

Biyosit Etkinlik Testleri (BET): Prensipler, Yöntemler ve Uygulamalar^s

Biocide Efficacy Tests (BET): Principles, Methods and Applications

Ali Öztürk*, Ayşe Kalkancı**

* Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Niğde, Türkiye

** Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Atıf/Citeas: Öztürk A, Kalkancı A. Biyositetkinliktestleri (BET): Prensipler, yöntemler ve uygulamalar. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(2):99-113.

Öz

Biyositler (dezenfektanlar ve antiseptikler) hastalıkların önlenmesinde ve tıbbi, endüstriyel ve gıda üretim ortamlarında mikroorganizmaların sayısını azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyosit etkinlik testleri (BET), bir biyositin mikroorganizmaları etkili bir şekilde kontrol etme veya yok etme yeteneğini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Biyosit ürünlerin etkinliğini belirlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Biyositlerin antimikrobiyal aktivitesini ölçmek için kantitatif ve kalitatif süspansiyon testleri kullanılır. Ayrıca, fenol katsayısı testi, taşıyıcı testleri ve pratik testler de dahil olmak üzere çeşitli test metodolojileri mevcuttur. Biyositlerin etkinliğini tespit etmek için Avrupa Standartları (EN) 14348 ve EN 14563 gibi standartlar kullanılmakta, testler belirli sıcaklıklar ve temas süreleri altında gerçekleştirilmekte ve mikrobiyal popülasyonlardaki logaritmik azalmanın ölçülmesi yoluyla değerlendirilmektedir. Biyositlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, sağlık, gıda güvenliği ve tarım dahil olmak üzere birçok alanda büyük önem taşımaktadır. Bu testler, biyositlerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkilerini değerlendirirken düzenleyici kurumlar tarafından istenen standart testlerdir. BET ile ilgili araştırma ve geliştirme çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Bu alanda yapılan her yeni çalışma, testlerin doğruluğunu ve uygulanabilirliğini artırmak için önemli bir fırsat sunmaktadır. Sonuç olarak, BET'nin gerekliliği giderek daha fazla kabul gördükçe, bu alandaki araştırma ve geliştirme faaliyetlerine olan talep de artmaktadır. Bu derleme, BET'nin türleri, uygulama alanları, standartları ve önemi hakkında kapsamlı bilgiler sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyosit, etkinlik testleri, enfeksiyon kontrolü, dezenfektan, EN standartları

ABSTRACT

Biocides (disinfectants and antiseptics) are commonly used to prevent disease and reduce the number of microorganisms in medical, industrial, and food production settings. Biocide efficacy tests (BET) are conducted to determine the ability of a biocide to effectively control or destroy microorganisms. Various methods have been developed to determine the effectiveness of biocidal products. Quantitative and qualitative suspension tests are used to measure the antimicrobial activity of biocides. Additionally, various testing methodologies are available, including phenol coefficient testing, carrier tests, and practical tests. Standards such as European Standards (EN) 14348 and EN 14563 are employed to ascertain the efficacy of biocides, with tests conducted under specified temperatures and contact times and evaluated through the measurement of logarithmic reduction in microbial populations. The assessment of the efficacy of biocides is of significant importance in many fields, including healthcare, food safety, and agriculture. These tests are standardized tests that are required by regulatory agencies when assessing the effects of biocides on human health and the environment. Research and development studies on BET are of great importance. Each new study in this field provides a significant opportunity to enhance the accuracy and applicability of the tests. Consequently, as the necessity of BET is increasingly acknowledged, the demand for research and development activities in this field is also growing. This review provides comprehensive information on the types, application areas, standards, and significance of BET.

Keywords: Biocide, efficacy tests, infection control, disinfectant, EN standards

Alındığı tarih / Received:

02.09.2024 / 02.September.2024

Kabul tarihi / Accepted:

12.02.2025 / 12.February.2025

Yayın tarihi / Publication date:

20.06.2025 / 20.June.2025

ORCID Kayıtları

A. Öztürk 0000-0003-2428-1831

A. Kalkancı 0000-0003-0961-7325

^s Bu derleme, 13-17 Kasım 2024 tarihleri arasında Antalya'da düzenlenen XLI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

✉ ozturkali@ohu.edu.tr

GİRİŞ

Genel olarak “biyosit” terimi, canlı mikroorganizmaların üremesini inhibe eden “mikrop öldürücü” bir madde veya aktivitesini durduran “mikrobisit” bir ürünü tanımlamaktadır. Biyositler

mikroorganizmaların kontrolü için yaygın olarak kullanılmaktadır⁽¹⁾. Biyosidal ajanlar hastanelerde ve diğer sağlık kurumlarında yüzeylerde ve hastalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyositler, enfeksiyon kontrol uygulamalarının önemli bir parçası olup, sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonların önlenmesine

yardımcı olurlar⁽²⁾. Genel olarak biyosit ürünlerin (dezenfektan ve antiseptik) formülasyonları karmaşıktır. Aktif maddelere ek olarak dezenfektanın etkisini etkileyebilecek yüzey aktif maddeler veya yumuşatıcılar gibi yardımcı maddeleri de içerebilir. Bu nedenle belirli bir aktif maddenin kullanılmasını tavsiye etmek, uygun biyosidal ürünün belirlenmesi için yeterli değildir⁽³⁻⁵⁾.

Biyositlerin antimikrobiyal aktiviteleri çeşitlilik gösterdiğinden üremeyi engelleyen ajanlara atıfta bulunan “-statik” (örneğin, bakteriyostatik, fungistatik ve sporistatik) ve hedef organizmayı öldüren ajanlara atıfta bulunan “-sidal” (örn. sporisidal, virüsidal, bakterisidal ve fungisidal) terimleri kullanılır⁽³⁾. Biyosit ürünlerin etkinliğini karşılaştırmak için standardize edilmiş bir test protokolüne sahip olmak önemlidir⁽⁵⁾. Biyositlerin etkinliğini objektif olarak değerlendirebilmek için anlamlı etkinlik verilerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN, Fransızca Comité Européen de Normalization) tarafından 1990 yılında kimyasal biyositler için Teknik Komite (TC) 216 kurulmuştur. Bu TC’nin kapsamı kimyasal dezenfektanların ve antiseptiklerin kullanımı ve etiketlenmesine ilişkin terminolojinin, gerekliliklerin, test yöntemlerinin (kullanım koşulları altında potansiyel etkililik dahil) standardizasyonuna yönelik kılavuz oluşturmaktır. Bu komite, farklı Avrupa ülkelerinden gelen delegelerin yanı sıra hükümetlerden, yetkili makamlardan, resmi kurumlardan, üniversitelerden, test laboratuvarlarından ve antiseptik ve dezenfektan üreticilerinden temsilcilerden oluşmaktadır^(6,7). Biyositlerin test edilmesine yönelik Avrupa standartları, ilgili test organizmalarının kullanıldığı kademeli bir yaklaşıma dayanmaktadır. Bu, etkinlik testlerinin kolaylaştırılmasına ve devam eden bir salgında hemen kullanılacak dezenfektanlara ilişkin yeterli pratik önerilerin geliştirilmesine yardımcı olur. Böylece bulaşıcı hastalıkların yayılmasını önlemek için gerekli önlemler paketine güven katacaktır⁽⁶⁾. Ayrıca bu testler, biyositlerin ekolojik etkinliklerini belirlemek, üzerlerindeki gerçek veya potansiyel tehlikeleri değerlendirmek için önemli bir araçtır⁽⁸⁾. Bu derlemede, biyosit etkinlik testlerinin (BET) türleri, uygulama alanları, standartlar ve önemine dair detaylı bilgiler sunulacaktır.

Biyositlerin Tanımı ve Türleri

Biyositler, sahip oldukları fonksiyonel gruba veya etki ettikleri hedefe göre birkaç grupta sınıflandırılabilir. Fonksiyonel kimyasal gruplara göre en az 22 farklı kategoride sınıflandırılırlar. Bununla birlikte etki hedefine göre biyositler genel olarak dört grupta sınıflandırılabilir: proteinler, hücre membranı, nükleik asitler ve hücre duvarı üzerinde etki gösterenler⁽⁹⁾. Ayrıca, biyosidal ajanlar etki mekanizması, uygulama alanı, hedeflenen substratlar dikkate alınarak karakterize edilebilir⁽³⁾.

Biyositler kimyasal ve kimyasal olmayan olarak sınıflandırılabilir; birincisi düşük biyouyumlulukla karakterize edilirken, ikincisi yüksek biyouyumluluğa sahiptir. Kimyasal kategorisine ait biyositlerin genellikle temel hücresel bileşenlerin (sitoplazmik enzimler) sentezine veya enerji üretimine (ATP sentezi) müdahale ederek mikroorganizmaların üremesini ve metabolizmasını inhibe edebilecekleri birincil etki moduna (MoA) sahip oldukları düşünülmektedir. Kimyasal olmayan biyositler, mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyolojik süreçlerin optimize edilmemesi için aralıklı olarak yüksek konsantrasyonlarda uygulanmasıyla karakterize edilir⁽⁹⁻¹¹⁾.

BET Nedir?

BET, bir biyositin mikroorganizmaları etkili bir şekilde kontrol etme veya yok etme yeteneğini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Bu laboratuvar testleri, biyosit ürünlerinin optimal formülasyonlara sahip olduğunu ve etkinliklerini kanıtlamak için kullanılır^(12,13). Ayrıca bu testler biyositlerin insan sağlığına zararı olup olmadığını ve çevre üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla da yapılmaktadır⁽¹⁴⁾. Bu şekilde biyosidal ürünlerinin güvenlik ve etkinlik standartlarına uyumluluğu sağlanır. Özellikle mikroorganizmaların kontrol altına alınmasında kullanılan biyositler, toplum sağlığının korunması için hayati öneme sahiptir. Bu nedenle doğru bir şekilde test edilmeleri ve gerekli gereksinimleri karşıladıklarının doğrulanması büyük önem taşır⁽¹⁵⁾.

BET Neden Önemlidir?

Biyosit ajanlarının etkinliği, ilaç üretim alanlarındaki mikrobiyal yükü azaltma kapasitesini kanıtlamak için performans testleri ile değerlendirilir. Bu testler, süspansiyon testleri, yüzey testleri ve saha denemeleri olarak üç aşamaya ayrılır⁽¹⁶⁾. Testler, kontamine yüzeylere biyosit uygulanarak ve ardından canlı organizma sayısının kontrol numunesi ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilir⁽¹⁷⁾. Özellikle yüzey testleri, biyositlerin etkinliğini değerlendirmek için en güvenilir yöntem olarak kabul edilir ve genellikle düzenleyici kurumlar tarafından talep edilir. Tedarikçiler etkinlik verilerini sağlasa da, kullanıcıların biyositlerin kendi özel operasyonel ortamlarına uygun olup olmadığını test etmeleri gerekir⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Yüzey testleri BET’inde en kritik testler olarak kabul edilir. Çünkü biyositin yüzeylere tutunmuş mikroorganizmaları (sesil veya yerleşik durum) inhibe etme kabiliyetini değerlendirirler. Bu genellikle planktonik mikroorganizmaları etkisiz hale getirmekten daha zordur⁽²¹⁾. Süspansiyon testlerinde belirlenen optimum konsantrasyon ve temas süresi yüzeyler için uygun olmayacağından düzenleyici kurumlar biyositlerin pratik koşullar altında etkisini göstermek için yüzey etkinlik testlerini isteyebilir. Ayrıca yüzey testleri kullanılacakları ortamlarda biyosit performansının daha gerçekçi bir değerlendirmesini sağlar. Bu da onları farmasötik üretim alanlarında biyosit etkinliğini doğrulamak için gerekli kılar^(18,21).

Düzenleyici kurumlar, üreticilerin ürünlerinin etkinliğini göstermek için uymaları gereken yönergeleri ve gereklilikleri belirleyerek biyosit etkinliğinin doğrulanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Avrupa Birliği Biyosidal Ürün Yönetmeliği gibi kurumlar, biyosit tedarikçilerinden ürünlerinin standart testler kullanılarak mikrobiyal popülasyonlarda önemli azalmalar sağlayabildiğini gösteren veriler sunmalarını istemektedir^(22,23). Buna ek olarak düzenleyici kurumlar biyositlerin uygunluğunun, etkinliğinin ve sınırlamalarının, gerçek kullanım senaryolarını yansıtan yüzey testleri de dahil

olmak üzere kapsamlı testlerle değerlendirilmesini beklemektedir⁽²⁰⁾. Bu, biyositlerin ilaç üretim alanları gibi kontaminasyon riskinin kritik olduğu ortamlarda mikrobiyal kontaminasyonu kontrol etmede etkili olmasını sağlar.

BET’nin Kullanım Alanları

BET, sağlık sektörü ile gıda ve tarım sektöründe geniş bir kullanım alanına sahiptir. Antimikrobiyal ilaçların yanı sıra uygun şekilde ve uygun ortamda uygulanan etkili biyosidal ajanlar, mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların gelişmesini büyük ölçüde sınırlayabilmektedir. Aynı zamanda hastane hijyeni ve sterilizasyon süreçlerinin izlenmesi ve değerlendirilmesinde de yaygın olarak kullanılır⁽¹⁵⁾. Gıda ve tarım sektöründe ise BET gıda ürünlerinin ve tarımsal ürünlerin mikrobiyal kontaminasyonunu belirlemek, gıda güvenliğini sağlamak ve tarım ilaçlarının etkinliğini değerlendirmek için kullanılır⁽¹¹⁾.

Sağlık sektöründe BET son derece önemlidir. Çünkü sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların önlenmesinde ve kontrol edilmesinde biyositler büyük bir rol oynamaktadır. Bunun dışında BET, medikal cihazların sterilizasyon süreçlerinin izlenmesi ve kontrol edilmesinde de kullanılmaktadır⁽²⁾. Bu testlerin etkin bir şekilde uygulanması, sağlık hizmetlerinin kalitesini artırmak ve hastane enfeksiyonlarıyla mücadelede büyük bir başarı sağlamak için gereklidir. Bununla birlikte biyositler hakkındaki bilgi birikimi, mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesiyle ilgili olarak hala yeterince önemsenmeyen bir alandır⁽¹⁶⁾.

Gıda ve tarım sektöründe BET, gıda güvenliğini sağlamak ve tüketicilerin sağlığını korumak amacıyla kullanılmaktadır. Bu testler, gıda ürünlerinde bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi ve mikrobiyal kontaminasyonunun engellenmesini göstermektedir⁽²⁴⁾. Ayrıca tarımsal ürünlerde kullanılan pestisit gibi kimyasal maddelerin etkinliği de bu testler aracılığıyla değerlendirilir. Böylece, gıda ve tarım sektöründe üretim süreçlerinin kontrol altında tutulması ve ürünlerin güvenliğinin sağlanması amaçlanır⁽²⁵⁾.

BET, çevre ve endüstriyel alanlarda önemli bir yere sahiptir. Endüstriyel alanlarda kullanılan kimyasal maddelerin çevreye zarar verip vermediğini belirlemek için yapılan bu testler, çevresel sürdürülebilirlik açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca su arıtma sistemleri gibi çevresel uygulamalarda da BET su kaynaklarının korunması ve temizlenmesi için hayati bir rol oynar^(26,27).

BET'nin Temel İlkeleri

BET'nin temel ilkeleri, biyositin etkinliğini belirlemek için kullanılan yöntemleri, protokollerini ve standartlarını kapsar. Bu temel ilkelerin içinde yer alan standart testlerin güvenilirliğini, doğruluğunu ve karşılaştırılabilirliğini sağlamak amacıyla oluşturulmuştur. Bu sayede BET'nde elde edilen sonuçlar daha tutarlı ve doğru bir şekilde yorumlanabilir. Ayrıca bu standartlar sayesinde farklı laboratuvarlarda yapılan testlerin sonuçları karşılaştırılabilir ve güvenilir bir şekilde değerlendirilebilir. Her bir testin yapılması gereken adımları, ölçüm sistemlerini, analiz yöntemlerini ve sonuçların raporlanmasını detaylı bir şekilde açıklar. Bu şekilde BET'nin doğru ve güvenilir sonuçlanması sağlanır. Biyositin etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan testlerde standart prosedürlere uyulması sonuçların güvenilirliğini artırır^(28,29).

BET'nde doğruluk ve duyarlılık yüksek olmalıdır. Bu nedenle test öncesinde doğruluk ve duyarlılığın optimize edilmesi gerekmektedir. Bunun için kullanılan test yöntemlerinin en son teknolojilerle güncellenmesi ve validasyon süreçlerine tabi tutulması önemli bir adımdır. Ayrıca testlerin yapıldığı laboratuvarların kalite kontrol süreçlerini sıkı bir şekilde uygulaması da büyük önem taşır. Doğruluk ve duyarlılığın yüksek olması sayesinde kullanıcılar biyosidal ürünlerin ne kadar etkili olduğunu ve beklentilerini karşılayıp karşılamadığını daha doğru bir şekilde değerlendirebilirler. Ayrıca bu bilgiler ürün geliştirme süreçlerinde de önemli bir rol oynar^(20,30,31). Eğer test sonuçları etkinlik açısından farklılık gösteriyorsa ürün formülasyonunda değişiklik yapılması gerekebilir. Ayrıca testlerin yapılacağı ortamın da kontrollü olması önemlidir. Sıcaklık, nem ve diğer çevresel faktörlerin test sonuçlarını

etkilememesi için uygun koşulların standart olması gerekir⁽³²⁾.

BET için Uluslararası Standartlar ve Yönergeler

Tıbbi alanda kullanılan biyosit ürünlerin aktivitesinin belirlenmesi için uluslararası standartlar ve yönergeler kullanılmaktadır. Bu standartlar ve yönergeler ürünlerin test edilmesi ve belgelendirilmesi sürecinde takip edilmesi gereken adımları belirler. Ayrıca bu standartlar ve yönergeler, ürünlerin uluslararası pazarda kabul edilebilirliğini sağlayarak ticaretin kolaylaştırılmasına ve kullanıcıların güvenliğinin artırılmasına yardımcı olur. Uluslararası standartlar ve yönergeler, biyosit ürünlerin güvenilirliği ve etkinliği konusunda küresel düzeyde bir standart oluşturur^(20,33).

Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN), Teknik Komite 216 (CEN/TC 216) tarafından bir biyosidal ürünün bakterisidal, sporisidal, mikobakterisidal veya tüberkülosidal, fungisidal veya mayasidal veya virüsidal aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemek için test yöntemlerini tanımlayan Avrupa Standartları (EN'ler) geliştirilmiştir (Tablo 1). Biyositler için standart olan EN 14885:2018, kimyasal dezenfektan ve antiseptik ürünlerin amaçlanan uygulamalarına uygun spesifik antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını göstermek için test edilmelerine yönelik laboratuvar yöntemlerini sunmaktadır^(7,16).

BET'in validasyonu için mikrobiyologu yönlendirmek üzere kullanılabilecek standartlar şunlardır; CEN; AOAC (Uluslararası Resmi Analitik Kimyagerler Birliği), ASTM (Amerikan Test Malzemeleri Derneği) standartları veya ulusal standartlardan TSE (Türk Standartları Enstitüsü) gibi profesyonel bir kuruluşun veya yayımlanan derlemelerin rehberliğinden yararlanabilir^(34,35).

Farmasötik üretim tesisleri için en önemli dezenfektan test standartları şunlardır:

1. ABD ASTM E2197-17: Kimyasalların bakterisidal, virüsidal, fungisidal, mikobakterisidal ve sporisidal aktivitelerinin belirlenmesinde standart kantitatif disk taşıyıcı test yöntemi⁽³⁶⁾.

Tablo 1. Tıbbi alanda kullanılan biyosit ürünleri için test mikroorganizmaları ve test yöntemleri^[43]

Dezenfektan Türü	Standart	Test mikroorganizmaları	Sıcaklık	Süre	Koşullar	Logaritmik azalma
Hijyenik el yıkama dezenfektanı	TS EN 13727+A2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442; <i>Escherichia coli</i> K12 NCTC 10538; <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	20°C	30-60 saniye	Kirli	≥ 3
Hijyenik el ovalama dezenfektanı (yıkama-durulama yapılmayan)	TS EN 13727+A2				Temiz	≥ 5
Cerrahi el yıkama dezenfektanı	TS EN 13727+A2			1-5 dakika	Kirli	≥ 5
Cerrahi el ovalama dezenfektanı (yıkama-durulama yapılmayan)	TS EN 13727+A2				Temiz	≥ 5
Hijyenik el yıkama dezenfektanı	TS EN 13624	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20°C	30-60 saniye arasında	Kirli	≥ 2
Hijyenik el ovalama dezenfektanı (yıkama-durulama yapılmayan)					Temiz	≥ 4
Cerrahi el yıkama dezenfektanı				1-5 dakika arasında	Kirli	≥ 4
Cerrahi el ovalama dezenfektanı (yıkama-durulama yapılmayan)					Temiz	≥ 4
Hijyenik el yıkama dezenfektanı	TS EN 14476+A2	Poliovirus Type 1, LSc-2ab; Adenovirus Type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5; Murine norovirus, strain S99 Berlin, Vaccinia virus Ankara (MVA), ATCC VR-1508 veya Vaccinia virus strain Elstree, ATCC VR-1549	20°C	30-120 saniye arasında	Kirli	≥ 4
Hijyenik el ovalama dezenfektanı (yıkama-durulama yapılmayan)					Temiz	
El dezenfektanı	TS EN 14348	<i>Myobacterium avium</i> ATCC 15769; <i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755 <i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	20°C	60 dakika zorunludur. İlave olarak 5, 15 ve 30 dakikalık testler yapılabilir.	Ürünün uygulanacağı şartlar dikkate alınarak temiz veya kirli koşul	≥ 4

TS: Türkiye Standardı, EN: Avrupa Standartları.

2. US ASTM E2614 -15: Temiz oda dezenfektanlarının değerlendirilmesi için standart kılavuz⁽³⁷⁾.

3. Avrupa EN 1276 (2019) ve EN 1650 (2019): Dezenfektanların bakterisidal ve fungisidal aktivitesini değerlendirmek için süspansiyon bazlı test yöntemleri^(28,39).

4. Avrupa EN 13697 (2015+A1) (2019): Dezenfektanların bakterisidal ve fungisidal aktivitesini belirlemek için yüzey bazlı test yöntemi⁽⁴⁰⁾.

5. Avrupa EN 13704 (2018): Dezenfektanların sporisidal aktivitesini değerlendirmek için süspansiyon bazlı test yöntemi⁽⁴¹⁾.

6. Avrupa EN 16615 (2015): Mekanik etkili (silme) dezenfektanların bakterisidal ve fungisidal aktivitesini belirlemek için yüzey tabanlı test yöntemi⁽⁴²⁾.

BET için Laboratuvar Teknikleri

Standart test prosedürlerinin kullanılması ve yorumlayıcı kriterlerin tanımlanması, antimikrobiyal ajanlara karşı mikrobiyal duyarlılıktaki değişiklikleri tanımlamak ve sınıflandırmak için ön koşullardır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) için “Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)” ve “Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi’nin (EUCAST)”

iyi oluşturulmuş standartları bulunmaktadır. Bu standartlar, uygulanması gereken yöntem ve malzemeleri tanımlamaktadır. ADT, otomatik sistemlerin yanı sıra agar disk difüzyon, gradiyent test (E-test), sıvı mikrodilüsyon ve sıvı makrodilüsyon veya agar dilüsyon gibi çeşitli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Elde edilen sonuçlar, test edilen mikroorganizmaların duyarlı veya dirençli kategorilerine ayrılmasını sağlar. Ancak bu ayırım bazı kriterlere bağlıdır. İki ana tür yorumlayıcı kriter vardır: klinik sınır değer (break point) ve epidemiyolojik sınır değer (ECOFF'lar veya ECV'ler)^(44,45).

Hastanelerde ve laboratuvarlarda kullanılan biyositler, etki ve etkinliklerinin belirlenmesi için Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) belirlenmesi dışındaki yöntemler ile periyodik olarak test edilmelidir. Bazı biyositler bekletildiklerinde veya organik madde eklendiğinde etkilerini kaybettiklerinden etkinlikleri periyodik olarak test edilmelidir. Bazı yöntemler, kullanım için biyosit ajanın doğru konsantrasyonunun seçilmesine yardımcı olurken, diğer testler kullanımda olan biyositin etkinliğini araştırır. Biyosidal ürün etkinlik testi için çeşitli laboratuvar yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler tasarımları ve deneysel ayrıntıları bakımından farklılık gösterse de bunların tümü kirli ve temiz koşullarda test mikroorganizmaya bir biyosit ajanı ekleme ve belirli sürelerde (saniye veya dakika) örnekleme ilkesine dayanmaktadır. Örnekteki biyosidal ürün daha sonra nötralize edilir ve canlı organizmaların sayısı değerlendirilir^(2,46).

Biyosit etkinliğinin ölçülmesinde kullanılan testler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma, testlerin hangi mikroorganizmalara karşı etkin olduğuna, hangi ortamlarda kullanılabileceğine ve hangi uygulama alanları için uygun olduğuna göre değişmektedir. Ayrıca, testlerin farklı ortamlarda ve uygulama alanlarında nasıl performans gösterdiğini belirlemek de bu sınıflandırmanın bir parçasıdır⁽¹⁰⁾.

Biyositlerin antimikrobiyal etkisini belirlemede çeşitli aşamalar ve ardından izlenecek adımlar şöyle sıralanır⁽⁷⁾;

Aşama 1: Biyositin temel etkinliği için süspansiyon deneyleri

Aşama 2- adım 1: Uygulamadaki kullanımı temsil eden koşullar altındaki süspansiyon deneyleri

Aşama 2- adım 2: Uygulama koşullarına benzeyen el yıkama, yüzey deneyleri gibi çalışmalar

Aşama 3: Uygulama koşullarındaki alan deneyleri

Biyosit etkinliğinin ölçülmesinde kullanılan testler belirli kriterlere göre sınıflandırılır⁽⁴⁷⁾. Bu kriterler şunlardır;

1. Test mikroorganizmaların türüne dayalı sınıflandırma:

I- Bakterisidal Testler: Bakterilere karşı etkinliği ölçer.

II- Sporisidal Testler: Bakteri sporlarına karşı etkinliği ölçer.

III- Mikobakterisidal Testler: Mikobakterilere karşı etkinliği ölçer.

IV- Fungisidal Testler: Mantar ve sporlarına karşı etkinliği ölçer.

V- Virüsidal Testler: Virüslere karşı etkinliği ölçer.

2. Metodolojik prensibe dayalı sınıflandırma

I- MİK belirlenmesi

II- Süspansiyon testleri

III- Kapasite testleri

IV- Uygulama testleri

3. Amaca yönelik spesifik testler

I- Yüzey dezenfeksiyonu

II- Alet dezenfeksiyonu

III- El ve cilt antisepsisi

El-cilt antisepsisi için veya amaca yönelik diğer testlerden herhangi biri için biyosit etkinliğini ölçen testlerin tümü kullanılabilir. Bu testlerde biyositlerin bakterisidal, sporisidal, mikobakterisidal, fungusidal etkileri belirlenebilir⁽⁴⁷⁾.

1. Mikroorganizmaların türüne dayalı sınıflandırma

Bakterisidal aktivitenin belirlenmesi

EN 13727:2012+A2:2015: Hijyenik ve cerrahi el yıkama yoluyla alet dezenfeksiyonu ve yüzey

dezenfeksiyonu için kullanılabilen geniş bir ürün yelpazesine uygulanabilir. Bu standarda göre bir bakterisit aşağıdaki bakteri türlerini öldüren bir üründür: *Escherichia coli* K 12 NCTC 10538 (el yıkama ürünleri ve el dezenfektanları için), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus hirae* ATCC 10541 ve *Enterococcus faecium* ATCC 6057 (aletleri 40°C sıcaklıkta dezenfekte etmek için). Test mikroorganizmaların çoğaltılması ve canlı bakteri sayımı için besiyeri olarak Triptik Soy Agar (TSA) kullanılır. Ürün, belirtilen test koşulları altında bakteri sayısını en az 5 log₁₀ oranında azaltıyorsa, yukarıdaki standardın gerekliliklerini karşılar; hijyenik el yıkama ürünlerinde ise azalma en az 3 log₁₀ olmalıdır. Test temiz ve kirli koşullarda uygulanabilir. Bu standart, hijyenik el yıkama ve el dezenfeksiyonu için 30 ila 60 saniye arasında, cerrahi el yıkama ve el dezenfeksiyonu için 60 saniye ile 5 dakika arasında değişen temas sürelerinde test koşulları sağlar. Nötralizasyon süresi 5 dakikaya ayarlanır; ancak kısa temas sürelerinde test ürünü belirli bir nötralizasyon süresi boyunca bakteriyostatik değil bakterisidal etkiye sahip olabilir⁽⁴⁸⁾.

Yüzey testleri (Aşama 2, adım 2), testin uygun şekilde hazırlanmış bir yüzey üzerinde yapılması da dahil olmak üzere belirli bir ürünün pratik kullanım koşullarını aşama 2, adım 1 testlerinden daha fazla simüle eder. Antiseptikler için test yöntemi gönüllü insanların elleri iken, yüzey dezenfeksiyonunda önerilen biyositler için buzlu cam plakalar ve paslanmaz çelik diskler kullanılmaktadır. Ayrıca, gözeneksiz yüzeylerde mendil kullanılarak mekanik etki ile bakterisidal ve mayasidal aktivite için bir test standardı da geliştirilmiştir^(49,50).

EN 1499:2013: Su ve antimikrobiyal sabun kullanılarak hijyenik el yıkamayla ilgilidir. Test organization *E. coli* K 12 NCTC 10538 gönüllülerin (12–15 sağlıklı yetişkin) ellerine uygulanır. Test ürününün temas süresi 30–60 saniyedir. Standart sıvı sabun ile referans prosedür 60 saniye sürer. Hijyenik el yıkamaya yönelik test ürünüyle elde edilen test organizmasının canlı hücre sayısındaki azalmanın ortalama değeri, antibakteriyel maddeler eklenmeden sıradan sıvı sabunla uygulanan el yıkama ile karşılaştırıldığında, daha yüksek olmalıdır⁽⁵¹⁾.

Sporisidal aktivitenin belirlenmesi

Bakterilerin vejetatif formları biyositlere karşı bakteri sporlarından çok daha duyarlıdır. Bu sorunu ele almak için CEN tıbbi alanda sporisidal aktivitenin test edilmesi için EN 17126:2018 adlı özel bir standart geliştirmiştir⁽⁵²⁾. Başka bir standart olan EN 13704, biyositlerin sporisidal aktivitesini değerlendirmek için kullanılmıştır. Ancak EN 13704 sadece gıda, endüstri, evsel ve kurumsal alanlarda kullanılan biyositler için geçerli olup, tıbbi alan için geçerli değildir⁽⁴¹⁾. Ürünlerin yüzey, alet ve tekstil dezenfeksiyonu için sporisidal aktivitesi *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* CIP 105151 ve *Clostridium difficile* R027 NCTC 13366 suşları kullanılarak EN 17126'ya göre değerlendirilir. Temiz ve/veya kirli koşullar kullanılır. Test süresi farklıdır: Yüzey dezenfeksiyonunda, insanlarla temas etmesi muhtemel veya sık dokunulan yüzeylere uygulanan ürünler için 15 dakikayı, diğer yüzeylere yönelik ürünler için ise 60 dakikayı geçmemelidir. Üreticilerin tavsiyelerine göre test sıcaklığı yüzey dezenfeksiyonu için 4 ila 30°C, alet dezenfeksiyonu için 20 ila 70°C ve tekstil dezenfeksiyonu için 20 ila 80°C arasında olmalıdır. Sporisit ile sporistatik etkileri birbirinden ayıran nötralizasyon süresi genellikle 5 dakikadır. Üreticinin tavsiye ettiği konsantrasyonlarda ve temas sürelerinde ürün spor sayısında en az 4 log₁₀ azalma göstermelidir⁽⁵²⁾.

Mikobakterisidal ve/veya tüberkülosidal aktivitenin belirlenmesi

CEN tarafından tıbbi aletler için kullanılan biyositlerin mikobakterisidal ve tüberkülosidal aktivitesini belirlemek için bir kantitatif süspansiyon testi ve bir kantitatif taşıyıcı testi geliştirilmiştir. Testte *Mycobacterium avium* ATCC 15769 ve *Mycobacterium terrae* ATCC 15755 kullanılır. Hem mikobakterisit hem de tüberkülosidal aktivite için temiz koşul (BSA: sığır serum albümin 0.3 g/L) ve/veya kirli koşul (BSA 3 g/L ve 3 mL/L koyun eritrositleri) kullanılabilir⁽¹⁶⁾.

EN 14348:2005, kullanıcıların kimyasal bir dezenfektanın mikobakterisidal etkiye sahip olup olmadığını belirlemelerine olanak tanıyan kantitatif bir süspansiyon testidir. Ürün, 20°C'de (10°C'lik ek sıcaklıklar mümkündür) 60 dakikalık bir temas süresinden sonra (5, 15 ve 30 dakikalık ek süreler

mümkündür) mikobakteri sayısını en az 4 log₁₀ azaltıyorsa, EN 14348 gerekliliklerini karşıladığı varsayılır⁽⁵³⁾.

EN 14563:2008, aletler için kullanılan kimyasal dezenfektanların mikobakterisidal veya tüberkülosidal aktivitesini değerlendirmek için kantitatif bir taşıyıcı testtir. Test, mikobakteriyel hücreler için taşıyıcı olarak kullanılan buzlu cam plakalar üzerinde gerçekleştirilir. Ürün, 20°C'de 60 dakikalık bir temas süresinden sonra başlangıçtaki mikobakteri sayısını en az 4 log₁₀ azaltıyorsa EN 14563 gerekliliklerini karşıladığı varsayılır⁽⁵⁴⁾.

Fungisidal ve/veya mayasidal aktivitenin belirlenmesi

Fungisidal aktivite, ürünün vejetatif maya veya maya benzeri hücrelerinin ve küf sporlarının sayısını azaltma yeteneği olarak tanımlanır. Mayasidal aktivitenin daha dar bir tanımı vardır; ürünün maya veya maya benzeri mantarların canlı hücre sayısını azaltma yeteneğidir. Fungisidal aktiviteyi belirlemek için kullanılan zorunlu test organizmaları *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16888 suşlarıdır. Maya benzeri mantarlara karşı biyosidal aktiviteyi değerlendirmek için sadece *C. albicans* ATCC 10231 kullanılır. Suşların çoğaltılması ve canlı mantar sayımı için besiyeri olarak Malt Ekstrakt Agar (MEA) kullanılır⁽⁵⁵⁾.

Kantitatif bir süspansiyon testi olan EN 13624:2013, fungisidal veya mayasidal aktiviteyi değerlendirmek için geliştirilmiştir. Ürünün, mikroorganizma sayısını en az 4 log₁₀ azaltması halinde standardın gerekliliklerini karşıladığı varsayılır. Ancak hijyenik el yıkama ürünleri için 2 log₁₀ azalma yeterlidir. Temas süreleri, hijyenik el dezenfeksiyon ürünleri için 30–60 saniye, cerrahi el dezenfeksiyon ürünleri için 1–5 dakika, tıbbi cihaz dezenfeksiyon ürünleri için 60 dakikaya kadar ve yüzey dezenfeksiyon ürünleri için 5–60 dakika olarak önerilmektedir. Test sıcaklığı el dezenfeksiyon ürünleri için 20°C, alet dezenfeksiyonunda kullanılan ürünler için 20–70°C ve yüzey dezenfeksiyon ürünleri için 4–30°C'dir. Test, temiz (BSA 0.3 g/L) ve/veya kirli koşullarda (BSA 3 g/L ve 3 mL/L koyun eritrositleri) uygulanır⁽⁵⁵⁾.

EN 14562:2006, alet dezenfeksiyonu için fungisidal veya mayasidal aktivitenin değerlendirilmesine yönelik kantitatif bir taşıyıcı testtir. Test, mantar hücreleri için taşıyıcı olarak kullanılan buzlu cam plakalar üzerinde gerçekleştirilir. Standart test parametreleri için gereklilikler, aletler için özel süspansiyon standardında belirtilenlere benzerdir. 60 dakikalık bir temas süresi, ayrıca 5, 15 ve 30 dakikalık ek süreler de mevcuttur. Test için zorunlu sıcaklık 20°C'dir ve ek sıcaklıklar (10°C'lik adımlarla 60°C'ye kadar) kullanılabilir. Bu testin tamamlanması için gerekenler de süspansiyon testine benzer olup mantar hücresi sayısında 4 log₁₀ azalma saptandığında standart testin gerekliliklerini karşıladığını varsayılır⁽⁵⁶⁾.

Virüsidal aktivitenin belirlenmesi

COVID-19 salgını ile birlikte virüsidal aktiviteye sahip dezenfeksiyon preparatlarına ilgi ve talepte belirgin bir artış olmuştur. Virüsidal aktivitenin belirlenmesine yönelik mevcut standart testler için zarfsız RNA virüsleri, yani poliovirüs tip 1, picornavirüs grubundan LSc 2ab ve MNV suşu S99 Berlin ve zarfsız DNA virüsleri, yani adenovirüs tip 5 (Adenoid 75 suşu, ATCC VR-5) ve çok küçük murin parvovirüs (Crawford suşu, ATCC VR-1346) gibi referans test suşlarının kullanımı tavsiye edilmektedir. Ayrıca Zarflı DNA virüsleri - modifiye vaccinia virüsü Ankara (MVA) ATCC VR-1508 suşu veya vaccinia virüsü Elstree suşu - standart suşlar olarak da dahil edilmiştir⁽¹⁶⁾.

EN 14476:2013 + A2:2019, virüsidal aktivitenin değerlendirilmesi için kantitatif bir süspansiyon testidir ve yakın zamanda güncellenmiştir. Bu standart, tıbbi alanda hijyenik el yıkama ve tıbbi cihazların, yüzeylerin ve tekstilin dezenfeksiyonu için çok çeşitli biyositlerin virüsidal aktivitelerinin test yöntemini içermektedir. Standartta göre 20°C'de 30–120 saniyeyle test edilen hijyenik el dezenfeksiyon ürünlerinin; 20–70°C'de 60 dakikaya kadar test edilen alet dezenfeksiyon ürünlerinin; 4–30°C'de 5 veya 60 dakika süreyle test edilen yüzey dezenfeksiyon ürünlerinin; ve 30–70°C'de 20 dakikaya kadar test edilen tekstil dezenfeksiyon ürünlerinin viral yükü en az 4 log₁₀ azaltması durumunda virüsidal etkiye sahip oldukları gösterilir. Test, temiz (BSA 0,3 g/L) ve/veya kirli koşullarda (BSA 3 g/L ve 3 mL/L koyun

eritrositleri) uygulanır. Besiyeri olarak doku kültürleri, embriyolu yumurta ve deney hayvanları kullanılır⁽⁵⁷⁾.

Genel virüsidal aktiviteyi belirlemek için EN 16777:2018 ve EN 17111:2018 olmak üzere iki taşıyıcı yöntem oluşturulmuştur^(58,59). EN 16777:2018 standartta virüs taşıyıcı olarak paslanmaz çelik diskler kullanılırken EN 17111:2018'de klasik buzlu cam plakalar kullanılmaktadır. Zarflı virüslere karşı virüsidal aktiviteyi belirlemek için ürünün MVA veya Vaccinia virüsü Elstree suşu ile EN 14476 ve EN 16777 gereksinimlerinin karşılaması gerekir. Bir biyosidal ürünün sınırlı virüsidal aktiviteye sahip olduğunu doğrulamak için hem zarfsız RNA MNV suşu S99 Berlin hem de zarfsız DNA virüsü adenovirüs tip 5 Adenoid 75 suşu ile EN 14476 ve EN 16777'yi karşılaması gerekir⁽⁵⁸⁾. Bir biyosidal ürünün virüsidal aktivitesini belirlemek için poliovirüs tip 1, MNV ve adenovirüs tip 5 ile EN 14476 kriterlerini ve MNV ve adenovirüs tip 5 ile EN 16777 kriterlerini karşılaması beklenmektedir. Test koşulları şu şekildedir: 18–25°C arasında zorunlu bir sıcaklık (4 ila 30°C arasında ek sıcaklık kullanılabilir) ve virüs türüne bağlı olarak 5 veya 60 dakikadan uzun olmamak üzere üreticinin tavsiyesine göre bir temas süresi olabilir. Standartta göre biyosidal ajan viral yükü en az 4 log₁₀ oranında azaltıyorsa virüsidal aktiviteye sahip olduğunu söyleyebilir⁽⁵⁸⁾.

2. Yönteme dayalı sınıflandırma

MİK belirlenmesi

MİK testi ile bazı mikroorganizmaların literatüre dayalı olarak biyositlere duyarlı olup olmadıkları kantitatif olarak belirlenebilir. Ancak, elde edilen MİK sonuçlarına bakılarak biyositin pratikte kullanılıp kullanılamayacağına karar verilemez. MİK testinin yapılmasında birçok sınırlamalar vardır. Bu testler tam olarak standardize edilememiştir. Ayrıca birçok teknik faktör işlemi etkileyebilir ve rutin olarak kullanılamamaktadır⁽⁴⁷⁾.

Disk Difüzyon Yöntemi

Disk-difüzyon yöntemi, farklı kimyasalların steril filtre kağıdı disklerine emdirilmesini içerir. Diskler daha sonra test mikroorganizma ile ekimi yapılmış

bir agar plağı üzerine yerleştirilir. Test edilen mikroorganizmaların gereksinimlerine bağlı olarak belirli bir süre boyunca gerekli sıcaklıkta inkübe edilir (örneğin *E. coli* için 24 saat boyunca 37°C'de). İnkübasyondan sonra mikroorganizma üredikçe disklerin etrafında mikrobiyal üremenin engellendiği bölgeler (inhibisyon zonları) boş alanlar olarak gözlenir. Diskin etrafındaki inhibisyon zonların çapı milimetre cinsinden ölçülür⁽⁶⁰⁾. Biyositlerin etkinliğinin bu şekilde ölçüldüğü yayınlar bulunmakla birlikte, bu testlere bakarak biyositin pratikte kullanılıp kullanılamayacağına karar verilemez.

Süspansiyon Testleri

Süspansiyon testleri en basit ve en çok kullanılan BET'nden biridir. Farklı türde süspansiyon testleri vardır: Kalitatif süspansiyon testleri, fenol katsayısının belirlenmesine yönelik test ve kantitatif süspansiyon testleri. Avrupa standardında iki temel süspansiyon testi bulunmaktadır: EN 1040:2005 (Kimyasal dezenfektan ve antiseptiklerin temel bakterisidal aktivitesinin değerlendirilmesi için kantitatif süspansiyon testi) ve EN 1275:2005 (Kimyasal dezenfektan ve antiseptiklerin temel fungisidal veya temel mayasidal aktivitesinin değerlendirilmesi için kantitatif süspansiyon testi)^(61,62). Bu yöntemler ilgili biyositin dilüsyonlarına bir test mikroorganizmasının süspansiyonunun (inokulum) eklenmesini içerir. Belirli bir temas süresinden sonra test süspansiyonundaki mikroorganizmaları öldürülüp öldürülmediğini belirlemek için besiyerilere pasajlanarak canlı kalan mikroorganizma sayısı belirlenir. Biyositin germisidal etkisi, temas süresinden sonra kaydedilen organizma sayısının test (kontrol) süspansiyondaki sayısı ile karşılaştırılarak belirlenir. Elde edilen değerler logaritmik olarak ifade edilmektedir (biyosit ile temas süresi sonundaki log değerini test süspansiyondaki log değerinden çıkararak). Böylece log redüksiyonu veya mikrobisidal etki (ME) elde edilmektedir. 1'lik bir ME değeri, test süspansiyondaki mikroorganizma sayısının %90'ının öldürülmesine eşittir, 2'lik bir ME ise %99'unun öldürüldüğü anlamına gelir. Bir biyosit için ME değeri ≥5 olarak belirlendiğinde, (genellikle kabul edilen bir gereklilik) mikroorganizmaların en az %99.999'na germisidal etki gösterdiği anlamına gelir. Bu testler genellikle iyi standardize edilmiş olsa da yaklaşımları pratik değildir⁽⁶³⁾.

Süspansiyon testleri içinde temas süresi, ısı, mikroorganizma türü ve engelleyici maddeler gibi birden fazla değişken incelenebilir. Ayrıca organik maddeler (sabun ve suyun sertliği gibi) potansiyel inhibitör maddelerin deneye etkisi de ortaya çıkarılabilmektedir. Kantitatif süspansiyon testleri günümüzde yapılan BET şemaları içinde yer alan temel testlerdir. Bu testler genellikle iyi standardize edildikleri için laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilmektedir⁽⁴⁷⁾.

Süspansiyon testleri biyositlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu gösterir ama pratik alanda aktivitesini tam olarak yansıtmaz. Ancak bu testlerden elde edilen sonuçlar bir rehber görevi görür ve sahadaki uygulama çalışmalarıyla konfirme edilmelidir. Bunun için kapasite testleri ve uygulama testleri geliştirilmiştir^(63,64).

Kalitatif süspansiyon testi

Bu yöntemde bir öze dolusu bakteri veya mantar süspansiyonu hazırladıktan sonra test biyosit ile temas ettirilir. Temas süresi dolduktan sonra karışımdan bir miktar alınır ve canlı kalan organizmaları saptamak için kültürleri yapılır. Sonuçlar 'üreme var' (pozitif) veya 'üreme yok' (negatif) şeklinde ifade edilir⁽⁶³⁾.

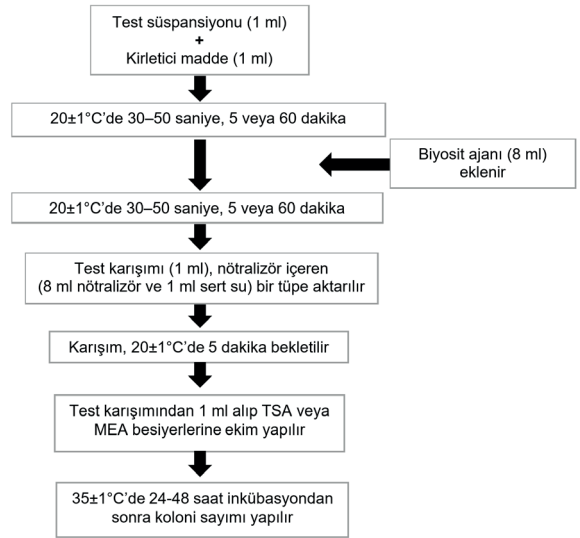
Fenol katsayısı testi

Fenol katsayısı testi biyositlere duyarlılığı ölçen kalitatif bir süspansiyon yöntemidir. Bu yöntemde, belirli bir zaman aralığında test edilen biyositin dilüsyon derecesinin fenolün dilüsyon derecesine bölünmesiyle bir sayı elde edilir. Eğer sayı 1'den büyükse verilen dilüsyon için test edilen biyositin fenolden daha güçlü ME'ye sahip olduğu gösterilmiş olur. Elde edilen sayı 1'den küçükse verilen dilüsyon için fenolün mikroorganizmaları kontrol etmede daha iyi olduğu anlamına gelir^(63,64).

Kantitatif süspansiyon testi

Kantitatif süspansiyon testleri biyositlerin etkinliğinin değerlendirilmesinde standart testlerden biridir. Kantitatif süspansiyon test yönteminde, 1 ml dilüent (1.0 gr tripton + 8.5 gr NaCl, 1 L dH₂O'da çözülüp otoklavlanarak hazırlanır) kullanılarak

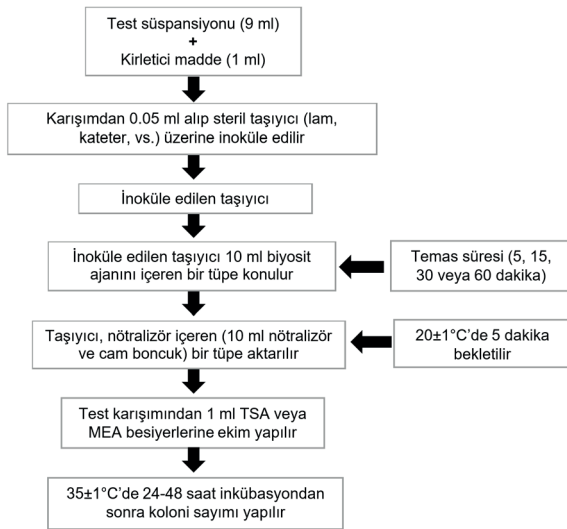
mikroorganizma test süspansiyonu hazırlanır ve 1 ml kirletici madde (Temiz koşullar için 0.3 gr sıgır albümini 100 ml dilüent içerisinde çözülerek hazırlanır ve filtrasyonu ile sterilize edilir) ile karıştırıldıktan biyosit ile karşılaştırılır. Belirli temas süresi (5 dakika veya 60 dakika) sonunda bu karışımdan 1 ml alınır ve ürünün biyosidal etkisini durdurmak için 8 ml nötralizör (30.0 gr Tween 80, 30.0 gr saponin, 1.0 gr L- histidin, 3.0 gr lesitin, 5.0 gr Na₂S₂O₃, 1 L dilüent içerisinde hazırlanır) ve 1 ml sert su (17.5 mL CaCl₂ + 5 mL MgSO₄, 3300 mL dH₂O'da çözülüp otoklavlanarak hazırlanır) içeren bir tüpe konulur ve 5 dakika bekletilir. Nötralizasyon işleminden sonra canlı kalan mikroorganizmalar kültür (bakteriler için TSA agar, mantarlar için MEA agar kullanılır) ya da membran filtre tekniğiyle sayılmaktadır. Örnekte canlı kalan organizma sayısı belirlenerek logaritmik azalma hesaplanır. Üreyen koloni sayısı (B) test süspansiyondaki (A) organizma sayısı ile karşılaştırılır. ME değeri, onluk azalma oranları halinde ME= Log A-Log B formülüne göre hesaplanır^(47,64).



Şekil 1. Kantitatif süspansiyon testi prosedürünün şeması

Taşıyıcı testler

Bu testler Robert Koch tarafından tanımlanan en eski testlerdir. Bu testlerde, küçük, silindirik, paslanmaz çelik, kateter, lam, ipek veya katgüt ipliği gibi taşıyıcı bir madde, bir mikroorganizmanın 48 saatlik sıvı kültürüne daldırılarak kontamine edilir.



Şekil 2. Kantitatif taşıyıcı testi prosedürünün şeması

Taşıyıcı daha sonra kurutulur ve biyosit ile belirli bir süre temas ettirilir. Taşıyıcı, temas süresi sonunda sıvı besiyerlerine (nutrient broth gibi) konulur. İnkübasyondan sonra besiyerinde üreme olmaması test edilen biyositin etkili olduğunu, üremenin olması ise etkisiz olduğunu gösterir. Biyositin test konsantrasyonu ile temas süreleri çarpılarak biyositin potansiyel aktif konsantrasyon-zaman ilişkisi elde edilir. Taşıyıcı testlerin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Bir taşıyıcı üzerinde kurutulmuş organizma sayısının standardize edilmesi zordur ve kurutma sırasında taşıyıcı üzerindeki organizmanın canlı kalması sabit değildir^(63,65).

Kapasite testi

Kapasite testinde, kirli bir alet biyosit içeren bir kaba yerleştirildiğinde veya bir paspas biyosit çözeltisi içeren bir kovaya batırıldığında, biyosit çözeltisi belirli miktarda kir ve mikroorganizma ile kontamine olur. Artan yük altında aktiviteyi sürdürebilme yeteneği biyositin kapasitesini gösterir. Kapasite testleri, temizlik ve alet dezenfeksiyonunun pratik durumlarını simüle eder. En iyi bilinen kapasite testi Kelsey-Sykes testidir⁽⁶⁴⁾.

Kelsey-Sykes testi, temiz ve kirli koşullarda etkili olacak biyosit konsantrasyonlarını belirlemek için tasarlanmış üçlü bir testtir. Biyosit, test süresince mikroorganizma süspansiyonunun üç kez üst üste eklenmesiyle test edilir. Testin uygulanması

30 dakikadan fazla sürmektedir. Biyositin konsantrasyonu organik madde (otoklavlanmış maya hücreleri) eklenerek yarı yarıya azaltılır ve son konsantrasyon %0.5'e ayarlanır. Biyosidal ürünün türüne göre test mikroorganizmaları olarak bakteri veya mantar suşları seçilir. Yöntem temiz veya kirli koşullar altında gerçekleştirilebilir. Biyosit dilüsyonları temiz koşullar için sert suda ve kirli koşullar için maya süspansiyonunda yapılır. Test organizması tek başına veya maya ile birlikte 0, 10 ve 20 dakika aralıklarla eklenir. Biyosit ve test organizmasının temas süresi 8 dakikadır. Biyosit, mikroorganizmaları öldürme yeteneği veya eksikliği açısından değerlendirilir ve sonuç bir katsayı olarak değil başarılı veya başarısız olarak bildirilir. Kelsey ve Sykes'ın kapasite testi, kullanılacak ajanın dilüsyonu için rehberlik eder. Bu testin dezavantajı karmaşık olmasıdır^(63,66).

Pratik testler

Biyosidal maddenin zaman-konsantrasyon ilişkisinin kantitatif süspansiyon testinde ölçülmesinin ardından gerçek yaşam koşullarında pratik testler gerçekleştirilir. Amaç, önerilen kullanım dilüsyonunun kullanılacağı koşullar altında hala yeterli olup olmadığını doğrulamaktır. Pratik testlerin avantajı, deneylerin yine laboratuvarında yapılması ve saha testlerine göre daha iyi standardize edilmesidir. En iyi bilinen pratik testler yüzey dezenfeksiyon testleridir. Yüzey testleri, seçilen biyositin yüzeye yapışan mikroorganizmalara karşı etkinliğini değerlendirir. Test yüzeyi (lam, PVC parçası, paslanmaz çelikten bir disk vb.), seçilen mikroorganizmanın inokülumu (Test inokülumu spektrofotometrik olarak da ayarlanabilir) ile kontamine edilir ve kurutulur (60-120 dakika boyunca oda sıcaklığında veya 37°C'de). Daha sonra biyosit çözeltisinin belirli bir miktarı (100 µL veya 1 mL olabilir) taşıyıcı üzerine dağıtılır. Yeterli temas süresinden sonra (1, 2, 5, 15, 30, 60 dakika) canlı kalan hücre sayısı bir temas plakası üzerindeki baskı veya durulama tekniği ile belirlenir. Temas süresi sonunda taşıyıcı, steril bir forsepsle alınarak bir tüpe aktarılır ve biyositin etkisinin durdurulması için üzerine 9.95 mL nötralizatör eklenir. Koloni sayısının belirlenmesi için yıkama sıvısından veya aletlerin bulunduğu kaptan seri dilüsyonlar yapılarak uygun besiyerlerine pasajlanır ve 36±1°C'de 24-48 saat inkübe edilir. Böylece mL'deki koloni oluşturan birim sayısı belirlenir. Canlı kalan bakteri sayısının

logaritması, başlangıç test inokulumundaki sayının logaritmasından çıkarılarak logaritmik azalma hesaplanır ve böylece biyositin etkili olup olmadığı belirlenir^(63, 64).

In-Use Testi

1985'de Maurer biyositlerin kontaminasyonunu test etmek için hastanelerde ve laboratuvarlarda kullanımı basit bir test tanımlanmıştır. 1 ml biyosit aynı zamanda nötralizör içeren 9 ml seyrelticiye eklenir. Dilüe edilmiş örnekten on damla iki ayrı katı besiyerine ekilir. Biri üç gün boyunca 37°C'de diğeri ise yedi gün boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Her iki plakta beş veya daha fazla koloni saptanması kontaminasyonu gösterir. Bu testler çok yararlı olmalarına karşın rutinde kullanılmamaktadır⁽⁶⁷⁾.

BET'nin Geleceği ve Yenilikçi Yaklaşımlar

BET'nin geleceği daha etkili, ekonomik ve çevre dostu alternatif yöntemlerin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Geleneksel testlerin yanı sıra yeni biyosit formülasyonlarının ve ürünlerinin etkinliğini belirlemek için daha hızlı, tekrarlanabilir ve doğruluk düzeyi yüksek alternatif test yöntemleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca, biyosit endüstrisinin çevresel etkilerini ve ekosistemleri daha iyi anlamak için yenilikçi yaklaşımların benimsenmesi önemli bir gelişme olacaktır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

BET ilaç geliştirme, tarım ve gıda güvenliği, çevre ve ekoloji alanlarında katkı sağlamaktadır. Bu testlerin sonuçları ürünlerin güvenilirliği ve etkinliği hakkında önemli bilgiler sunar. Özellikle sağlık sektörü ile gıda ve tarım sektöründe sıklıkla kullanılan bu testlerin kullanım alanları her geçen gün genişlemekte ve teknolojik gelişmeler ile birlikte daha etkin bir hal almaktadır. Bu durum, BET'nin gelecekte daha da önemli olacağını göstermektedir. Hızlı sonuç alma imkanı sayesinde gerek tıbbi gerekse tarımsal alanda faaliyet gösteren uzmanlar, zaman kaybetmeden doğru kararlar alabilir ve müdahalede bulunabilirler. Bu da hastaların ve potansiyel zararlı organizmaların kontrol altına alınması için büyük bir adım olacaktır.

BET üzerinde yapılan araştırmalar ve geliştirme çalışmaları da önemli bir yer tutmaktadır. Bu alanda yapılan her yeni çalışma, testlerin doğruluğunu ve uygulanabilirliğini artırmak adına büyük bir fırsat sunmaktadır. Dolayısıyla BET'nin önemi anlaşıldıkça, bu alanda yapılan araştırma ve geliştirme faaliyetlerine olan talep de artmaktadır.

Sonuç olarak, BET için kullanılan teknolojilerin geliştirilmesinde sürekli bir ilerleme yaşandığı anlaşılmaktadır. Özellikle nanoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde BET'nin daha hassas ve güvenilir sonuçlar üreteceği düşünülmektedir. Örneğin nano-biyositlerin test edilmesi için kullanılacak yeni yöntemlere odaklanan çalışmalar yapılmalı ve etkinlikler düzenlenmelidir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Tavares M, Kozak M, Balola A, Sá-Correia I. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: a feared contamination risk in water-based pharmaceutical products. Clin Microbiol Rev. 2020;33(3):e00139-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.20.00139-19>
2. Maillard JY. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: Efficacy, usage, policies, and perceived problems. Ther Clin Risk Manag. 2005;1(4):307-20.
3. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):147-79. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
4. Kampf G. Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in gram-negative species. Antibiotics (Basel). 2018;7(4):110. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040110>
5. Liu Y, Li T, Deng Y, et al. Stability of SARS-CoV-2 on environmental surfaces and in human excreta. J Hosp Infect. 2021;107:105-7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.10.021>

6. Eggers M, Schwebke I, Suchomel M, et al. The European tiered approach for virucidal efficacy testing – rationale for rapidly selecting disinfectants against emerging and re-emerging viral diseases. *Euro Surveill.* 2021;26(3):2000708.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.3.2000708>
7. Bolten A, Schmidt V, Steinhauer K. Use of the European standardization framework established by CEN/TC 216 for effective disinfection strategies in human medicine, veterinary medicine, food hygiene, industry, and domestic and institutional use – a review. *GMS Hyg Infect Control.* 2022;17:Doc14.
<https://doi.org/10.3205/dgkh000417>
8. Wales AD, Gosling RJ, Bare HL, Davies RH. Disinfectant testing for veterinary and agricultural applications: A review. *Zoonoses Public Health.* 2021;68(5):361-75.
<https://doi.org/10.1111/zph.12830>
9. Gnanadhas DP, Marathe S, Chakravorty D. Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013;22(2):191-206.
<https://doi.org/10.1517/13543784.2013.748035>
10. Fox LJ, Kelly PP, Humphreys GJ, Waigh TA, Lu JR, McBain AJ. Assessing the risk of resistance to cationic biocides incorporating realism-based and biophysical approaches. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2022;49:kuab074.
<https://doi.org/10.1093/jimb/kuab074>
11. Butucel E, Balta I, Ahmadi M, et al. Biocides as biomedicines against foodborne pathogenic bacteria. *Biomedicines.* 2022;10(2):379.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10020379>
12. Alajlan AA, Mukhtar LE, Almussallam AS, et al. Assessment of disinfectant efficacy in reducing microbial growth. *PLoS One.* 2022;17(6):e0269850.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269850>
13. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and sodium hypochlorite in root canal disinfection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Endod.* 2020; 46(8):1032-41.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.05.002>
14. Singh AK, Kumar A, Chandra R. Environmental pollutants of paper industry wastewater and their toxic effects on human health and ecosystem. *Bioresour Technol Rep.* 2022;20:10125.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101250>
15. Jones IA, Joshi LT. Biocide use in the antimicrobial era: A review. *Molecules.* 2021;26(8):2276.
<https://doi.org/10.3390/molecules26082276>
16. Tyski S, Bocian E, Laudy AE. Application of normative documents for determination of biocidal activity of disinfectants and antiseptics dedicated to the medical area: A narrative review. *J Hosp Infect.* 2022;125:75-91.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.03.016>
17. Bloomfiel SF, Arthur M, Looney E, Begun K, Patel H. Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Lett Appl Microbiol.* 1991;13(5):233-37.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00617.x>
18. Griffith C. Surface sampling and the detection of contamination. In: Lelieveld H, Holah J, Gabrić D, editors. *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (2nd ed.). United Kingdom: Elsevier; 2016:673-96.
19. Bessems E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *Int Biodeterior Biodegradation.* 1998;41(3-4):177-83.
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00022-5)
20. Sandle T. A global disinfectant standard for cleanrooms: presenting a harmonised approach. *Eur J Parenter Pharm Sci.* 2021;261.
<https://doi.org/10.37521/ejpps26101>
21. PIC/S Validation of aseptic processing. Geneva: Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. 2011. [<https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/pic-s-validation-of-aseptic-processing-pi-007-6-2011>] (Erişim tarihi: 01.Ağustos.2024).
22. U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice. Center for Biologics Evaluation and Research. U.S. Department of Health and Human Services: Rockville, MD; 2004.
23. European Commission. Second targeted stakeholders' consultation on the revision of Annex 1, on manufacturing of sterile medicinal products, of EudraLex volume 4. Belgium: Health and Food Safety; 2020. [https://health.ec.europa.eu/consultations/second-targeted-stakeholders-consultation-revision-annex-1-manufacturing-sterile-medicinal-products_en] (Erişim tarihi: 01.Ağustos.2024).
24. Elbehiry A, Abalkhail A, Marzouk E, et al. An overview of the public health challenges in diagnosing and controlling human foodborne pathogens. *Vaccines (Basel).* 2023;11(4):725.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11040725>
25. Tudi M, Ruan HD, Wang L, et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(3):1112.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>

26. Fidanza MR, Caneva G. Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: a review. *J Cult Herit*. 2019;38:271-86. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.01.005>
27. Siddiqua A, Hahladakis JN, Al-Attia WAKA. An overview of the environmental pollution and health effects associated with waste landfilling and open dumping. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(39):58514-36. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21578-z>
28. Tamer S, Demiröz FT, Acartürk F. Evaluation of biocidal products in COVID-19 pandemic. *Gazi Med J*. 2020;31(3):485-97. <http://doi.org/10.12996/gmj.2020.118>
29. İslamoğlu A. Belediyelerde biyosidal uygulamalarına katılan çalışanların iş sağlığı ve güvenliği açısından bilinç düzeyinin araştırılması ve risk değerlendirmesi: Mersin örneği [Yüksek Lisans tezi]. Mersin: Tarsus Üniversitesi; 2021.
30. Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):794-803. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00833-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00833-8)
31. Parker A, Hamilton M A, Goeres DM. Reproducibility of antimicrobial test methods. *Sci Rep*. 2018;8(1):12531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30282-3>
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Factors Affecting the efficacy of disinfection and sterilization. United States: CDC; 2023. [<https://www.cdc.gov/infection-control/hcp/disinfection-sterilization/efficacy-factors.html>] (Erişim tarihi: 01.Ağustos.2024).
33. The European Chemicals Agency (ECHA). Guidance on the biocidal products regulation: volume II efficacy - assessment and evaluation. Finland: The European Chemicals Agency; 2023. [https://echa.europa.eu/documents/10162/2324906/bpr_guidance_assessment_evaluation_part_vol_ii_part_bc_en.pdf] (Erişim tarihi: 01.Ağustos.2024).
34. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter (1072) Disinfectants and antiseptics. In USP 43-NF 38. USP, Rockville: USA; 2020.
35. Türk Standardları Enstitüsü (TSE). Dezenfektan ve antiseptikler. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. [<https://www.tse.org.tr/>] (Erişim tarihi: 01.Ağustos.2024).
36. ASTM International. ASTM E2197-17 Standard quantitative disk carrier test method for determining bactericidal, virucidal, fungicidal, mycobactericidal, and sporicidal activities of chemicals. ASTM: West Conshohocken, PA, USA; 2018.
37. ASTM International. ASTM E2614-15 Standard guide for evaluation of cleanroom disinfectants. ASTM: West Conshohocken, PA, 2018.
38. EN 1276. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1), European Commission, Brussels, Belgium; 2019.
39. EN 1650. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1), European Commission, Brussels, Belgium; 2019.
40. EN 13697:2015+A1:2019. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas e test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2019.
41. EN 13704. Chemical disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1), European Commission, Brussels, Belgium; 2018.
42. EN 16615. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative test method for the evaluation of bactericidal and yeasticidal activity on non-porous surfaces with mechanical action employing wipes in the medical area (4- field test). Test method and requirements (phase 2, step 2), European Commission, Brussels, Belgium; 2015.
43. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Ürün tipi-1 ve ürün tipi-19 biyosidal ürün analizleri hakkında talimat. 2021.
44. Neuhaus S, Feßler AT, Dieckmann R, et al. Towards a harmonized terminology: A glossary for biocide susceptibility testing. *Pathogens*. 2022;11(12):1455. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121455>
45. Wu G, Yang Q, Long M, et al. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015;68(11):661-5. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.51>
46. Song X, Vossebein L, Zille A. Efficacy of disinfectant-impregnated wipes used for surface disinfection in hospitals: a review. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:139. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0595-2>

47. Çağlar K. Dezenfektanların etkinliğini ölçen testlerin birbirlerine avantajları ve dezavantajları. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 02-04 Ekim 2003, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun; 2003: 334-43.
48. EN 13727+A2. Chemical disinfectants and antiseptics e quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area e Test method and requirements (phase 2, step 1). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2015.
49. World Health Organization (WHO). Guidelines on hand hygiene in health care. Geneva: WHO; 2009. [<https://www.who.int/publications/i/item/9789241597906>] (Erişim tarihi: 01.Ağustos.2024).
50. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002;23(12 Suppl):S3-40. <https://doi.org/10.1086/503164>
51. EN 1499. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic handwash. Test method and requirements (phase 2/step 2). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2013.
52. EN 17126. Chemical disinfectants and antiseptics e quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants in the medical area e Test method and requirements (phase 2, step 1). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2018.
53. EN 14348. Chemical disinfectants and antiseptics e quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the medical area including instrument disinfectants e Test methods and requirements (phase 2, step 1). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2005.
54. EN 14563. Chemical disinfectants and antiseptics e quantitative carrier test for the evaluation of mycobactericidal or tuberculocidal activity of chemical disinfectants used for instruments in the medical area e Test method and requirements (phase 2, step 2). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2008.
55. EN 13624. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 1). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2013.
56. EN 14562. Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative carrier test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity for instruments used in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 2). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2006.
57. EN 14476:2013+A2:2019. Chemical disinfectants and antiseptics - quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2019.
58. EN 16777. Chemical disinfectants and antiseptics e quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area e Test method and requirements (phase 2/step 2). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2018.
59. EN 17111. Chemical disinfectants and antiseptics e quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical area e Test method and requirements (phase 2, step 2). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2018.
60. Cunliffe AJ, Askew PD, Stephan I, et al. How do we determine the efficacy of an antibacterial surface? A review of standardised antibacterial material testing methods. *Antibiotics* (Basel). 2021;10(9):1069. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091069>
61. EN 1040. Chemical disinfectants and antiseptics e quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics e Test method and requirements (phase 1). Brussels, Belgium: CEN-CENELEC Management Centre; 2005.
62. Tyski S, Bocian E, Mikucka A, Grzybowska W. Antibacterial activity of selected commercial products for mouth rinsing and disinfection, assessed in accordance with PN-EN 1040. *Med Sci Monit*. 2013;19:458-66. <https://doi.org/10.12659/MSM.883952>
63. Reybrouck G. The testing of disinfectants. *Int Biodeterior Biodegrad*. 1998;41(3-4):269-72. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00024-9)
64. Abbasoğlu U. Dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine etkinliğini ölçen testler. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003:326-33.
65. Hamilton MA, DeVries TA. Quantitative analysis of a presence/absence microbiological assay: The hard surface carrier test of disinfectant efficacy. *Biometrics*. 1996;52(3):1112-20.
66. Singh H, Singh P, Sharma A. To check efficacy of different disinfectants by Kelsey Sykes method. *BIO Web of Conferences*. 2024;86(8):01052. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20248601052>
67. The LibreTexts Libraries. Testing the effectiveness of antiseptics and disinfectants. 2024. [<http://www.open.oregonstate.education/microbiology/chapter/13-2testing-the-effectiveness-of-antiseptics-and-disinfectants/>] (Erişim tarihi: 31.Temmuz.2024).