



T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Gıda Güvenliği Enstitüsü

Sayı: 56053427-207  
Konu: 2019/0001 No'lu Proje Hk.

17/12/2019

SANİDEZ İLAÇ SAN.TİC. LTD.ŞTİ 'NE

**İLGİ:** Sanidez İlaç San.Tic. Ltd.Şti 'nin 23/08/2019 tarihli yazısı.

İlgi yazınızla istenen N-Alkil Dimetil Benzil Amonyum %40 Aktif Madde İçeren "Pron-Up" ticari isimli dezenfektan Enstitümüz tarafından analiz edilmiş ve analiz bulguları yazı ekindeki raporda gösterilmiştir.

Bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

Ek: Proje No:2019/0001 Sonuç Raporu (12 syf.)

Prof. Dr. Nevzat ARTIK  
Enstitü Müdürü



**sanidez**  
Biyogüvenlikte Çözüm Ortağınız

## **PROJE SONUÇ RAPORU**

**AR-GE Yayın No: 2019/0001**

**Projeye Destek Veren Kuruluş/Firma**

*Ankara Üniversitesi Gıda Güvenliği Enstitüsü*

**Projeyi Teklif Eden Kuruluş veya Kişi**

***SANİDEZ***

*Sanidez İlaç LDT. ŞTİ*

**Proje Başlama- Bitiş tarihi**

**23.08.2019-16.12.2019**

**Yürütücü ve çalışma Ekibi**

*Prof. Dr. U. Tansel ŞİRELİ*

*Araş. Gör. Dr. Güzin İplikçioğlu*

*Dr. Öğr. Görkem Ozansoy*

*Prof. Dr. Nevzat Artık*

*Prof. Dr. Ayhan Filazi*

*Vet.Hek. Z. Nur KARAGÖZ*

**Projenin Nerede Yapıldığı**

**Ankara Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Enstitüsü**

**Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi**

**N-ALKİL DİMETİL BENZİL AMONYUM %40 AKTİF MADDE İÇEREN PRON-UP  
TİCARİ İSİMLİ DEZENFEKTANIN BAZI MİKROORGANİZMALARA KARŞI  
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**GİRİŞ**

N-alkil dimetil benzil amonyum klorür, geniş spektrumlu bir kuaterner amonyum bileşimidir. Kuaterner amonyum bileşikleri hücre zarlarını parçalayarak, deterjan görevi görür ve böylece kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak bakteriyositik etki gösterirler. Bu nedenle N-alkil dimetil benzil amonyum klorür, temizlik ve dezenfeksiyon ürünlerinde aktif bir bileşen olarak kullanılmaktadır.

Kuaterner amonyum bileşiklerinin önemli özelliklerinden biri organik madde varlığında bile etkilerini göstermeleridir. Ayrıca bu bileşenlerin spesifik olmayan etkisi, mikroorganizmalarda direnç gelişimini engellemektedir. Bunun yanı sıra, bu bileşikler genellikle aerobik koşullar altında biyolojik olarak parçalanabilmektedirler. Bu avantajları nedeniyle, kullanım açısından sıklıkla tercih edilirler.

**AMAÇ**

Bu çalışma, SANİDEZ firmasının talebi üzerine N-alkil dimetil benzil amonyum aktif maddesi içeren ticari bir dezenfektanın farklı konsantrasyonlarının, temiz ve kirli alanlarda ve farklı temas sürelerinde, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15440, *Enterococcus hirae* ATCC 8043 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 25923, ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7646 mikroorganizmaları üzerine etkinliğinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

**MATERYAL VE METOD**

Ticari olarak granüller formdaki preparattan, üretici önerisi doğrultusunda hazırlanan dezenfektanlar etkinlik testlerinde kullanılmıştır. Buna göre 3 farklı dozu belirlenen etken maddenin bazı mikroorganizmalar üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanmış 2 gr/1L, 1gr/1L ve 0,5 gr/1L dezenfektan solüsyonu sırasıyla 800 ppm, 400 ppm ve 200 ppm olarak belirlenen ticari dozları kullanılmıştır.

Mikroorganizmalara karşı bakterisidal etkisinin araştırılmasında kantitatif süspansiyon testi olarak bilinen **Avrupa Standardı EN13727:2013 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area** (Kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler - nicel süspansiyon deneyi - Tıbbi alanda



**bakteri öldürme etkinliğinin değerlendirilmesi için - Deney yöntemi ve gerekler)** göre uygulama gerçekleştirilmiştir. Ayrıca farklı temas (kontak) sürelerinin etkisinin belirlenmesi ise **German Society for Hygiene and Microbiology Guideline'** dan alınan tüpte etkinlik testi yöntemine göre yapılmıştır.

**Avrupa Standardı EN13727:2013 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area**

**I. Kantitatif Süspansiyon Testi (EN 13727:2013)**

**1. Standart suşlar**

Avrupa standardının önerdiği şekilde, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15440, *Enterococcus hirae* ATCC 8043 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 test suşu olarak kullanılmıştır. Standarda ek olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7646 üzerindeki bakterisidal etki de araştırılmıştır. Öncelikle kullanılacak suşlar Brain Heart Infusion Broth (BHI)'da canlandırılmış ve test bakterilerinin etkinlik gücü spesifik agarlar kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1. Kullanılan besi yerleri ve tespit edilen suş güçleri**

Standart suş	Besi yeri	Etkinlik gücü
<i>P. aeruginosa</i>	Cephaloridine fucidin ceftrimide (CFC ) agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>E. hirae</i>	Slanetz and Bartley (SB) agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>S. aureus</i>	Chromogenic <i>S. aureus</i> agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>E. coli</i>	Chromogenic ECC agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>S. Typhimurium</i>	Chromogenic <i>Salmonella</i> agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> ALOA agar	10 <sup>9</sup> kob/ml

Denemede tüm bakteriler test süspansiyonu ve validasyon süspansiyonu olmak üzere iki farklı şekilde hazırlanarak kullanılmıştır. Test süspansiyonu, yöntemde belirtildiği şekilde hazırlanan dilüent (sulandırıcı) kullanılarak 10<sup>8</sup> kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Validasyon süspansiyonu ise, test süspansiyonunun dilüentle 10<sup>3</sup> ile 10<sup>5</sup> oranında seyreltilmesi ile elde edilmiştir.



## 2. Kontrol deneyleri

Kontrol deneylerinde, dezenfektan dışındaki test koşullarının letal etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca kullanılan nötralizanın toksik etkisinin bulunmadığı ve dezenfektanı nötralize ettiği test edilmiştir. (Aşağıda belirtildiği şekilde kontrol,1,2 ve 3'e göre yapılmıştır).

**Kontrol 1:** 1 ml kirletici madde + 1 ml validasyon süspansiyonu + 8 ml sert su 2 dakika karıştırılmış, 5 dakika kontak süresi sonunda iki paralel şekilde Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimi yapılmış ve uygun şartlarda inkübe edilmiştir (37 °C'de 24 saat+24 saat). Sert su ve kirletici maddenin mikroorganizma sayısını azaltmadığı, yani letal etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

**Kontrol 2:** 1 ml validasyon süspansiyonu + 9 ml nötralizan ile karıştırılmış, bu karışım  $10^{-2}$  olacak şekilde dilüe edilmiş ve 5 dakika kontak süresi sonunda iki paralel şekilde TSA besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimleri yapılmış ve uygun şartlarda inkübe edilmiştir (37 °C'de 24 saat+24 saat). Nötralizanın, test edilen mikroorganizmalar üzerine toksik olmadığı tespit edilmiştir.

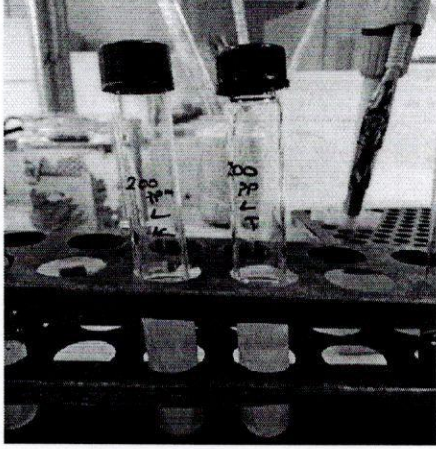
**Kontrol 3:** Üçüncü aşamada ise 1 ml kirletici madde + 1 µl dilüent + 8 ml dezenfektan bir tüpte karıştırılmış, buradan 1 ml alınarak 8 ml nötralizan ile muamele edilmiştir. Daha sonra 5 dakika sonrasında üzerine 1 ml validasyon süspansiyonu eklenerek, iki paralel şekilde TSA besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimleri yapılmış ve uygun şartlarda inkübe edilmiştir (37 °C'de 24 saat+24 saat). Nötralizanın, dezenfektanı nötralize ettiği tespit edilmiştir.

## 3. Test Prosedürü

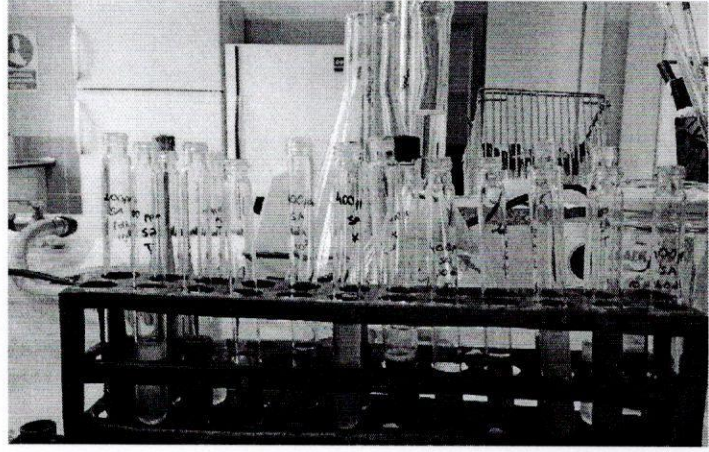
Etkinlik testi, hem kirletici madde varlığında, hem de temiz ortamda olacak şekilde iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Temiz ortamı sağlamak için 0,3 g/l sığır albümini, kirletici ortam için 3 ml/l taze koyun eritrositi içeren 3,0 g/l sığır albümini solüsyonları standartta belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Şekil 1).

Test prosedürü, seçilen tüm mikroorganizmalarda ve belirlenen 3 farklı konsantrasyondaki dezenfektanda uygulanmıştır (Şekil 2). Tüm denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, 1 ml test süspansiyonu üzerine, 1 ml ortam solüsyonu eklenmiştir (yukarıda belirtilen kirli veya temiz ortam solüsyonları) 2 dakika karışım süresinin sonunda 7 ml dezenfektan eklenerek 5 dakika kontak süresi beklenmiştir. Süre sonunda bu karışımdan 1 ml alınarak, 8 ml nötralizan ve 1 ml sert su içeren tüpe aktarılmıştır. Sonrasında 10 saniye nötralizasyon süresi sonrası ilk olarak bu karışım tüpünden 1 ml alınarak iki paralel şekilde

TSA besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Yine bu tüpten 0,5 ml alınarak 4,5 ml nötralizan içeren ayrı bir tüpe eklenmiş ve ikinci dilüsyon hazırlanmıştır. Bu dilüsyondan da aynı şekilde 1 ml alınarak iki paralel şekilde TSA besiyerine dökme plak yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Tüm ekimler 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Başlangıçtaki koloni sayısıyla karşılaştırıldığında, test işlemi sonrası *5 logaritmalık azalma görülmesi durumunda dezenfektanın bakterisidal etkili olduğu kabul edilmiştir.*



Şekil 1. Kirli ve temiz ortam

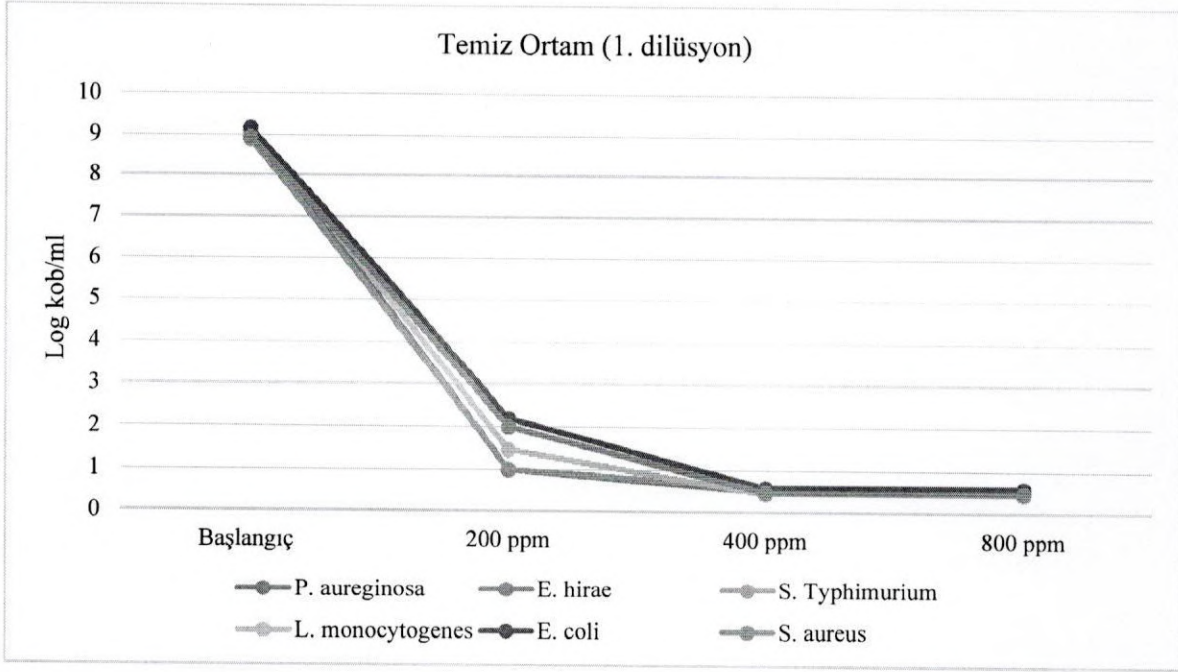


Şekil 2. Test Prosedürü

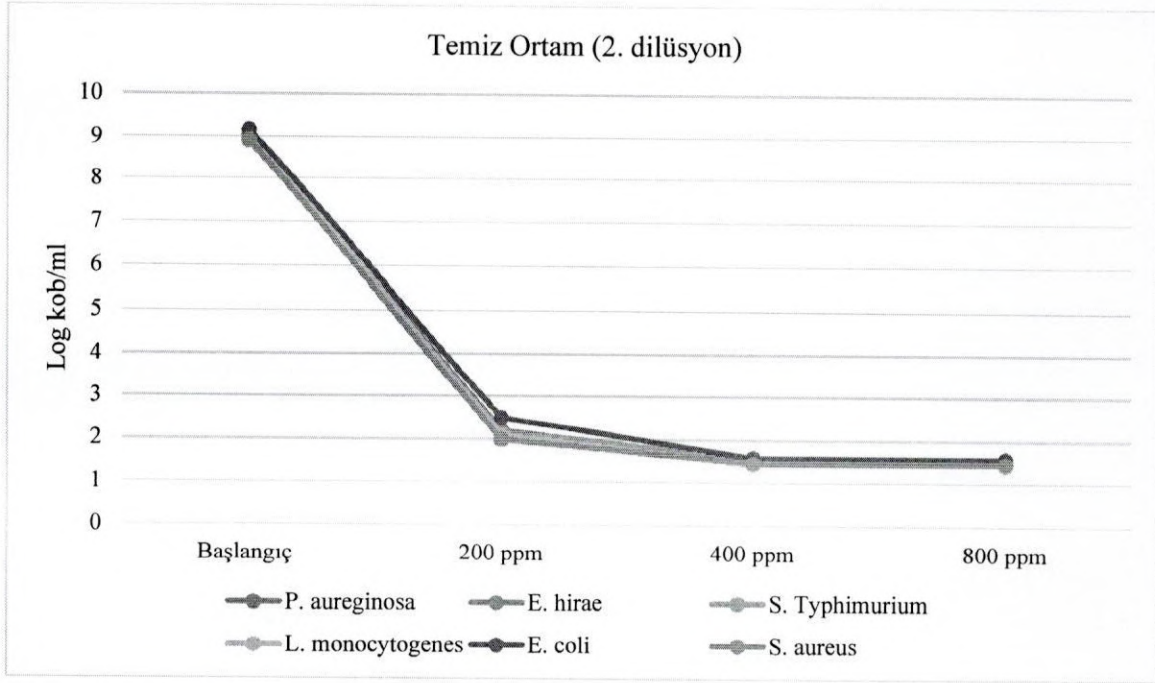
#### 4. Sonuçlar

Sonuçlara bakıldığında tüm konsantrasyonların, her iki dilüsyon ekimlerinin, hem temiz (Grafik 1 ve 2) hem de kirli ortamda (Grafik 3 ve 4) başlangıç düzeyleriyle karşılaştırıldığında 5 logaritmadan fazla düşüş sağladığı tespit edilmiştir. Çalışmada oda sıcaklığında, 5 dakika temas süresinde denemesi yapılan bütün dezenfektan konsantrasyonlarının (Tablo 2) hem temiz hem de kirli ortamda belirlenen mikroorganizmalar üzerine etkili olduğu görülmüştür.

Handwritten signatures in blue ink.

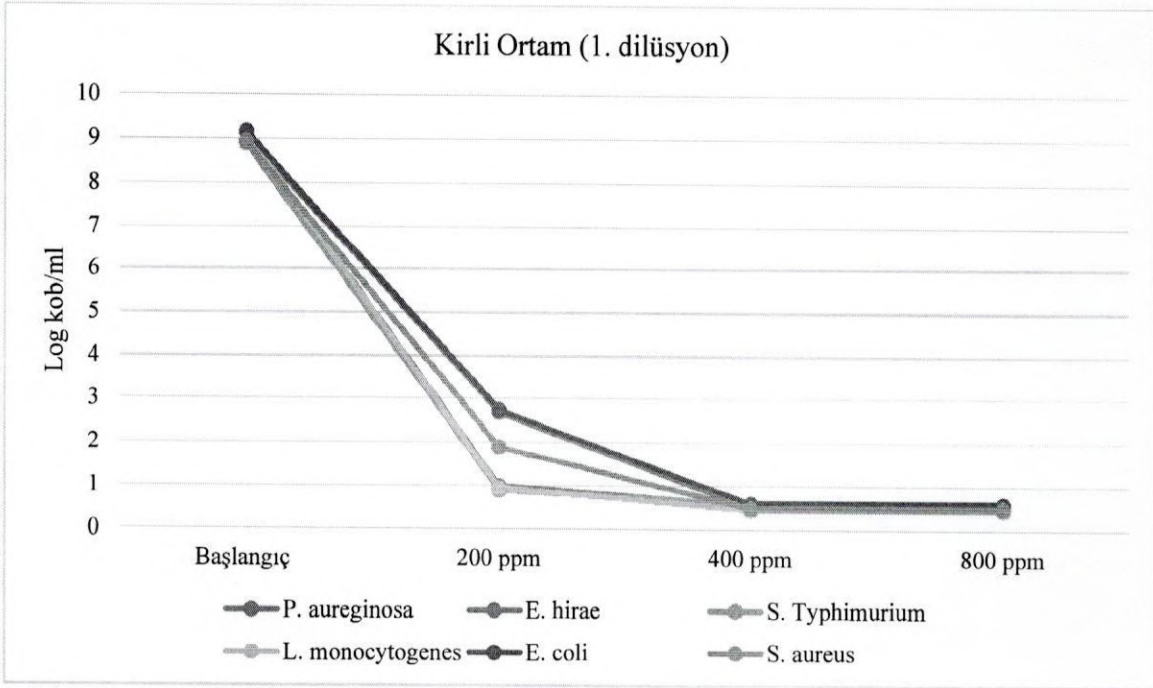


Grafik 1: Temiz ortamda dezenfektanın 1. dilüsyon etkinlik testi sonuçları

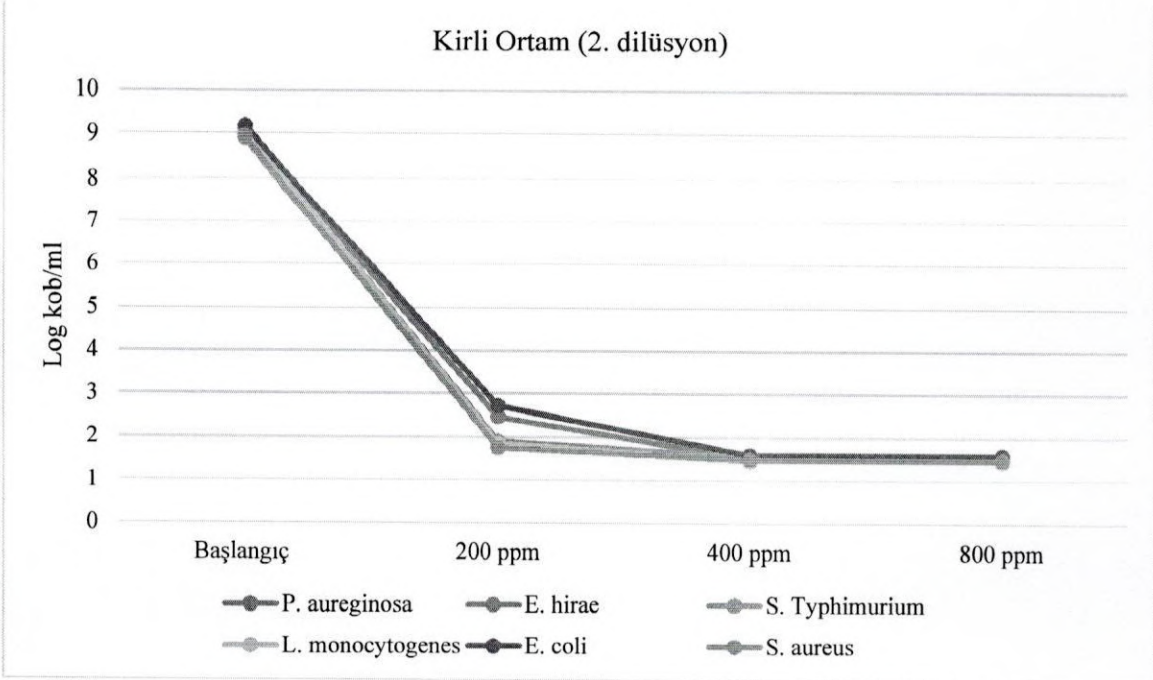


Grafik 2: Temiz ortamda dezenfektanın 2. dilüsyon etkinlik testi sonuçları

Handwritten signature in blue ink.



Grafik 3: : Kirli ortamda dezenfektanın 1. dilüsyon etkinlik testi sonuçları



Grafik 4: Kirli ortamda dezenfektanın 2. dilüsyon etkinlik testi sonuçları

Handwritten signature in blue ink.



**Tablo 2. Farklı dezenfetan konsantrasyonlarının temiz ve kirli ortamda belirlenen mikroorganizmalar üzerine etkisi (log kob/ml)**

		<i>P. aeruginosa</i>				<i>E. hirae</i>			
		Temiz ortam		Kirli ortam		Temiz ortam		Kirli ortam	
200 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	2,72	2,70	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	2,40	2,47	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
400 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
800 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
		<i>S. Typhimurium</i>				<i>L. monocytogenes</i>			
		Temiz ortam		Kirli ortam		Temiz ortam		Kirli ortam	
200 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	1,38	1,47	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
400 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
800 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
		<i>E.coli</i>				<i>S.aureus</i>			
		Temiz ortam		Kirli ortam		Temiz ortam		Kirli ortam	
200 ppm	1. dilüsyon	2,20	2,26	2,80	2,76	2,10	2,0	1,85	1,90
	2. dilüsyon	2,32	2,24	2,70	2,72	2,0	2,15	<2,0	<2,0
400 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	2,06	2,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	2,11	2,16	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
800 ppm	1. dilüsyon	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	2. dilüsyon	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0

## II. Tüpte Etkinlik Testi (German Society for Hygiene and Microbiology Guideline)

### 1. Standart Suşların hazırlanması

Test suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15440, *Enterococcus hirae* ATCC 8043, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7646 kullanılmıştır. Kullanılacak suşlar BHI

Broth'da canlandırılmış ve spesifik agarlar kullanılarak suşların etkinlik gücü hesaplanmıştır. Kullanılan besi yerleri ve tespit edilen suş güçleri Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan besi yerleri ve tespit edilen suş güçleri

Standart suş	Besi yeri	Etkinlik gücü
<i>P. aeruginosa</i>	Cephaloridine fucidin ceftrimide (CFC ) agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>E. hirae</i>	Slanetz and Bartley (SB) agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>S.aureus</i>	Chromogenic <i>S. aureus</i> agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>E.coli</i>	Chromogenic ECC agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>S. Typhimurium</i>	Chromogenic <i>Salmonella</i> agar	10 <sup>9</sup> kob/ml
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> ALOA agar	10 <sup>9</sup> kob/ml

Her bir suşun 10<sup>3</sup> ve 10<sup>5</sup> kob/ml olacak şekilde iki dilüsyonu hazırlanmıştır.

## 2. Dezenfektanların hazırlanması

Ticari olarak granüller formda gelen dezenfektanlardan, üretici firmanın önerisi doğrultusunda 800 ppm, 400 ppm ve 200 ppm olarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. Her konsantrasyondan tüplere 9'ar ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

## 3. Mikroorganizmaların inokülasyonu

Dezenfektan bulunan tüpler içerisine 10<sup>3</sup> ve 10<sup>5</sup> oranında taze suşlardan 1'er ml inokule edilmiştir. İnokülasyon sonrası tüpler 1 dakika, 5 dakika, 30 dakika ve 1 saat temas süresi boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.

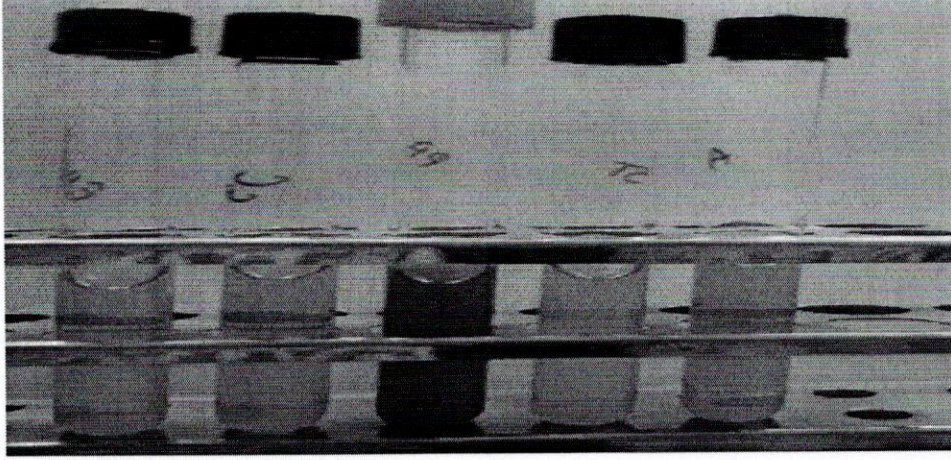
## 4. Mikrobiyolojik analizler

Bekleme süreleri sonunda her bir karışımdan 0.03 ml (bir damla) 10 ml nötralizan broth içerisine ilave edilmiş ve 37° C de 48 saat bekletilmiştir. **Mordan sarıya dönüşen tüpler pozitif (+), rengi değişmeyen tüpler negatif (-) olarak kabul edilmiştir.**

## 5. Kontrol Grupları

Kontrol grupları da çalışma örnekleri ile birlikte inkübasyona kaldırılmıştır. Brothun çalıştığını gözlemleyebilmek için içerisine saf kültür konulan tüp Kontrol Grubu 1, brothun kontamine olmadığını tespit edebilmek için içerisine hiçbir şey katılmamış tüp Kontrol Grubu 2 ve dezenfektanın kontamine olmadığını anlamak için sadece dezenfektan damlatılan tüp Kontrol Grubu 3 olarak değerlendirilmiştir.

H z O K A R



Şekil 5. Pozitif ve negatif kontrol örnekleri

### 6. Sonuçlar

Tüpte etkinlik testinde kontrol grubundaki üremelerle karşılaştırıldığında, tüm dilüsyonların, seçilen temas süreleri boyunca denemesi yapılan  $10^3$  ve  $10^5$  düzeyindeki mikroorganizmalara etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4). Çalışma sonuçları Tablo 4 ve 5'te görülmektedir.

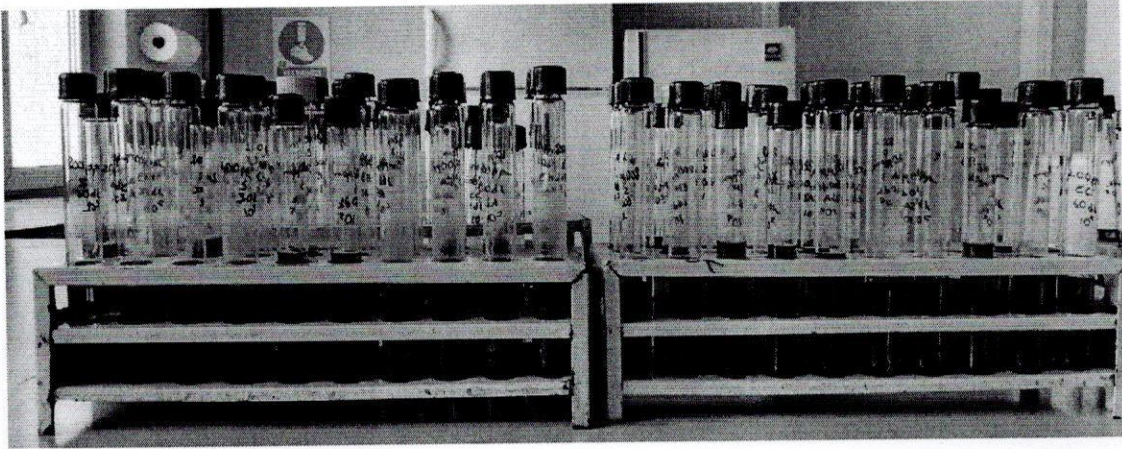
Tablo 4. Seçilen temas sürelerinin  $10^3$  kob/ml düzeyindeki mikroorganizmalara etkisi

		1 dakika	5 dakika	30 dakika	1 saat
<i>P. aereginosa</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>E.coli</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-

*(Handwritten signature in blue ink)*

Tablo 5. Seçilen temas sürelerinin 10<sup>5</sup> kob/ml düzeyindeki mikroorganizmalara etkisi

		1 dakika	5 dakika	30 dakika	1 saat
<i>P. aureginosa</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>E.coli</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	200 ppm	-	-	-	-
	400 ppm	-	-	-	-
	800 ppm	-	-	-	-



Şekil 4. İnkübasyon sonrası negatif tespit edilen tüpler

## SONUÇ

Sonuç olarak yapılan bakterisidal etkinin incelenmesinde kantitatif süspansiyon testi için Avrupa Standardı EN13727:2013'e (Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area) göre ve farklı temas sürelerinin etkisi German Society for Hygiene and Microbiology Guideline'dan alınan tüpte etkinlik testi yöntemine göre; N-alkil dimetil benzil amonyum aktif maddesi içeren Pron-

*(Handwritten signature in blue ink)*

up ticari isimli dezenfektanın, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15440, *Enterococcus hirae* ATCC 8043 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 25923, ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7646 üzerine 200, 400 ve 800 ppm düzeyinde hazırlanmış konsantrasyonlarının, kirli ve temiz ortamlarda ve 1, 5, 30 dak. ve 1 saat temas sürelerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

H. Z. Akın