenfektan tarafından öldürülmesinin, 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 dezenfektanın kullanım konsantrasyonlarında 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 şekli veya dezenfeksiyon işlemi de test edilmektedir (3-5).

Amerikan “Association of Official Analytical Chemist (AOAC)” ve “German Society for Hygien and Microbiology (GSHM)” dezenfeksiyon ve dezenfektan etkinlik testleri konusunda dünyanın en saygın kuruluşlarıdır. Bu iki kuruluşun bazen farklı test yöntemleri önerebildikleri görülmektedir. “Association French of Normalisation (AFNOR), British Standards Institution (BSI), European Free Trade Association (EFTA) Comite Europee de Normalisation (CEN)” gibi bazı test yöntemlerini geliştirip öneren benzer standardizasyon kuruluşları bulunmaktadır. Bu konuda birbirine göre farklılığı olan sayısız test tanımlanmıştır (6-8).

DEZENFEKSİYON ve DEZENFEKTAN ETKİNLİK TEST SONUÇLARINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Dezenfeksiyon başarısı birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Bu nedenle dezenfektan etkinlik ölçüm testleri yapılırken bu faktörler dikkate alınmalıdır. 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 (1,8). Dezenfeksiyon işlemini ve dezenfektan etkinlik test sonuçlarını etkileyen faktörler mikroorganizmalara, dezenfektana ve çevresel faktörlere bağlı olabilmektedir. Mikroorganizma o dezenfektana doğal dirençli olabilir. Örneğin; bakteri sporları bütün dezenfektanlara vejetatif bakterilere göre daha dirençlidir. Tüberküloz basili farklı duvar yapısı ve hidrofobik özelliğinden dolayı nispi bir doğal direnç sergilemektedir. Psödomonas, dış membran yapısına bağlı olarak antibakteriyel maddeleri hücre içine daha az almaktadır. Ortamdaki mikroorganizma sayısı arttıkça dezenfektanın etkisi azalabilmektedir. Biyofilm oluşturmuş bakteriler dezenfektan etkisine daha dirençli olmaktadır (9). Yine mikroorganizmalar mutasyonlar sonucu dezenfektana kazanılmış di-

renç geliştirebilir. Dezenfektana bağlı faktörler içinde dezenfektanın konsantrasyonu, dezenfektanla temas süresi ve dezenfektan eriyiğinin tazeliği sayılabilir. Ortamın ısısı, pH'sı, dezenfektanın sulandırıldığı suyun sertlik derecesi, ortamdaki kir ve organik madde yükü dezenfeksiyonu etkileyen çevresel faktörlerdir. Örneğin; glutraldehid yüksek pH'larda daha etkili olurken, sodyum hipoklorit düşük pH'larda daha etkili olabilmektedir. Ortamdaki lipidler dezenfektanın mikroorganizma üzerindeki etkilerini azaltmaktadır (10). Kir, toz, organik birikinti mikroorganizmalara besin maddeleri sağladığı gibi dezenfektan maddelerin buraya nüfuz etmesini de zorlaştırır. Bu nedenle dezenfeksiyon ancak bu kalıntılardan temizlenmiş ortamlarda beklenen etkiyi gösterebilmektedir. Dezenfektan etkinliği ölçülürken kirli koşullar altında etkinlik testleri yapılmalıdır. Kirli şartları sağlamak için test ortamına organik madde olarak sığır serum albumini, kan, serum, maya, maya özütü veya koyun eritrositlerinden biri ya da birkaçı eklenir (11).

DEZENFEKTAN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bir dezenfektanın test edilen mikroorganizmaya etkili olduğunun kabul edilmesi için, dezenfektanın bakteri ile temasından sonra canlı bakteri sayısında 5 log'luk (%99.999) bir azalmaya yol açması gerekmektedir (12). Ancak bu durum daha çok süspansiyon testlerinde geçerlidir. ABD'de 3 log'luk azalma, taşıyıcı testlerinde virüsidal etkinlik için yeterli kabul edilmektedir (13). Biyofilm oluşturan bakteriler test edildiğinde 3 log'luk azalma yeterli olmaktadır.

Dezenfektan etkinlik testleri uluslararası standardizasyon kuruluşlarının önerdiği standart mikroorganizma suşları ile yapılmaktadır. Bu amaçla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 suşları önerilmektedir (14). Bir dezenfektanın vejetatif bakterilere etkisi incelenirken en az bir gram-negatif (*P. aeruginosa* ATCC 15442) bir de gram-pozitif (*S. aureus* ATCC 6538) bakteri kullanılması kullanılmalıdır (15). Dezenfektanın standart suşlara etkili olduğunun gösterilmesi, ürünün aynı grupta yer alan tüm suşlara her zaman etkili olacağı anlamına gelmez, zira standart suşlar ile hastane ortamından izole edilen bakteri izolatlarının dezenfektanlara duyarlılığı farklı olabilmektedir. Bu nedenle, testlerde sadece standart suşlar değil klinik izolatlarında kullanılması ile daha gerçekçi sonuçlar alınabilir (16).

Testlerde önce bakteri suşu ile dezenfektan bir arada tutulur ve test süresi sonunda bakterinin canlı kalma oranı incelenir. Ancak canlı kalan bakteri sayısının belirlenmesinden önce etkisi incelenen dezenfektanın o dezenfektan etkisini gideren maddelerle nötralize edilmesi gerekmektedir. Nötralizasyonda dezenfektan formülüne uygun olarak seçilen ve dezenfektan maddeyi nötralize edebilen maddeler kullanılır. Bu amaçla en sık tween 80, lesitin, lubrol W, histidin, sodyum tiyosülfat, sığır serum albumini, serum, saponin ve sistein kullanılır. Dezenfektanın etkili bir şekilde nötralize edilmesi deney sonuçlarının geçerliliği açısından önem

taşır. İyi bir nötralizan hem dezenfektanın etkinliğini sona erdirmeli, hem de bakteri için toksik olmamalıdır. Bu nedenle, seçilen nötralizanın deneyde kullanılan mikroorganizmalara toksik etkisi olmadığı ek testlerle gösterilmelidir (17).

DEZENFEKTAN TESTLERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Dezenfektan etkinlik testleri 3 fazda incelenir. Birinci fazda dezenfektan maddenin antimikrobiyal etkisinin olup olmadığı araştırılır. Bu faz, ilk tarama testlerini kapsar. Süspansiyon ve fenol katsayısı gibi basit testlerin çoğu birinci safha ön testleridir. Dezenfektan maddenin antimikrobiyal etkisi varsa ikinci faz testlerine geçilir. İkinci faz deneyleri yine laboratuvar ortamında in vitro olarak yapılır. Bu testlerde gerçek yaşamdaki uygulamalar taklit edilir, böylece çok daha gerçekçi sonuçlar elde edilir. Bu aşamada dezenfeksiyon işlemi ve dezenfektanın değişik uygulamalardaki etkili konsantrasyonu belirlenmiş olur. Bu amaçla süspansiyon testlerine ek olarak kapasite testleri ve taşıyıcı testleri kullanılır. Üçüncü faz ise sahada yapılan ve dezenfektanın gerçek performansını ortaya koyan testlerdir. Bu testler cansız ya da canlı ortamlarda yapılabilir. Ancak bu son faz testleri daha az kullanılmaktadır. Zira alanda tam standardizasyon mümkün olamamaktadır (1,8). Testler, yapılış özellikleri ve farklı uygulama alanlarına göre sınıflandırılmıştır. Tablo 1'de dezenfektan testlerinin genel bir sınıflandırılması verilmiştir.

Tablo 1. Dezenfektan etkinliğini ölçen testlerin sınıflandırılması.*

A. Test mikroorganizmalarına göre sınıflama

1. Antibakteriyel aktivitenin gösterilmesi: Aside dirençli olmayan vejetatif bakteriler için bakterisidal testler, aside dirençli bakteriler için tüberkülosidal testler, bakteriyel sporlar için sporisidal testler.
2. Antifungal aktivitenin gösterilmesi: Fungusidal testler.
3. Antiviral aktivitenin gösterilmesi: Virüsidal testler.

B. Etki tarzına göre sınıflandırma: Bakteriyostatik ve bakterisidal, tüberkülostatik ve tüberkülosidal, sporistatik ve sporisidal, fungusistik ve fungusidal, virüstatik ve virüsidal testler

C. Test yapısına göre sınıflandırma

1. İn vitro testler
 - Minimum inhibitör konsantrasyonunu ölçen testler
 - Süspansiyon testleri
 - Kapasite testleri
 - Taşıyıcı testleri
2. Uygulama testleri:

Yüzey, alet, oda yüzeyleri, dokuma, hava, çıkartı, el ve deri üzerine dezenfektanların etkisini ölçen testler.
3. Kullanım anında dezenfektan etkinliğini ölçen (in-use) testler.

Tablo 1. Dezenfektan etkinliğini ölçen testlerin sınıflandırılması* (devamı).**D. Amaçlarına göre testlerin sınıflandırılması**

1. Birinci faz testleri: Bir kimyasal maddenin antibakteriyel etkisinin olup olmadığını gösteren testlerdir. Temas süresi ve dezenfektan konsantrasyonunun ilişkisini gösteren, ayrıca serum gibi organik maddelerin etkisini inceleyen testleri kapsar.
2. İkinci faz testleri: Spesifik bir uygulama için kullanım konsantrasyonunu belirleyen testlerdir.
3. Üçüncü faz testleri: Uygulama alanı için testler olup dış ortam ve doku için dezenfektanın uygulamadaki performansını inceleyen testlerdir.

* 1 no'lu kaynaktan alınmıştır.

1. İn Vitro Testler

a. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) testi: Dezenfektanın bakteriyostatik etkisini ölçen bir testtir. MİK testi mikroorganizmaların dezenfektanlara duyarlılığını ve bu duyarlılıktaki değişiklikleri kantitatif olarak gösterir (18,19). MİK testi, bakteri üremesinin inhibisyonunun ölçümüne dayanır ve antibiyotik duyarlılığının ölçüldüğü seri tüp dilüsyonuna benzer. Dezenfektan, nütrient broth ile azalan konsantrasyonlarda karıştırılır, tüplere bakteri konur ve uygun süre bekletilir. MİK değeri, bakterinin üremesini durduran en düşük konsantrasyon olarak tespit edilir. MİK testi antibiyotik direncini çok iyi gösterir, ancak dezenfektanlar için fazla önem taşımaz. Dezenfektan etkinlik testlerinde ölçülmek istenen mikroorganizmanın dezenfektan tarafından öldürülüp öldürülmediğidir. Oysa MİK testi bakterilerin üremesinin inhibe olup olmadığını belirtir. Üremesi inhibe olmuş olan bakteri ise uygun ortam bulunca gıdaları, canlı ve cansız ortamları kontamine edip tekrar üreyebilir. Sadece MİK sonuçlarına bakarak dezenfektanın kullanılıp kullanılmayacağına karar verilemez. Bu testler, dezenfektanın bakterisidal etkili olması istendiğinden pek yapılmamaktadır. Ayrıca MİK testleri iyi standardize edilememiştir (1,8,20). Bir bakteri suşu dezenfektanın pratikte kullanılan konsantrasyonuna maruz kaldığında ölürken, o dezenfektana karşı MİK değerleri yükselmiş olabilir. Örneğin; klorheksidinin kullanımı arttıkça bazı mikroorganizmalarda klorheksidine karşı MİK değerlerinin arttığı gözlenmiştir (21). Yine de bakterilerin dezenfektanlara karşı direnç düzeylerindeki artış MİK testleri ile belirlenebilir. Bakterilerin dezenfektanlara duyarlılığında değişiklik olup olmadığı kantitatif olarak MİK testleri ile belirlenebilir (22).

b. Süspansiyon testleri: Süspansiyon testleri, hem birinci faz, hem de ikinci faz deneylerinde kullanılır. Bakterilerle yapılan testler çok iyi standardize edilmiştir. Dezenfektanların fungusidal, sporisidal, virüsidal etkileri de bu testlerle çalışılabilmektedir. Test, belirli sayıda mikroorganizma içeren bakteri süspansiyonunun dezenfektan ile karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Belli bir temas süresi sonunda, karışım nötralize edilir ve katı besiyerine ekilir. Hangi mikroorganizma türü üretilecekse, ona yönelik spesifik besiyerleri kullanılır. Eğer bir maddenin

antiseptik etkisine bakılacaksa 30. saniyedeki etkinliğine de mutlaka bakılmalıdır. Testlerde organik maddeler veya sabun gibi potansiyel inhibitör maddelerin veya sert su ve diğer faktörlerin etkisi de incelenebilmektedir (1).

- *Kalitatif süspansiyon testi:* Dezenfektan ve bakteri karıştırılır, sabit bir temas süresinden sonra dezenfektan ve bakteri karışımından örnek alınarak katı besiyerine ekilir. Besiyerinde koloni gelişmesi dezenfektanın yetersizliğine bağlıdır. Ancak tek bir canlı bakteri kalmış bile olsa aynı sonucu verir. Kalitatif süspansiyon testi ön tarama testi olarak kullanılabilir. En iyi bilinen kalitatif süspansiyon testi Rideal Walker Fenol Katsayısı Testidir.

- *Fenol-katsayısı testleri:* Rideal Walker (RW) testi, fenol ile karşılaştırılarak dezenfektan etkinliğinin ölçülmesine dayanan kalitatif bir yöntemdir. 1903 yılında Rideal ve Walker tarafından geliştirilmiştir. Orijinal test organizması *Salmonella typhi*'dir. Fenol türevlerine oldukça duyarlıdır. Bakteri ve dezenfektan 2.5, 5, 7.5 ve 10 dakika birlikte tutulur. 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 ölü maya hücreleri ile karıştırılarak organik madde yüklenir. RW ve CM testlerinin uygulaması uzun zaman almaktadır. Tüm dezenfektanlar için standart olarak kullanılan yöntemlerdir. Fenoller dezenfektan olarak kullanıldıktan sonra hemen hemen değişmeden kalır. Eskiden tifo geçiren hastaların yattığı odaların dezenfeksiyonunda kullanılırlardı. RW ve CM testlerinin en önemli dezavantajı, diğer dezenfektanların fenolden farklı oluşudur. Fenol katsayısının kullanıldığı testler, etki tarzları bilinmeyen fenol dışındaki dezenfektanlar için güvenilir sonuç vermeyebilir. Bu nedenle RW ve CM testlerinin bazı koşullarda kullanımı başarısızlıkla sonuçlanabilir. Buna karşılık RW testi BSI tarafından önerilen bir testtir. AOAC'nin önerdiği RW test yöntemi, *S. typhi* 6539, *S. aureus* 6538 ve *P. aeruginosa* 15442 kullanılacak şekilde detaylandırılmıştır. Kalitatif test olması en önemli dezavantajdır. Ancak günümüzde bu testin yerine kantitatif testler tercih edilmelidir (1,4,23,24).

- *Kantitatif süspansiyon testi:* Kantitatif süspansiyon testi bakterisidal, sporisidal ve fungusidal aktivite belirleme araştırmalarında kullanılır. Bakteri sayısı ile ilgili bilgi, belirli aralıklarla ortamda canlı kalan bakteri sayımıyla elde edilir. Canlı sayım tekniği uygulamalı bakteriyolojinin bütün dallarında kullanılır. Koloninin bir tek canlı hücreden geliştiği gerçeğine dayanarak katı besiyerinde oluşan koloni sayılarak bakteri sayısı belirlenir. Dezenfektana maruz bırakılan karışımdan örnek alınarak katı besiyerine ekilir. Üreyen koloni sayısı başlangıç kontrol bakteri sayısı ile karşılaştırılır. Sonuç 10'luk azalma oranı (log redüksiyon faktörü) ya da "Mikrobisidal Etki: ME= Germisidal Etki (GE); GE=logNc-logNd" formülüne göre hesaplanabilir. Nc, kontrol serisinde dezenfektan yerine su kulla-

nılan ortamdan alınan örnekteki koloni sayısı, Nd ise, denek grubunda dezenfektana maruz kaldıktan sonra oluşan koloni sayısıdır. Bu test yönteminde en önemli hususlardan biri seçilen süre sonunda canlı bakterilerin %99, %99.9, %99.99 veya %99.999'unu öldüren dezenfektan konsantrasyonunun belirlenmesidir. Öldürme oranının hesaplandığı bu yöntemde 3 desimalli sonuçların elde edilmesi güç sanılsa da büyük miktarda bakteri kullanılması işlemi kolaylaştırmaktadır. Böylece öldürme oranı %99.999 ise verilen sürede 100.000 bakteri ölmüş olsa bile hâlâ 1 bakterinin canlı kaldığı hesaplanır. Başka bir ifade ile %90, %99, %99.9, %99.99 ve %99.999 oranındaki ölüm oranı, 10'luk logaritmaya göre 1, 2, 3, 4 ve 5 olarak ifade edilir. Yani GE= 1, bakterilerin %90'ının, GE= 2, bakterilerin %99'unun, GE= 5 ise bakterilerin %99.999'unun uygulanan dezenfeksiyon süresi içinde uygulanan dezenfeksiyon konsantrasyonu tarafından öldürüldüğünü ifade etmektedir (1,25).

Süspansiyon testlerinde dezenfektanın etkili olduğunun kanıtlanması için 5 değerinde bir redüksiyon faktörüne ulaşılması gerekmektedir. Bunun sağlanabilmesi için başlangıç inokulumunda 10^9 cfu/mL bakteri bulunmasının sağlanması deney sonunda hatalı sonuçların alınmasını önler. Daha düşük yoğunlukta hazırlanan süspansiyonla yapılan deneylerde dezenfektan lehine hatalı sonuçlara varılabilir. Mc Farland eşeline göre hazırlanan süspansiyonlarda farklı bakteriler farklı sayılarda bulunabilir. O nedenle başlangıç süspansiyonunda bulunan bakteri yoğunluğunun canlı koloni sayımı ile belirlenmesi daha güvenilir sonuçların alınmasını sağlayacaktır.

Avrupa'da değişik birkaç süspansiyon testi kullanılmaktadır. Hollanda'nın 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. Beş dakika bakteri-dezenfektan temasından sonra dökme plakta 32°C 'de inkübasyonla kültür yapılır. Bu testin hastane ortamı için, veteriner ve gıda teknolojisi alanlarında kullanımı için versiyonları vardır. Bu standart süspansiyon testinde 5 test mikroorganizması (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* ve *Saccaromyces cerevisiae*) test edilir. Beş dakika temas süresi uygulanır ve dezenfektanın etkili olduğunun kabul edilmesi için GE'nin 5 olması beklenir. *Streptococcus faecalis*'in de test bakterisi olarak eklendiği şekliyle Fransız standardına da uyarlanmıştır. Bütün kantitatif testler birçok noktada birbirine benzemektedir. Bazı ülkelerde membran filtre tekniği tercih edilmektedir. Filtrasyondan sonra, filtre besiyeri yüzeyine konur ve oluşan koloni sayılır. Filtre, dezenfektandan arıtılmak için bol salin ile yıkanır. Oldukça duyarlı bir teknik olmasına karşın yüzey aktif dezenfektanların ortamdan uzaklaştırılması gibi bir zorluğu bulunmaktadır. Testler aynı zamanda organik madde (albumin gibi) varlığında ve sert suda yapılabilir. Dezenfektan etkisi bazı nötralizan maddeler tarafından durdurulduktan sonra canlı kalan bakteri tespiti yapılmalıdır. Bakteri kümelenmelerine bağlı sayım hatası yapılabilmesi majör bir hata kaynağıdır. Çoğu dezenfektan ajan yüzeyi etkileyerek bakteri yüzey yükünü değiştirmekte ve

kümelenmeye sebep olarak bu yanlışlığa neden olabilmektedir. Setrimid gibi dörütlü amonyum bileşikleri, aynı zamanda bisbigunidine ve klorheksidin kümelemeyi körükleyen ajanlardır. Ortama lesitinle beraber lubrol W eklenirse bu durum önlenabilir. Çeşitli dezenfektanları spesifik olarak nötrale eden maddeler tanımlanmıştır. Örneğin; klorheksidin etkisi, Lubrol W, yumurta lesitini ve Tween 80 ile formaldehid etkisi, amonyum iyonları ile glutraldehid etkisi de glisin ile nötrale edilebilmektedir (1,26).

Günümüzde en çok kullanılan testler kantitatif süspansiyon testleridir. Bu testler tıp dışında besin endüstrisinde, veteriner hekimlikte ve diş hekimliğinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Süspansiyon testinde dezenfektan madde ve bakteriler doğrudan etkileşmektedir. Bu testler en iyi sandardize edilen dezenfektan etkinlik testleridir (27).

Süspansiyon testlerinin çok sayıda avantajı vardır. Diğer testlere göre basittir ve maliyeti düşüktür. Laboratuvarında çok rahat uygulanabilmekte ve özel ekipmana ihtiyaç duyulmaz. İyi standardize edilmiş olmaları, tekrarlanabilir olmaları ve aynı şartlarda yeniden yapılabilir olmaları en önemli avantajlarıdır. Geniş bir kullanım alanları vardır. Bu testlerde temas süresi, ısı, mikroorganizma türü, engelleyici maddeler gibi birçok değişken aynı anda incelenebilir (28).

Süspansiyon testlerinin en önemli dezavantajları gerçek yaşam koşullarını yansıtmamalarıdır. Gerçek yaşamda mikroorganizmalar süspansiyon şeklinde değildir. Ortamda organik maddelerin biriktiği, kuruduğu, yüzeye tutunduğu ortamlarda bulunabilir. Yüzeylere tutunmuş bakterilerin dezenfektanlara daha dayanıklı olduğu bilinmektedir (29). Süspansiyon formunda dezenfektan ile mikroorganizma doğrudan etkileşmektedir. Süspansiyon testleri bu nedenle genellikle dezenfektanın germisidal etkisini yüksek gösterir. Süspansiyon testleri sonuçları pratiğe yönelik testler ile her zaman korelasyon göstermez. Tüm bu nedenlerden dolayı en iyi olarak tarama testleri şeklinde kullanılır. Alınan sonuçlar uygulama test sonuçları ile doğrulanmalıdır.

c. Kapasite testi: Süspansiyon testleri çok iyi standardize edilmiş olmalarına ve kolay uygulanabilmelerine karşın, gerçek yaşam koşullarını daha iyi yansıtan testler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri kapasite testidir. RW ve CM testlerinin birkaç dezavantajı bu metodların geliştirilmeye çalışıldığı 1960'lı yıllarda fark edilmiştir. Bunun üzerine 1965 yılında Kelsey ve arkadaşları yeni bir test için çalışmaya başlamış ve Kelsey Sykes (KS) testini geliştirmişlerdir. Kapasite testinde, dezenfektana birkaç kez bakteri eklenir ve bakterileri öldürme kapasitesi test edilir. Kirli bir enstrümanın dezenfektan solüsyonuna tekrar daldırılmasıyla, solüsyona bir miktar kir ya da bakteri eklenmiş olur. Artan bakteri ve kir yükü karşısında dezenfektanın aktivitesini koruması kapasitesinin göstergesidir. Kapasite testleri alet dezenfeksiyonu ve ortam temizliğinin uygulamalı olarak taklit edilmesi tarzında yapılır. Daha önceden belirlenmiş miktarda bakteri dezenfektanın uygulama solüsyonuna ilave edilir, bir süre maruz bırakılır ve daha sonra örnek alınarak yarı kantitatif yolla birkaç sıvı besiyerine aktarılır. Belli süre sonra ikin-

ci bakteri eklemesi yapılır ve ikinci subkültürler yapılır. Test edilen dezenfektan fenol gibi bir dezenfektanla karşılaştırılarak değerlendirilir.

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 yanısıdır. Avrupa ve İngiltere’de en çok kullanılan kapasite testi KS testidir. 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 ölü maya hücreleri ile süspansiyon edilerek test edilir. Dezenfektan sert suyla sulandırılır ve 3 mL’lik başlangıç volümüne 1 mL bakteri süspansiyonu eklenir ve 2 dakika sonra canlı koloni sayımı için kültürleri yapılır. Aralıklarla yeni bakteri eklemeleri ve canlı koloni için kültürler yapılarak dezenfektan kapasitesi hesaplanır (30-33).

Kapasite testleri alet ve yüzey dezenfeksiyonundaki pratik şartları iyi taklit eder. Ancak bu testleri standardize etmek kolay değildir. En önemli dezavantajları yorucu olmaları, zor yapılması ve tam olarak standardize edilememiş olmasıdır (34).

d. Taşıyıcı testi: İkinci faz deneylerinde kullanılan taşıyıcı testi bir dezenfektan maddenin alet veya yüzey dezenfeksiyona yönelik etkinliğini belirleyebilmek için yapılır. Bu test, enstrüman dezenfeksiyonu için tasarlanan preparatların değerlendirilmesi için değer taşır. Bu testte kumaş, cam, PVC, porselen, metal gibi taşıyıcı bir nesnenin yapay olarak mikroorganizmalarla bulaştırılır ve dezenfektanın önerilen kullanım konsantrasyonuna daldırılır. Belirli bir temas süresi sonrasında mikroorganizmaların ölüp ölmediği kontrol edilir. Taşıyıcı testi kalitatif veya kantitatif şekilde yapılabilir. Kalitatif taşıyıcı testinde bakteri bulaştırılmış bir kumaş parçası dezenfektana daldırılır ve 5-120 dakikalık temas süresi sonunda sıvı besiyerine kültürü yapılır. Üreme olmaması test edilen ürünün etkili olduğunu gösterir. Taşıyıcı testi, temas süresi ve aktif konsantrasyon ilişkisini belirlemeye yarar. Bu testin bir versiyonunda her testte 10 temiz çelik küçük silindir taşıyıcı kontamine edilir ve 10 dakika için 10 mL dezenfektana daldırılır. Sonra kültürü yapılır. Bu test fenol katsayısı test sonucunu konfirme eder ve uygulama için en etkili konsantrasyonu belirler (1,4,20).

Taşıyıcı testleri pratiğe yönelik testler olarak da değerlendirilebilir. Bu testler gerçek uygulama ortamında yapılarak uygulama ortamındaki değişkenlerin etkisi de hesaba katılmış olur. Taşıyıcı testlerinde çok çeşitli deney objeleri kullanılabilir. Halbuki pratiğe yönelik testlerde, örneğin alet dezenfeksiyon testlerinde, uygun alet veya enstrüman parçasının ya da benzerinin kullanılması gerekir. Kantitatif taşıyıcı testleri ile bakteriyel, fungusal, mikobakteriyel, virüsyel ve sporisyel etki ölçülebilmektedir (35). Kalitatif taşıyıcı testinde bakteri yüzeyden alınmaz ve taşıyıcı dağılımı solüsyon içine batırılır. Bu testte canlı bakterileri saptamak için sıvı besiyeri kullanılır. Bu da bakteri sayısının belirlenmesine olanak sağlamaz. Bu nedenle günümüzde taşıyıcı testleri artık kantitatif şekilde uygulanmak-

tadır. Bu testlerde temas süresi, mikroorganizma tipi, sert su, organik yük değişkenlerin etkisi de incelenebilmektedir. Birden fazla bakteri tipine aynı anda dezenfektanın etkisinin incelendiği ve gerçek yaşam koşullarını daha iyi yansıtan kombine dezenfektan etkinlik test uygulamaları da yapılabilmektedir (36).

2. Uygulama Testleri

Uygulama testleri gerçek yaşam koşullarında yapılan ikinci faz testleridir. Zaman-konsantrasyon ilişkisi in vitro testlerle ölçüldükten sonra bu uygulama testleri pratikte 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 faktörler in vitro testlerle daha iyi belirlenir. Bakterilerin taşıyıcı, el ve alet yüzeyinde kuruması hem bakteri sayısını azaltır hem de ölümlerine neden olur. Kurutma zamanı, aletin ısısı, nispi nemi ayrıca sulandırıcı besiyeri ve bakterinin üreme fazı test sonuçlarını 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 (1,4). Pratiğe yönelik dezenfeksiyon testleri de aslında birer taşıyıcı testidir. Temel prensipleri tamamen aynıdır. Bu testlerde taşıyıcı obje bakteri ile kontamine edildikten sonra kurutulur ve daha sonra dezenfektan ile muamele edilir (37). Oysa normal taşıyıcı testinde taşıyıcı nesne bakterilerle kontamine edildikten sonra, kurutulmadan hemen ıslak halde iken dezenfektan ile karşılaştırılır. Son yıllardaki taşıyıcı testleri artık pratiğe yönelik testlerdeki gibi kurutulularak uygulanmaktadır. Taşıyıcı testi deyimi ile artık yüzey, alet, el-cilt dezenfeksiyonu gibi pratiğe yönelik testler anlaşılmaktadır.

a. Alet dezenfeksiyon testi: Bu teknik taşıyıcı testine benzer olarak standardize metal parçası veya kateter kullanılarak yapılır. GSHM'ye göre alet dezenfeksiyon testleri taşıyıcı testlerinden farklı olarak tarif edilmiştir. Bu testte bakteri suşları sıvı besiyerinde süspanse edilir ve %20 oranında sığır kanı ile karıştırılır. Dezenfektan ise sert su ile sulandırılır ve buna %0.5 oranında sığır albumini ilave edilir. Standart yapıdaki ve ebatları belli lastik hortumlar kültür-kan karışımına 1 dakika için daldırılır ve sonra 37°C'de 4 saat kurutulur. Daha sonra dezenfektan solüsyonuna 15, 30, 45 ve 60 dakikalık süreler için konur. Bu temas sürelerinden sonra geri çekilir, nötralizörlü sıvı besiyeri ile yıkanır ve başka bir sıvı besiyerine ekilerek ekilerek 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 (1,4,38).

b. Yüzey dezenfeksiyonu testleri: Yüzey dezenfeksiyonu testleri bazı ülkelerde in vitro testler içinde değerlendirilir. Bu testler geliştirilirken, Heicken'in farklı bakterilerle infekte dışkının, ağaç, cam, kaplama ağaç gibi taşıyıcılar üzerinde kurutulmasıyla dezenfektan etkilerini incelediği çalışmadan esinlenilmiştir. GSHM, birkaç değişikliklerle bir yüzey dezenfeksiyon testi geliştirmiştir. Bu test kı-

saca şöyle yapılmaktadır. Uygulama odasında yer karoları, PVC taban, sentetik materyal kapları 5 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 (1,3). En iyi bilinen pratiğe yönelik test kantitatif yüzey dezenfeksiyon testidir. Taşıyıcı olarak cam, paslanmaz çelik levha, tahta parçası, üzeri pürüzlü çelik bir disk, plastik, formika, PVC, kumaş parçası gibi nesnelere kullanılır. Yüzey testinde belirli bir alana sahip taşıyıcı (örn. 5 x 5 cm'lik bir PVC parçası) belirli miktardaki standart test inokulumu ile kontamine edilir ve 60-90 dakika oda sıcaklığında kurutulur. Bakterilerin kendiliğinden ölmesinin azalmasını önlemek için test süspansiyonu %0.1 tripton içeren sıvı ile yapılır (39). Kuruma sonrası belirli hacimdeki dezenfektan solüsyonu taşıyıcı üzerine dökülür ve 5, 15, 30, 60, 120 dakika bekletilir. Temas süresi sonunda taşıyıcı nötralizan bulunan sıvı besiyeri ile yıkanır, durulanır ve bu durulama sıvısı katı besiyerine ekilerek canlı bakteri sayımı yapılır. Ya da, taşıyıcı nesne nötralizanlı sıvıya daldırılır, vortekslenir ve canlı bakteri sayımı için dökme plak tekniği uygulanır. Böylelikle kantitatif olarak canlı kalan bakteri sayısı belirlenir, ancak bu testlerde, süspansiyon testlerindeki kadar sağlıklı nicel sonuçlar alınmamaktadır. Bakterilerin taşıyıcı üzerinde, kurumaya bağlı olarak spontan ölüm oranı belirlenmelidir. Test ve kontrol sonuçları karşılaştırılarak canlı mikroorganizma sayısındaki azalma saptanır (40,41).

Yüzey dezenfeksiyonu testleri kolay uygulanır, pahalı uygulama ve gereç gerektirmez ve tekrarlanabilir. Bu testlerdeki en önemli zorluk bakterilerin yüzeyden alınması sorunudur. Bu işlem ya imprint yapılarak veya yıkama metodu ile gerçekleştirilir. Test sonuçlarını organik maddenin varlığı ve miktarı, canlı bakterileri belirleme yöntemi ve dezenfeksiyon işlemi (spreyleme, silme) etkilemektedir. Yıkama metodu ile bakterilerin ayrılması daha kolay ve bakteri sayısı daha kolay hesaplanmaktadır. Ancak, kurutulma işlemi dezenfektan etkisi olmaksızın bakterilerin ölümüne yol açabilmekte, yıkama tekniğinde taşıyıcıdaki tüm bakteriler sayım plaklarına alınamayabilmektedir. Böyle durumlarda dezenfektanın etkisi olduğundan daha güçlü gibi görülebilir.

c. El-cilt dezenfeksiyon testi: Bu testlerde yapay olarak kontamine edilen el parmakları üzerine antiseptik solüsyon uygulanır ve mikroorganizmaları öldürüp öldürmediği incelenir (42). Bu teknikte en çok *S. aureus* ve *E. coli* test bakterisi olarak kullanılır. Önce eller mikroorganizma solüsyonuna daldırılır, kurutulur ve parmak uçları petri plaklarına sürülür. Daha sonra eller antiseptik solüsyon ile belli bir süre (15, 30, 60 saniye) temas ettirilir. Temas süresi sonunda parmak uçları tekrar nötralizan sıvı içeren petri plaklarına sürülerek kültürü yapılır. Canlı mikroorganizma sayımı yapılarak dezenfektanın etkinliği belirlenir.

El dezenfektanlarının değerlendirilmesinde parmak uçları ile yapılan kantitatif taşıyıcı deney standart olarak kullanılmaktadır. Antiseptiklerin antiviral kapasitesi de bu yöntemle değerlendirilebilmektedir. Antiseptikle temas süresi so-

nunda parmaklardaki virüsün titrasyonu yapılarak başlangıçtaki sayı ile karşılaştırılır ve virüs sayısındaki azalma belirlenir. Antiseptiğin, virüs infektif titresini kontrole göre en az 3-4 log'luk anlamlı bir şekilde azaltması yeterli görülmektedir (43,44).

d. Dokuma dezenfeksiyon testleri: Dokuma dezenfeksiyonunun etkinliğini ölçmede 1., 2. ve 3. faz testleri kullanılabilir. Belli ısı ve 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 3. faz testleri de gereklidir. Dezenfektan, standart sert suda %0.1'lik sığır albumini varlığında sulandırılır ve bakteri ile kontamine test parçası dezenfektan içinde 12-14°C'de 4, 6 ve 12 saat tutulur. Bir başka testte, (kemotermal çamaşırlar için) kontamine test parçası diğer hastane çamaşırı ile birlikte yıkanır. Sonra bunun 500 mL'lik yıkama suyu kantitatif olarak canlı kalan bakteri için incelenir. Çamaşır için Uluslararası Bilimsel ve Teknoloji Komitesinin önerisine göre 12.5 cm çapındaki dokuma parçası at serumu içindeki *S. faecalis* NCTC 10927 ile bulaştırılır ve bir gece oda ısısında kurutulur. Bir yıkama siklusundan sonra 12 x 12 mm'lik kısmı kesilip 5 mL dilüent içinde homojenize edilir. Canlı kalan bakteri açısından incelenir. Çamaşırın bakteriyostatik etkisi de incelenmelidir (1).

e. Hava dezenfektanlarının değerlendirilmesi: İnfeksiyonların bir geçiş yolu da hava yoludur. Koğuşlar, sinema, yatak odaları gibi kapalı ortamlar bu yolla bulaş için uygun ortamlardır. Hastanelerde girişimlerin bakterilerden arınmış ortamda yapılması istenir. Atmosferin dezenfeksiyonu oldukça önemlidir. İşin yapılacağı ortamda dezenfektanlar gaz, buhar tarzında ya da aerosol olarak kullanılır.

Havadaki canlı mikroorganizmaların ölçülmesinde en basit yöntem Koch tarafından 1881 yılında geliştirilen, içinde katı besiyeri olan petri plağının açık bir şekilde hava ile temasta tutulması ve sonra inkübasyonu tarzında yapılan testtir. Bu yöntem, havada duran mikroorganizmaların yerçekimi etkisiyle zaman içinde plağa düşmesinden yararlanılarak hava temizliğini ölçmek için kullanılmaktadır. Özellikle aseptik işlemlerin yapılacağı ortamlarda uygulanmaktadır. Daha sağlıklı veriler yerçekiminden daha değişik bir gücün kullanılmasıyla elde edilebilir. Sayım için daha erken sonuç almak için değişik düzenekler de kullanılabilir. Belli miktar havayı emerek petri plağı yüzeyine aktaran düzenekler sayesinde havanın 1 m³'ünde bulunan mikroorganizma sayısı belirlenebilmektedir (1,4).

3. Kullanım Etkinliği (In-Use) Testleri

Bir dezenfektanın etkili olup olmadığını kesin olarak doğrulayan test, sahadaki gerçek uygulama şartlarında yapılan ve dezenfektan maddenin infeksiyon veya mikroorganizmanın bulaşmasını önlediğini kanıtlayan kullanım etkinliği testleridir. Ancak gerçek yaşamda buna dayanarak bir dezenfektanın etkinliğinin değerlendirilmesi çok zordur. Çünkü infeksiyonun meydana gelmesi birçok faktöre bağlıdır ve bu deneyde bu faktörlerden sadece birisi test edilebilmektedir. Bak-

terisidal ürünlerin güvenilirliği, sadece kabul edilen testlerle, kullanım koşullarında kontaminasyon ya da enfeksiyon geçişini önlemeleri test edilerek değerlendirilebilir. In-use testi bir dezenfektanla yapılan çevre dezenfeksiyonunun dolaylı olarak mikrobiyolojik yönden değerlendirilmesidir. Çevre bakteriyel kontaminasyonunun azalması enfeksiyon sıklığının azalmasına bir kanıt teşkil etmemektedir. Ancak enfeksiyon sıklığının azalması ortamdaki mikrobiyal kontaminasyon düzeyinin kontrol altına alınması ile ilişkili olabilmektedir. Bir yüzeyin dezenfeksiyonundan sonra o yüzeyin kontaminasyon derecesi uygulanan işlemin doğruluğunu 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 ve 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 ya da aletlerin bulunduğu kaptan bir miktar sıvı alınır, nötralizan sıvı 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 tekniği de bu amaçla kullanılabilir. In-use testi, hastanelerde dezenfeksiyon işleminin yeterliliğini ölçmede çok yararlı bir yöntem olmasına karşılık genellikle rutin olarak kullanılmamaktadır (1,4,45).

Mikobakterisidal Aktivite İçin Testler

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

AOAC mikobakterisidal aktivite ölçümü için taşıyıcı testini önerir. Bu testte, *M. smegmatis* ve doğrulamak için *M. tuberculosis* var. *bovis* (BCG) kullanılır. Taşıyıcı olarak porselen parçaları kullanılır. Her testte 10 taşıyıcı kullanılır. Taşıyıcılar kontamine edilir ve 10 dakika dezenfektana maruz bırakılır. Daha sonra her parça taşıyıcı 10 mL serum ya da nötralizan olan tüpe transfer edilir. Sonra 2'şer mL serum alınıp kültür yapılır. On parçadaki tüm bakterileri öldüren maksimum dilüsyon, maksimum güvenli uygulama konsantrasyonu olarak belirlenir. Birinci faz testi olarak, bir parça pamuklu dokuma parçası taşıyıcı olarak, *M. tuberculosis* 25618'te test bakterisi olarak kullanılır. Bakteri ile bulaştırılan taşıyıcı, 2 ile 120 dakika süre için dezenfektan solüsyonunda bekletilir. İki kere nötralizan ile yıkanıp Löwenstein-Jensen besiyerine aktarılır. İkinci faz testinde, dokuma, yüzey, enstrüman ve balgam dezenfeksiyonu incelenir. İlk faz testinde kullanılan taşıyıcı ve dokumalar yapay balgam ile (bakteri bulaştırılmış) kontamine edilir. Bol basil bulunan gerçek balgamda kullanılabilir. Dezenfektan ile temastan sonra kontamine materyal kobaya inoküle edilir. Mikobakteriler için kullanılan test yöntemlerindeki prensipler diğer sporsuz bakterilerdeki gibidir (46,47).

Sporisidal Aktivite İçin Dezenfeksiyon Testleri

Dezenfektanların sporisidal 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 sporisidal test olarak modifiye edilmişlerdir. Bir bakterisidal dezenfektandan canlı spor sayısında 5 dakikada 5 değerinde mikrobisidal etki göstermesi beklenir. En ünlü sporisidal test AOAC'nin önerdiği taşıyıcı testidir. Porselen küçük silindirler ya da ipek sütürler taşıyıcı olarak, *Bacillus subtilis* ya da *Clostridium perfringens* sporları ise standart suşlar olarak kullanılır. Bakteri sporları 2.5 normal değerindeki hidroklorik aside dirençliliklerine göre standardize edilmişlerdir. Testte 10 taşıyıcı kullanılır. Bir preparata sporisidal denebilmesi için en az 60 uygulamanın 59'unda sporların tümünü öldürmesi gereklidir. Sporisidal aktivite ya sıvı süspansiyon içinde ya da taşıyıcıda kuru spor varlığında incelenir. Prensipten testler diğer bakterisidal testler gibidir. Ancak işlem sporun germinasyonuna yol açabilir. O nedenle inkübasyonun birkaç gün için sürdürülmesi gerekir (1,6,20).

Mantarlara Karşı Dezenfektan Etkisinin Ölçülmesi

Bazı bakterisidal testler mantarlar için modifiye edilmiştir. *S. cerevisiae*, *Candida albicans* ve *Trichophyton mentagrophytes* test organizimleri olarak kullanılır. Kirli koşul için yapılan testte, 2 x 20 x 2 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 nütrient agarda üreme semikantitatif olarak değerlendirilir. AOAC'nin önerdiği modifiye fenol-katsayısı kalitatif süspansiyon testinde test suşu olarak *T. mentagrophytes* kullanılır. Beş, 10 ve 15 dakikalık dezenfektan ile temas sonrası nötralizasyon uygulanır ve sonra dekstroz broth'a ekimle canlılık kontrolü yapılır. On dakikada mantarları öldüren en yüksek dilüsyondaki dezenfektanın, patojen mantarlarla bulaşık yüzeyleri dezenfekte edeceği kabul edilir. Funguslar potansiyel patojen olup farmasötik preparatları kontamine edebilir. Testler antibakteriyel aktivite testlerine benzerse de mantarların üreme ihtiyaçlarına göre yapılır. Tipik besiyeri Sabouraud sıvı besiyeri ve Czapek-Dox besiyerleridir. Gerekirse iki besiyeri de agarla katılaştırılabilir. Kantitatif süspansiyon testlerinde fungal spor ya da miçelyum test solüsyonuna eklenir ve test bakterilerde yapıldığı gibi yapılır (1).

Virüslere Karşı Dezenfektan Etkisinin Ölçülmesi

Bu konuda büyük teknik problemler vardır. Virüsler 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 teknik donanımı yüksek laboratuvarlarda yapılabilmektedir. Test hayvanlarda yapılabilen ve canlı kalan virüsler yönünden in-

celeme yapılmaktadır. Ancak bu in vivo testlerde her zaman in vitro testlerdekine benzer sonuçlar alınmamaktadır.

Doku kültürü veya yumurta inokülasyonu ile yapılan testlerde maya süspansiyonu olan ortamda sert suda uygun dezenfektan konsantrasyonu ayarlanır. Uygun zaman için inaktive at serumu ile sulandırılan virüs süspansiyonu doku kültürüne ya da embriyonlu yumurtaya eklenir. Sonuçlar dezenfektansız virüs inoküle edilmiş kontrol kültürüyle karşılaştırılarak değerlendirilir. Dezenfektanın kendisi de doku kültürüne toksik olabileceğinden toksisite testide yapılmalıdır. İnaktive serumla sulandırılan dezenfektan canlı sisteme eklenip günlük olarak yaptığı zarar açısından incelenir.

Plak sayımı ile yapılan testler poliovirüs, herpesvirüs, rotavirüs gibi sınırlı sayıda virüs için kullanılabilir. Virüs değişik konsantrasyonda dezenfektanla karıştırılıp üzerinde monolayer yavru hamster böbrek hücreleri üremiş ve suyu dökülmüş şişelere konur. Sonra canlı kalan virüsler için plak sayımı yapılır. Kontrol serisinde de virüs eklenen şişelerde oluşan plaklar sayılır.

Dezenfektan etkinliği incelenen testler hayvan modelinde de yapılmaktadır. HBV, hücre kültüründe üretilmemektedir. Bu nedenle dezenfektan etkinlik testi şempanzede yapılır. Şempanze dezenfektanla işlenmiş ve işlenmemiş virüs ile infekte edilir. Ördek HBV'si, insan HBV'si için uygun bir model olabilir. Testin değerlendirilmesi viral DNA polimerazının dezenfektan tarafından inaktive edilmesine dayanır. Enzimin madde tarafından inaktive edilmesi infektivitesini de engeller. Dane partikülü HBsAg, HBcAg ve HBeAg denen 3 antijen taşır. HBsAg'nin gösterilmesi canlı virüs varlığına kanıt kabul edilir. Dezenfektan eğer HBsAg oluşumunu engellemişse virüse etkilidir. Virüs morfolojisindeki değişim de virüsidal aktiviteyi göstermektedir.

Endojen revers transkriptaz enzimine sahip virüslerde, dezenfektanların, RNA-bağımlı DNA polimeraz (RT) enzimine etkilerine bakılır. Dezenfektan etkinliği virüsün T lenfositlerinde yaptığı sitopatik etkinin ölçülmesiyle de değerlendirilir. Bakteriyofajlar, virüsidal aktivite incelenmesi için kullanılabilen daha kolay sistemler oluşturur (1,48).

KAYNAKLAR

1. Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles and Practice of Disinfection Preservation and Sterilisation. Blackwell Scietifitic Publication, 1982:134-57.
2. Gröschel DHM. Disinfectant testing in USA. J Hosp Infect 1991;18(Suppl A):274-9.
3. Van Klingeren B. Disinfectant testing on surfaces. J Hosp Infect 1995;30:397-408.
4. Miner N. Principle to guide international standard tests for liquid chemical germicides: A proposal. J AOAC Int 1999;82:669-75.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. Reybrouck G. International standardisation of disinfectant testing: is it possible? *Hosp Infect J* 1991;18(Suppl A):280-8.
9. Mariscal A, Carnaro-Varo M, Gutierrez-Bedmar M, et al. A fluorescent method for assessing the antimicrobial efficiency of disinfectant against *E. coli* ATCC 35218 biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;77:233-40.
10. Alici Ö. Dezenfeksiyonu etkileyen faktörler, 5. Ulusal Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2007:35-40.
11. Weber DJ, Barbee SL, Sobsey MD, Rutala WA. The effect of the blood on the antiviral activity of sodium hypochlorite, a phenolic, and a quarternary ammonium compound. *Infect Cont Hosp Epidem* 1999;20:821-7.
12. Fraise AP. European norms for disinfection testing. *J Hosp Infect* 2008;70:8-10.
13. Steinmann J. Some principles of virucidal testing. *J Hosp Infect* 2001;48(SupplA):15-7.
14. Reybrouck G. Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of disinfectants. In: Fraise AP, Lambert PA, Mailard JY (eds). *Russell, Hugo, Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*. 4th ed. Oxford: Blackwell, 2004:220-40.
15. Kampf G, Hollingsworth A. Validity of the four European test strains of prEN 12054 for the determination of comprehensive bactericidal activity of an alcohol-based hand rub. *J Hosp Infect* 2003;55:226-31.
16. Gebel J, Sonntag HB, Werner HP, Vacata V, Exner M, Kistemann T. The higher disinfectant resistance of nosocomial isolates of *Klebsiella oxytoca*: How reliable are indicator organisms in disinfectant testing. *J Hosp Infect* 2002;50:309-11.
17. Reichel M, Heisig P, Kampf G. Pitfalls in efficiency testing: How important is the validation of neutralization of chlorhexidine gluconate. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;2:7-20.
18. Garcia MT, Pelaz C. Effectiveness of disinfectants used in cooling towers against *Legionella pneumophila*. *Chemotherapy* 2008;54:107-16.
19. Pires JR, Junior CR, Pizzolitto AC. In vitro antimicrobial efficiency of a mouthwash containing triclosan/gantrez and sodium bicarbonate. *Braz Oral Res* 2007;21:342-7.
20. Reybrouck G. A theoretical approach of disinfectant testing. *Zbl Bakt Hyg* 1975;160:342-67.
21. Block C, Furman M. Association between intensity of chlorhexidine use and microorganisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect* 2002;51:201-6.
22. Koljalg S, Naaber P, Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect* 2002;51:106-13.
23. 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; 17:136-8.
24. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. İzmir: Barış Yayınevi, 1996.
25. Reybrouck G. A comparison of the quantitative suspension tests for the assessment of disinfectants. *Zbl Bakt Hyg* 1980;170:449-56.
26. Kampf G, Hofer M, Ruden H. Inactivation of chlorhexidine for in-vitro testing of disinfectants. *Zentralbl Hyg Umwelmed* 1998;200:457-64.
27. Reybrouck G. The testing of disinfectants. *Int Biodet Biodeg* 1998;41:269-72.

28. Holah JT, Lavaud A, Peters W, Dye KA. Future techniques for disinfectant efficacy testing. *Int Biotet Biodeg* 1998;41:273-9.
29. Gibson H, Elton R, Peters W, Holah JT. Surface and suspension testing: Conflict or complementary. *Int Biotet Biodeg* 1995;36:375-84.
30. Kelsey JC, Maurer IM. An improved (1974) Kelsey-Sykes test for disinfectants. *The Pharmaceutical Journal* 1974;30:528-30.
31. Cowen RA. Kelsey-Sykes capacity test: A critical review. *The Pharmaceutical Journal* 1978;4:202-4.
32. 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.
33. Bergan T, Lystad A. Disinfectant evaluation by a capacity use-dilution test. *J Appl Bacteriol* 1971;34:741-50.
34. Mattila T. A modified Kelsey-Sykes method for testing disinfectants 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride reduction as an indicator of bacterial growth. *J Appl Bacteriol* 1987;62:551-4.
35. Sattar SA, Springthorpe VS, Adegbunrin O, Zafer AA, Busa M. A disc-based quantitative carrier test method to assess the virucidal activity of chemical germicides. *J Virol Method* 2003;112:3-12.
36. Best M, Springthorpe VS, Sattar SA. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: Studies with a mixture of five types of microorganisms. *Am J Infect Cont* 1994;22:152-62.
37. Sagripanti JL, Bonifacino A. Bacterial spores survive treatment with commercial sterilants and disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4255-60.
38. Duc DL, Ribiollet A, Dode X, Ducel G, Marchetti B, Calop J. Evaluation of the microbicidal efficacy of Steris System I for digestive endoscopes using GERMANDE and ASTM validation protocols. *J Hosp Infect* 2001;48:135-41.
39. Van Klingerden B, Koller W, Bloomfield SF, et al. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. *Int Biotet Biodeg* 1998;41:289-96.
40. Bloomfield SF, Arthur M, Van Klingerden B, Pullen W, Holah JT, Elton R. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. *J Appl Bacteriol* 1994;76:86-94.
41. Bloomfield SF, Arthur M, Begun K, Patel H. Comparative testing of disinfectants using proposed European surface test methods. *Lett Appl Microbiol* 1993;17:119-25.
42. Kampf G, Meyer B, Goroncy-Bermes P. Comparison of two test methods for the determination of sufficient antimicrobial activity of three commonly used alcohol-based hand rubs for hygienic hand disinfection. *J Hosp Infect* 2003;55:220-5.
43. Kramer A, Galabov AS, Satar SA, et al. Virucidal activity of a new hand disinfectant with reduced ethanol content: Comparison with other alcohol-based formulations. *J Hosp Infect* 2006;62:98-106.
44. Sattar SA, Ansari SA. The fingerpad protocol to assess hygienic hand antiseptics against viruses. *J Virol Methods* 2002;103:171-81.
45. Prince J, Ayliffe GAJ. In-use testing of disinfectants in hospital. *J Clin Path* 1972;25:586-9.
46. Sattar SA, Best M, et al. Mycobactericidal testing of disinfectant: An update. *J Hosp Infect* 1995;30:372-82.
47. Griffiths PA, Babb JR, Fraiss AP. *M. terrae*: A potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test. *J Hosp Infect* 1998;38:183-92.
48. Bellamy K. A review of the test methods used to established virucidal activity. *J Hosp Infect* 1995;30:389-96.