

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**TIBBİ STERİLİZASYONUN KONTROLÜNDE KULLANILAN
BİYOİNDİKATÖR SİSTEMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURSELİ KANYILMAZ

DENİZLİ, OCAK - 2021

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**TIBBİ STERİLİZASYONUN KONTROLÜNDE KULLANILAN
BİYOİNDİKATÖR SİSTEMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURSELİ KANYILMAZ

DENİZLİ, OCAK - 2021

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Nurseli Kanyılmaz

ÖZET

**TIBBİ STERİLİZASYONUN KONTROLÜNDE KULLANILAN
BİYOİNDİKATÖR SİSTEMİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
NURSELİ KANYILMAZ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AHMET KOLUMAN**

DENİZLİ, OCAK - 2021

Hastane enfeksiyonlarını kontrol edebilmek amacıyla en etkili yöntem olan sterilizasyon, belirli standartlarda uygulanmaktadır. Tıbbi malzemenin özelliğine ve nesnenin fiziksel yapısına göre seçilen sterilizasyon yöntemi değişmektedir. Bu tez çalışmasında tıbbi malzemelerin sterilizasyonunun kontrolünde kullanılan biyolojik indikatörlerin üretimi zaman parametresi göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada biyolojik indikatör olarak yaygın olarak kullanılan *Geobacillus stearothermophilus* ve düşük sıcaklıklardaki sterilizasyon yönteminde mikroorganizma tespiti için *Escherichia coli* kullanılmıştır. *G. stearothermophilus*un sporlu bir mikroorganizma olması, *E. coli* vejetatif formda olması sebebiyle çiftli kontrol yapabilmek için seçilmiştir. Farklı şeker katkısı ile eklenen *E. coli* ve *G. stearothermophilus* bakterileri kullanılarak hazırlanan otoklav biyoindikatörlerinden Arduino Uno ve TCS3200 sensör ile hızlı cevap almak hedeflenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, her iki bakterinin de yeterli olduğu ancak sistemde ön tarama testi olarak her iki bakterinin de kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak yapılan bir otoklav işleminin kontrolünün 24 saatten önce en kısa 4 saatte belirlenebileceği tespit edilmiştir. Bu amaçla her iki bakterinin de sistemde kullanılmasının halk sağlığı amacıyla uygun olacağı kanaati oluşmuştur.

Aynı zamanda bu tezden elde edilen veriler ile sahada yerli biyoindikatör üretimine yönelik bir prototip oluşturulmuş ve bu ürünlerin hazırlanmasında da rehber döküman olarak hizmet etmesi hedeflenmiştir. Yukarıda anılan bütün verilerin ışığında elektronik ve optik donanım ile sonucu insan gözünden daha hızlı okuyabilen ve analitik veriler ile optimize edilebilen, kayıt altına alınabilen bir cihazla kalite kontrol süreçlerinin daha doğru yapılabileceği kanaati oluşmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: Sterilizasyon, Biyolojik İndikatör, Optik Donanım, Hijyen

ABSTRACT

BIOINDICATOR SYSTEM USED IN CONTROL OF MEDICAL STERILIZATION

MSC THESIS

NURSELİ KANYILMAZ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOMEDICAL ENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR. AHMET KOLUMAN

DENİZLİ, JANUARY 2021

Sterilization which is the most effective method to control hospital infections, is applied in certain standards. In this thesis, the production of biological indicators used in the control of the sterilization of medical materials was carried out. The sterilization method chosen varies according to the characteristics of the medical equipment and the physical structure of the object.

In this study, *Geobacillus stearothermophilus*, which is widely used as a biological indicator, and *E. coli* for microorganism detection in sterilization method at low temperatures were used. Since *Geobacillus stearothermophilus* is a spore microorganism, *E. coli* was chosen for double control because of its vegetative form. It is aimed to get fast response with Arduino Uno and TCS3200 sensors, which are autoclave bioindicators prepared using *E. coli* and *G. stearothermophilus* bacteria produced in broths added with different sugar additives. Looking at the results of the study, it was determined that both bacteria were sufficient, but it was appropriate to use both microorganism as a pre-screening test in the system. Accordingly, it has been determined that the control of an autoclave process can be determined in 4 hours before 24 hours. For this purpose, it has been concluded that the use of both bacteria in the system would be appropriate for public health purposes.

At the same time, with the data obtained from this thesis, a prototype for domestic bioindicator production in the field was created and it was aimed to serve as a guide document in the preparation of these products. In the light of all the above-mentioned data, it has been concluded that quality control processes can be performed more accurately with a device that can read the result faster than the human eye with electronic and optical equipment and can be optimized and recorded with analytical data.

KEYWORDS: Sterilization, Biological Indicator, Optic Equipment, Hygiene

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. STERİLİZASYON VE KONTROLÜ	8
2.1 Sterilizasyon	8
2.2 Sterilizasyon Çeşitleri.....	8
2.2.1 Buharla Sterilizasyon	8
2.2.1.1 Basınçlı Buharla Sterilizasyon	9
2.2.1.2 Basınçsız Buharla Sterilizasyon	12
2.2.2 Kuru Sıcaklıkla Sterilizasyon	12
2.2.3 Düşük Sıcaklıkta Sterilizasyon Yöntemleri	13
2.2.3.1 Etilen Oksitle Sterilizasyon.....	13
2.2.3.2 Formaldehitle Sterilizasyon	13
2.2.3.3 Gaz Plazmayla (H ₂ O ₂) Sterilizasyon.....	14
2.2.3.4 Gamma Radyasyonula (Işınlama) Sterilizasyon	14
2.2.3.5 Perasetik Asitle Sterilizasyon.....	15
2.3 Sterilizasyonun Kullanım Alanları	15
2.4 Sterilizasyonun Kontrolü.....	15
2.5 Sterilizasyonun Kontrolünde Kullanılan Uluslararası Standartlar	16
3. STERİLİZASYONUN KONTROLÜNDE KULLANILAN İNDİKATÖRLER.....	19
3.1 Kimyasal İndikatörler	19
3.2 Biyolojik İndikatörler	20
3.2.1 <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	22
3.2.2 <i>Escherichia coli</i>	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM	23
4.1 Gereçler	23
4.1.1 Kullanılan Besiyerleri	23
4.1.1.1 Tryptic Soy Broth.....	23
4.1.1.2 Tryptic Soy Agar.....	24
4.1.1.3 Brain Heart Broth.....	25
4.1.1.4 Plate Count Agar	26
4.1.1.5 Maximum Recovery Diluent.....	27
4.1.1.6 Enerji Kaynaklarının Seçimi	28
4.1.1.7 Nişasta Solüsyonu	28
4.1.1.8 Glukoz Solüsyonu	28
4.1.1.9 İndikatörler	28
4.1.1.9.1 Phenol Red.....	28
4.1.1.9.2 Brom Cresol Purple	29
4.1.2 Bakterinin Canlandırılması ve Gücünün Saptanması	29

4.1.3	Süre ve Renk İlişkisinin Kurulması	30
4.1.4	Biyoundikatör Tespit Düzenegini.....	31
4.2	YÖNTEM	35
4.2.1	Biyoundikatör Tespit Düzeneginin Hazırlanması	37
4.2.2	Validasyon ve Verifikasyon.....	38
5.	BULGULAR	39
6.	TARTIŞMA	52
7.	SONUÇ VE ÖNERİLER	57
8.	KAYNAKLAR.....	58
9.	EKLER.....	66
10.	ÖZGEÇMİŞ.....	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Otoklav cihazı blok diyagramı (Web Anonim 3 2020).	11
Şekil 2.2: Bowie&Dick testi örneği (Web Anonim 19 2020).....	16
Şekil 4.1: Dilüsyon şeması.....	30
Şekil 4.2: Renk sensörü ve eppendorf tüpün yerleştirildiği kutu.....	31
Şekil 4.3: Arduino Uno R3 kartı (Web Anonim 5 2020).....	32
Şekil 4.4: TCS3200 renk sensör kartı (Web Anonim 5 2020).....	32
Şekil 4.5: Eppendorf tüplerden renk tespiti yapılan deney düzeneğinden görünüm.	33
Şekil 4.6: Yapılan işlemlerin akış şeması.	35
Şekil 4.7: Optik donanımda okumak üzere örneklerin hazırlanması.	36
Şekil 4.8: Arduino Uno ile renk sensörünün bağlantı şeması.	37
Şekil 4.9: Validasyon verifikasyon çalışması.	38
Şekil 5.1: Üreme eğrisi.....	39
Şekil 5.2: 4.saat <i>G. stearothermophilus</i> glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.	44
Şekil 5.3: 4.saat <i>G. stearothermophilus</i> nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.	44
Şekil 5.4: 4.saat <i>E. coli</i> glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.....	45
Şekil 5.5: 4.saat <i>E. coli</i> nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.....	45
Şekil 5.6: 8.saat <i>E. coli</i> nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.....	46
Şekil 5.7: 8.saat <i>E. coli</i> glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.....	46
Şekil 5.8: 8.saat <i>G. stearothermophilus</i> glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.	47
Şekil 5.9: 8.saat <i>G. stearothermophilus</i> nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.	47
Şekil 5.10: 24.saat <i>G. stearothermophilus</i> nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.	48
Şekil 5.11: 24.saat <i>G. stearothermophilus</i> glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.	48
Şekil 5.12: 24.saat <i>E. coli</i> glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.....	49
Şekil 5.13: 24.saat <i>E. coli</i> nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.....	49

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Basınç sıcaklık ilişkisi (Karadağ 2005).	10
Tablo 2.2: Kuru sıcaklık zaman parametreleri (Pekbay 2005).	13
Tablo 2.3: Potansiyel seçilebilecek mikroorganizmalar (Web Anonim 14 2020).	17
Tablo 4.1: Tryptic soy broth bileşimi (Web Anonim 8 2020).	23
Tablo 4.2: Tryptic soy broth kalite kontrol (Web Anonim 8 2020).	24
Tablo 4.3: Tryptic soy agar bileşimi (Web Anonim 9 2020).	24
Tablo 4.4: Tryptic soy agar kalite kontrol (Web Anonim 9 2020).	25
Tablo 4.5: Brain heart bileşimi (Web Anonim 10 2020).	25
Tablo 4.6: Brain heart broth kalite kontrol (Web Anonim 10 2020).	26
Tablo 4.7: Plate count agar bileşimi (Web Anonim 11 2020).	26
Tablo 4.8: Plate count agar kalite kontrol (Web Anonim 11 2020).	27
Tablo 4.9: Maximum recovery diluent bileşimi (Web Anonim 12 2020).	27
Tablo 4.10: Maximum recovery diluent kalite kontrol (Web Anonim 12 2020).	27
Tablo 4.11: Besiyeri malzeme oranları.	29
Tablo 4.12: Pinlerin renklere göre durumu (Web Anonim 2, 2020).	33
Tablo 5.1: Farklı besiyerlerinde saatlere göre bakterilerin üreme sayıları (log ₁₀ kob/mL).	39
Tablo 5.2: Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti... ..	40
Tablo 5.3: Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti... ..	40
Tablo 5.4: <i>G. stearothermophilus</i> glukoz çözültisi için optik okuma değerlendirmesi.	41
Tablo 5.5: <i>E. coli</i> nişasta çözültisi için optik okuma değerlendirilmesi.	42
Tablo 5.6: <i>E. coli</i> glukoz çözültisi için optik okuma değerlendirilmesi.	43
Tablo 5.7: Vejetatif bakteri için hassasiyet sonuçları.	50
Tablo 5.8: Sporlu bakteri için hassasiyet sonuçları.	51

SEMBOL LİSTESİ

g	:	Gram
l	:	Litre
ml	:	Mililitre
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
NB	:	Nutrient broth
NA	:	Nutrient agar
TSB	:	Tryptic soy broth
TSA	:	Tryptic soy agar
pH	:	Çözeltideki hidronyum iyonu molar konsantrasyonunun eksi logaritması (-log [H+])
kGy	:	Kilogray
IAEA	:	Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu
ISO	:	The International Organization for Standardization- Uluslararası Standardizasyon Ofisi
UV	:	Ultraviyole
PCA	:	Plate Count Agar
CDC	:	Center for Disease Control and Prevention

ÖNSÖZ

Türkiye’de otoklav biyoindikatörü üretilmemektedir ve yaptığımız bu tezle üretim bilgilerinin süreçlerini gözden geçirip süreci hızlandırarak toplam kaliteye hizmet etmek hedeflenmektedir.

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince değerli zamanını ayıran, bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, olumlu eleştirileri ile çalışmalarımındaki eksiklikleri gidermemi sağlayan danışmanım Prof. Dr. Ahmet Koluman hocama emeklerinden dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Öğrenimim süresince beni destekleyen sevgili aileme teşekkür ediyorum.

1. GİRİŞ

Sterilizasyon ortamda bulunan tüm mikroorganizmaların ortadan kaldırılması işlemidir (Albert ve diğ. 1998). Tıbbi malzemelerin üretimi ve kullanımında sterilizasyonun güveni, standart işlem prosedürleri ile sağlanmaktadır. Tekrar tekrar kullanılabilir tıbbi malzemelerin sterilizasyonu yetersiz olduğunda enfeksiyonlara neden olabilir (Panta ve diğ. 2019). Sterilizasyon işleminin başarısız olması insan sağlığı açısından risk oluşturduğu için medikal malzemelerin mikroorganizma barındırma olasılığı kontrol edilmektedir (Yoleri 2011).

Hastane enfeksiyonlarının neden olduğu ölüm ve maliyet artışının kontrol edilmesi için sterilizasyon önemli bir basamaktır. Hastane harcamalarının büyük bir bölümü ameliyathanede tekrar kullanılabilen malzemelerin sterilizasyonu için kullanılır (Castillo 2017). SAL (Sterility Assurance Level) değeri bir sterilizasyon işleminin sonucunda milyonda bir mikroorganizma kalma olasılığı olarak tanımlanır ve bu değer endüstriyel uygulamalarda mutlaka sağlanmalıdır. Sterilizasyon yöntemleri; mikrobiyal uzaklaştırma mekanizmaları, çalışma parametreleri, malzemenin uygunluğu, yasal gereklilikler, sterilizasyon işleminin ekonomikliğine göre değişmektedir. Sterilite valide edildiğinde sağlanmaktadır. Steriliteyi direkt olarak ölçmek mümkün olmadığı için validasyon işlemi kimyasal ve biyolojik indikatörler sayesinde yapılmaktadır. Kontrol sistemi kurulduğunda ilk olarak sterilizasyon yöntemine dirençli bir mikroorganizma seçilir. Hedef ürün ile sterilizasyon arasındaki etkileşim kimyasal indikatör ile belirlenirken, biyolojik indikatör ile sterilizasyon döngüsüne karşı direnci etkilenen farklı değişkenlerin etkisi belirlenmektedir (Günaydın ve Sünbül 2003).

Sterilizasyon işleminde çok yaygın kullanılan otoklavlar; mikrobiyoloji, tıp, diş hekimliği, gıda, kimya, veterinerlik gibi alanlarda öne çıkmaktadır. Steril edilecek malzemeye göre seçilen sterilizasyon yöntemi değişmektedir. Yaygın kullanılan buharla sterilizasyon, buharla doymuş bir ortamda 100 °C'den daha yüksek sıcaklık ile yapılan sterilizasyon çeşididir ve 121 °C'de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakikada etkin değerini gösterir. Otoklavların sterilize edilecek ortama, malzemeye bağlı olarak boyutu ve işlevi farklılık göstermektedir. Bir diğer yaygın kullanılan yöntem kuru hava

ile sterilizasyonda pastör fırınları, 175 °C' de 1 saat, 140 °C'de 3 saat işlem sürelerine sahiptir (Web Anonim 7 2020).

Sıcaklık, basınç, nem, konsantrasyon verilerinin sensörler aracılığıyla cihaz ekranında görüntülenmesiyle sterilizasyon kontrolünün ilk aşaması gerçekleştirilmektedir. Kimyasal indikatörler, paketin yerleştirildiği yerde maruz kaldığı işlem sonunda kimyasal veya fiziksel değişikliklere uğrayarak renk değişimi sayesinde sterilizasyon işlemi bittiğinde sonuç gösteren indikatörlerdir. Ancak sterilizasyon işlemi hakkında kısıtlı bilgi sağlamaktadır (Web Anonim 7 2020).

Biyolojik indikatörler, sterilizasyonla ilgili doğrudan bilgi sağlayarak mikroorganizmaların hücre bütünlüğünün bozulmasındaki etkiyi göstermektedir. Yaygın kullanılan otoklav etkinliğinin güvencesi standartlar tarafından belirlenir ve biyolojik indikatörler ile kanıtlanmaktadır (Web Anonim 15 2020).

Sterilizasyon sonrası, sterilité güvence düzeyine (SAL) ulaşıldığının ispatlanması için standartta yaygın olarak 10^6 yükünde spor içeren biyolojik indikatörler kullanılır. Biyolojik indikatörler steril edilecek cihazda; kapak, köşeler ve vakum drenaj çıkışları gibi sterilizasyon işleminin en zor gerçekleştiği bölgelere yerleştirilir. Sterilizasyon işleminde kontamine olmuş malzeme yıkanarak paketlenir, sterilizatöre ve yerleştirilir sterilizasyon işlemi sonunda tekrar kullanılmak üzere depolama alanına kaldırılır (Rutala ve Weber 2013).

Kısa zamanda tamamlanan, ameliyathanede kullanılan acil sterilizasyon için flash sterilizasyon adı verilir. Bu teknikte aktif sporlarla ilişkili α -glukozidaz enzim aktivitesi ölçülmektedir. Enzim tespitiyle sonuç alınan biyoindikatörlerin ihtiyacı için bu teknik önemli olmuştur. Enzim canlı sporlarda tespit edilebilen normal bir bileşendir. Sterilizasyon sonrası canlı bir spor kalması halinde sterilizasyon başarısızlığı ortamın bulanıklığıyla belirlenir (Albert ve diğ. 1998, Vesley ve diğ. 1992).

Belli sterilizasyon işlemine direnç sağlayan bakteri sporlarından oluşan biyolojik indikatörler, sterilizasyon esnasındaki işlemde biyolojik ölümün gerçekleştiğini kanıtlar. Biyolojik indikatörler, ilgili sterilizasyon yöntemine göre en dayanıklı bakteri sporları seçilerek üretilmektedir. Geleneksel olarak biyoindikatörler *Bacillus* veya *Geobacillus* içeren bakteri sporlarıdır. Bakteriyel sporlar, izleme ve doğrulama döngülerinde vejetatif hücrelere kıyasla çevre stresine karşı dayanıklı olduğu için kullanımı yaygındır. Biyolojik göstergeler bir sterilizatörün rutin parametrelerinin izlenmesi ve yük takibi için de kullanılmaktadır. Biyolojik göstergeler, bir sterilizasyon döngüsü sırasındaki koşulların tanımlanmış olan mikrobiyal inaktivasyon seviyesine ulaşmak için yeterli olup olmadığını kanıtlamaktadır. Bu göstergeler, büyüme ortamı ve sporları tek bir şişede birleştirilerek kontrol sağlar. Sterilizasyon sonrası spor içeren şeritler besiyerine aktarılarak ya da aynı tüp içindeki besiyeri kırılmasıyla bir araya getirilerek sporun çeşidine ve üremesine uygun sıcaklıkta inkübatöre yerleştirilmektedir. Böylece sterilizasyon işleminin ardından sporların büyüme ortamı ile karışması sağlanır ve spor büyümesine uygun sıcaklıkta inkübe edilir. Büyüme ortamı, test organizmasının canlılığını etkileyebilecek herhangi bir sterilize edici ajan kalıntısını nötralize edebildiğinden emin olmak için valide edilmelidir. Belirtilen kültür koşullarını sağlayacak sıcaklığa ayarlanan böylece sıcaklığın rutin olarak izlenmesi için inkübatör kullanılmaktadır. Belirtilen sürede inkübasyon sonrasında üreme olmaz ise biyolojik ölümün gerçekleştiği doğrulanmaktadır (Web Anonim 18 2021, Web Anonim 17 2020).

Sterilizasyon yapılacak malzemede bulunan mikroorganizmalar, spordan daha düşük dirençte olduğu için sterilizasyon gerçekleştirilmiş olur. Bu amaçla canlı mikroorganizmanın kullanımı yaygındır. *Geobacillus stearothermophilus* sporları buharlaşmış hidrojen peroksite ve buhar sterilizasyonuna yüksek direnç gösterdiği için, sterilizasyon kontrolünde yaygın kullanılmaktadır (Shintani 2011, Sigwarth ve Moirandat 2000).

Buhar sterilizasyonunda yüksek direnci ve tutarlı inaktivasyon etkinliği ile *G. stearothermophilus* tercih edilmekte iken *Bacillus pumilus* sporları diğer *Bacillus* türlerinden radyasyona daha dirençli olması sebebiyle mikroorganizmaların radyasyon direncini tespit için tutarlı yanıtlar almak ve doz oranını (kGy/zaman) ayarlamak için biyoindikatör olarak kullanılmaktadır (Hansen ve diğ. 2020).

Biyolojik indikatörlerin; sterilizatörün tamir gerektiren bir arızasından sonra, vücuda implante edilecek malzemelerin her çevriminde, paket malzemelerinin boyutu değiştiğinde kullanılması zorunludur. Biyolojik indikatörlerin düşük sıcaklıktaki sterilizasyonlarda her çevrimde kullanılması gerekmektedir. Kuru sıcaklık ve buharlı yöntemlerde ise invazif olma durumuna göre değerlendirilerek en az haftada bir kez kullanılmalıdır (Wallace 2016, Web Anonim 15 2020).

Biyoindikatörler, belirli bir sterilizasyon işleminde kullanılan ve dayanma gücü olan canlı mikroorganizmalar içeren kalitatif test sistemidir. Biyoindikatörler, bir sterilizasyon işleminde belirli koşulların sağlanıp sağlanmadığıyla ilgili güven seviyesi sağlar. Biyolojik göstergeler, sterilizasyon döngüsüne oldukça dayanıklı bakteri sporları seçilerek işlevini gerçekleştirmektedir. Bu biyolojik göstergeler, sporları çoğaltarak ve büyüme ortamındaki asit metabolitlerinin üretimini ölçmek için bir pH göstergesine dayanır. Spor emdirilmiş kâğıt şeritler, kendinden besiyerli kapalı sistemler ve enzim bazlı biyolojik indikatörler olarak 3 çeşit biyolojik indikatör üretilmektedir. Biyolojik indikatörlerin ilk çeşidi, zarfların içinde aşılınmış kâğıt şeritler şeklindedir bunlar sterilizasyon işleminden sonra steril kültür ortamına aktarılır ve 7 gün süreyle inkübe edilir. Bu yöntemle, sterilizasyon başarısızlığı büyüme ortamının bulanıklığıyla gözlemlenmektedir (Shintani 2011, Pflug ve Odlaug 1986).

İkinci çeşit biyolojik indikatörler, kullanıma hazır bir pakette geri kazanım için gerekli spor şeridi ve büyüme ortamını içeren bağımsız sistemlerdir. Sporları çoğaltarak ve hücreleri kopyalayarak büyüme ortamındaki asit metabolitlerinin üretimini ölçen biyolojik göstergeler, pH ölçümüne dayanır. Bu sistemle birlikte, birinci olarak açıklanan kâğıt şeritlere kıyasla kontaminasyon sorununu ortadan kaldırır, ancak hayatta kalan sporların tespiti için 24-168 saat okuma süresi gerekmektedir. Spor içeren kâğıt şerit biyoindikatörler, sterilizasyon işleminden sonra yaygın olarak 7 gün süreyle inkübe edilir. Yeni bir sterilizasyon yöntemi için 7 günlük bir referans inkübasyon süresini desteklemek için yeterli veri bulunmadığında, doğrulamanın dayandırılacağı referans inkübasyon süresi olarak en az 14 gün kullanılmaktadır (Web Anonim 18 2021, Web Anonim 17 2020, Web Anonim 16 2021, Web Anonim 15 2020).

Kendinden besiyeri içeren kapalı sistemlerde hayatta kalan sporların tespiti için 24-168 saat okuma süresi gereklidir. Üreme tespit sistemine göre çok farklı zamanlarda sonuç verebilen biyoindikatörler, yaygın olarak 1-48 saatte sonuç verir bununla birlikte referans inkübasyon süresi değişmektedir. Enzim aktivitesi sayesinde daha kısa inkübasyon süreleriyle tespit edilebilen biyolojik kalıntı, enzim tabanlı algılama sistemleri sayesinde tespit edilerek bu süre kısaltılmıştır. Kültür yöntemi ile en az 24 saatte sonuç alınırken, enzim aktivitesi ile bu süre 1-4 saatte yapılabilmektedir. Günümüzde en az 1 saatte sonuç alınan biyoindikatörler üretilmişken, 4 saatte sonuç alınan indikatörlere göre oldukça pahalıdır (Web Anonim 18 2021, Rutala ve diğerleri 1996, Albert ve diğ. 1998).

Biyolojik indikatörlerin sonuçları; türbidimetrik, florimetrik ve spektrofotometrik olmak üzere 3 farklı yöntemle ölçülebilir. Türbidimetrik yöntemde gözle tespit yapılır negatif sonucu garantilemek için inkübasyon süresi en az 2 saattir. Spektrofotometrik yöntemde renk değiştiren besiyerinin otomatik okuması sağlanmaktadır. Florimetrik yöntemde ise floresan vermeyen maddeyi floresan verir hale getirdiği için alfa-glukozidaz veya alfa-galaktozidaz aktivitesi okumayı sağlamaktadır. Floresans veren substratların kullanıldığı ve floresansın otomatik okuyucu tarafından okunduğu yöntemdir. Biyolojik indikatörlerde sonuç almak için uzun inkübasyon zamanı gerekmektedir. Bu problem, 1 saat gibi kısa sürede floresan vermeyen bir maddeyi floresan verir hale getiren spor enzimlerinden alfa-glikozidaz ile çözülmüştür. Kısa sürede sonucun elde edilmesi, sterilizasyonun denetlenmesinde biyolojik indikatörlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır (Gillis ve diğ. 2010, Dlugokenski ve diğ. 2011).

COVID-19 salgını ile kişisel koruyucu ekipmanların kullanımı artmıştır. N95 tipi maskelerin kullanımının artması kişisel koruyucu ekipmanı kıtlığına yol açmıştır. Bu maskelerin tek kullanımlık olması amaçlanmıştır ancak sterilizasyon yapılarak tekrar kullanılması eksiklikleri azaltmada yararlı olacaktır. Hidrojen peroksit sterilizasyon yöntemi kullanılarak, 1.0×10^6 yüklü *G. stearothermophilus* biyoindikatörü ile sterilizasyon doğrulanmaktadır. *G. stearothermophilus* sporları, SARS-CoV-2 gibi zarflı virüslere göre sterilizasyona önemli ölçüde daha dirençlidir. Viral canlılığın doğrudan ölçümü yerine biyoindikatör kullanımının verilerin yorumlanmasında önemli bir örnek teşkil etmektedir (Cramer ve diğ. 2021).

Biyolojik indikatörlerin sonucunun pozitif olması halinde aşağıdaki ihtimaller değerlendirilmelidir (Web Anonim 15 2021):

- Yanlış paketleme
- Gaz konsantrasyon yetersizliği
- Sterilizasyon zaman ve sıcaklık yetersizliği
- Yükleme hataları
- Nem, buhar, basınç parametrelerinde uygunsuzluk

Bu çalışmada materyal olarak *G. stearothermophilus* ve *E. coli* kullanılmıştır. Sterilizasyon için yaygın olarak kullanılan test organizması, *G. stearothermophilus*'tur. *G. stearothermophilus* sporları buharla, formaldehit ve hidrojen peroksit gibi sterilizasyon metotlarında yüksek direnci ve tutarlı inaktivasyon kinetiği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıcaklık, pH, besin ve iyon içeriği gibi sporlanmayı tetikleyen çevresel koşullar, oluşan sporların çeşitli özelliklerini etkilemektedir. Sıcaklık etkili sterilizasyon yöntemlerinde sporulasyon sırasında *G. stearothermophilus* sterilizasyon direnci üzerinde en büyük etkiye sahip olan değişkenin başlangıç pH'ı olduğu belirtilmiştir. Düşük besin konsantrasyonu ve 8.5 civarında alkali pH uygun kabul edilir. Kullanılacak olan bakteriler ATCC kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. *G. stearothermophilus*, yüksek sıcaklığa dayanması ve takip sürecinde sterilizasyon hatalarını erken yakalaması sebebiyle tercih edilmiştir. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyasından olup gram negatif, fakültatif anaerob, çoğunlukla hareketli, sporsuz, çubuk şeklinde bir bakteridir. Genellikle insan ve hayvan bağırsaklarında olmakla birlikte her ortamda bulunabilmektedir. Hastanede üriner sistem kateterizasyonu işlemi gerçekleştirilirken enfeksiyona neden olabilir. *E. coli* glukozdan asit ve gaz yaparak ekildiği besiyerlerinde kolay renk değişimi oluşturmaktadır vejetatif üremesi sebebiyle düşük sıcaklık sterilizasyonları için tercih edilmiştir (Shintani 1996, Thill 2020, Royalty-Hann 2007, Soylu 2005, Guizelini ve diğ. 2012).

Biyoundikatörlerin kullanımı yaygın ve kalite yönetim sistemlerinde çoğu zaman zorunlu kılınmasına karşılık sonuçlanma süresinin 24 saat olduğu, bu süre içerisinde olumsuz bir sonucun büyük etkisi olduğu gözlemlenmektedir. Sterilizasyon işleminde kullanılan biyoundikatörler etüvlerde bekletilerek cevap alınması hedeflenmektedir. Bu da mikroorganizmanın üreme süresine göre 18-24 saatlik bir süreyi kapsamaktadır. Bu süreç içerisinde uygun olmayan bir sterilizasyon işlemine ait ürünler dolaşıma çıkarsa, mikrobiyolojik kalite ve halk sağlığı üzerine doğrudan etkili olmaktadır.

Biyolojik indikatörlerin dezavantajı, işlemin sonucunu elde ederken geçen uzun inkübasyon süreleridir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara bakıldığında geleneksel biyoundikatör kullanımı ile 24 saat içerisinde alınan kontrol cevabına karşılık, bu tez içerisinde dizayn edilen sistem ile 4 saat içerisinde cevap alınmaktadır. Optik okuma ile okuma hataları ortadan kaldırılarak, kişisel hatalar ortadan kaldırılmıştır. Bu da sterilizasyon işlemini takiben steril olmayan ürünün hastane içerisinde dolaşımını engellemek için yeterli süre olarak kabul edilmektedir.

2. STERİLİZASYON VE KONTROLÜ

2.1 Sterilizasyon

Bir nesnenin üzerinde veya içinde bir canlı mikroorganizma bulunmasının teorik olasılığı 1/1.000.000 (10^{-6}) veya bu seviyeden daha az olması durumunda ürün steril tanımına uygun olarak kabul edilmektedir (Çaylan 2003).

Bir tıbbi cihaz, hastayla temas yöntemine bağlı olarak kimyasal veya fiziksel yollarla steril edilmektedir. Uygun olmayan şekilde dekontamine edilmiş invazif tıbbi malzemelerden kaynaklanan çok sayıda salgın vurgulanmaktadır (Weber ve Rutala 2001). Bu sebeple hastanelerde sterilizasyon sürecinin güvenilir ve etkili bir şekilde izlenebilir olması gerekmektedir. Sterilizasyon işleminde sporlar dahil tüm yaşayan mikroorganizmalar öldürülürken, dezenfeksiyon işleminde hastalık yapan patojen mikroorganizmalar öldürülmektedir. Dezenfeksiyon işleminde rutin kontrollerin uygulanması ve standardize hale getirilmesi mümkün değildir ayrıca bakteri sporları tamamen ortadan kaldırılmamaktadır. Bu sebeple enfeksiyon riskini ortadan kaldırmak için sterilizasyon işlemi uygulanmaktadır. Hastane sterilizasyonunun önemi ve enfeksiyonun önlenmesi amacıyla tıbbi atıklara da sterilizasyon işlemi uygulanmaktadır. Her sterilizasyon işlemi öncesi sterilize edilecek malzeme kurulanmalı ve uygun paketlenmelidir. Böylelikle sterilizasyon işlemi sırasında ıslak cihaz ambalaj problemi ortadan kalkmaktadır (Çaylan 2003).

2.2 Sterilizasyon Çeşitleri

2.2.1 Buharla Sterilizasyon

Tıbbi malzemeler için yaygın bir yöntem olan buhar sterilizasyonu, basınç altında buharla ısı transferi yoluyla hücrelerin proteinlerinin pıhtılaşmasıyla

inaktivasyonunu gerçekleştirir ve buhar sterilizasyonu basınç altında bir sterilizatör veya otoklavda gerçekleşmektedir (Zuijdweg 2014).

2.2.1.1 Basınçlı Buharla Sterilizasyon

Kısa süreli, ucuz, toksik içeriğinin olmayışı ve kolay penetre olmasıyla yaygın olarak tercih edilmektedir. Sterilizasyon işlemi buharlaşma enerjisinin malzemelere aktarılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Otoklav adı verilen cihazlarla gerçekleştirilmektedir. Yüksek sıcaklık sebebiyle mikroorganizmaların protein yapıları denatüre olmaktadır. İşlem doymuş su buharı altında 100 °C üzerinde malzeme ile yeterli süre temas etmesi ilkesine dayanmaktadır. Su buharı yeterince doymadığında malzemeler ıslak kalacağı, mikroorganizmaların üremesi gerçekleşebileceği için buhar konsantrasyonu önemli bir parametredir. Öncelikle içerideki hava vakumlanarak malzemelerin su buharıyla teması sağlanmaktadır. Vakumlama işlemi düzgün gerçekleşmezse malzemelerin tüm yüzeyi buharla temas edemeyeceği için sterilizasyon gerçekleşmemiş olmaktadır. İşlem bittiğinde tekrar vakumlanarak malzemelerin kuruması sağlanmaktadır (Karadağ 2005).

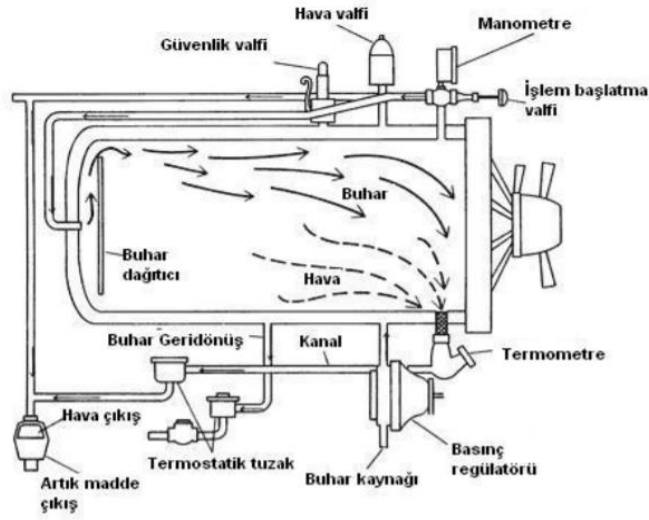
Dünyadaki gelişmiş tıbbi tesisler, tıbbi aletleri sterilize etmek zararlı bulaşmalara neden olacak atıkları işlemek için genellikle otoklavla sterilizasyon yöntemini kullanmaktadır (Neumann ve diğ. 2013). Yüksek nemli ısı proteinleri kuru ısıya göre daha hızlı denatüre eder ve 80-85 °C'de vejetatif bakteriler ölmektedir. Otoklavın sıcaklık derecelerine göre basınç değerleri değişmektedir. Otoklavın bu sıcaklık-basınç ayarlama seçenekleri Tablo 2.1'de açıklanmıştır.

Tablo 2.1: Basınç sıcaklık ilişkisi (Karadağ 2005).

Sıcaklık		Basınç	
°C	°F	kg/cm ²	psi
100	212	0.00	0.0
105	221	0.19	2.8
110	230	0.41	6.0
115	239	0.67	9.8
121	250	1.02	15.0
125	257	1.29	19.0
130	266	1.67	24.5
134	273	2.0	29.4

Otoklav cihazının kontrol ekranında zaman, ısı dijital göstergeleri bulunmaktadır. Şekil 2.1’de otoklav cihazının bölümleri gösterilmiştir. Otoklavı meydana getiren yapılar:

- Kazan
- Kapak
- Termostat
- Hava boşaltma musluğu
- Basınç ayar subabı
- Manometre ve termometre (Karadağ 2005).



Şekil 2.1: Otoklav cihazı blok diyagramı (Web Anonim 3 2020).

Otoklav kullanılırken kontrol edilen parametreler:

1. Cihazın kontrolü: Cihazın ekranında bulunan göstergeler (zaman, sıcaklık, buhar basıncı, bağıl nem) takip edilmektedir. Sıcaklık sensörü kabinin içerisini takip ederek ayarlanan sıcaklıkta kalmasını sağlamaktadır.
2. Maruziyet kontrolü: Kimyasal indikatörlerle renk bandı olarak da adlandırılan gösterge ile paketin sterilizasyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmektedir.
3. Yük kontrolü: Haftada bir PCD (Process Challenge Device) içine kimyasal indikatör yerleştirilerek uygulanmaktadır.
4. Bohça içi kontrol: Kimyasal indikatör kullanılarak gerçekleştirilmektedir.
5. Kayıt sistemi: Kayıt saklama dosyaları ile diğer tüm otoklav kullanılırken kontrol edilen parametreler kaydedilmektedir (Karadağ 2005).

2.2.1.2 Basınçsız Buharla Sterilizasyon

Basınçsız buhar ile sterilizasyonlardan birincisi, 100 °C sıcaklıkta doymuş buharla akım halindeki basınçsız su buharı ile Koch kazanı adı verilen kazanlarda yapılan sterilizasyondur. Vejetatif organizmalar ölümlerinde sporlar bu yöntemle ölmemektedir (Dolapçı 2020).

İkinci yöntem olan Ultra High Temperature (UHT) sterilizasyonu ise akım halindeki buhar ile yapılmaktadır. Bu yöntem sıvı besin maddelerinin özellikle sütün sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta kısa sürede sterilizasyon tamamlanmaktadır. Sıvı madde 145 °C'ye kadar hızlı ısıtılıp, 4 saniye kadar bu sıcaklıkta tutulduktan sonra hızla 22 °C'ye kadar soğutularak uygun koşullarda steril kaplara koyularak tamamlanmaktadır. Isıya dirençli olan *Bacillus stearothermophilus* gibi bazı bakteri sporları için daha yüksek sıcaklık gerekmektedir. Bu sporlar da oda sıcaklığında üreyemediği için sterilizasyon gerçekleşmiş kabul edilmektedir (Dolapçı 2020).

Üçüncü yöntem olan tindalizasyon; yüksek sıcaklıklara dayanamayan sıvı besiyeri, serum, aşı gibi malzemelerin sterilizasyonunda kullanılan yöntemdir. Yüksek sıcaklıklarda bozulabilen bu sıvılar 60 °C ile 100 °C arasında uygun bir sıcaklığa ayarlanmaktadır. 60 °C'de tutuluyorsa üç gün, günde 1 saat; 80-100 °C'de tutuluyorsa üç gün, günde 30 dakika olmak üzere işlem tamamlanmaktadır. Sıvılar bekleme zamanlarında oda sıcaklığında tutulmaktadır (Dolapçı 2020).

2.2.2 Kuru Sıcaklıkla Sterilizasyon

Yüksek sıcaklıkta bozulmayacak metal, cam, yağlı malzemeler gibi suda çözünmeyen materyaller sıcak hava fırınlarında (pasteur fırını) sterilizasyon yapılmaktadır. Mikroorganizmalar üzerinde oksidasyon oluşturularak koagülasyon oluşturmaktadır. Ortamda nem bulunmadığı için etkisi buhar ile sterilizasyon yöntemine göre daha azdır ve uzun süre gerekmektedir. Sporlar nemli ısıda daha kolay yok edilebilmektedir. Ucuz ve kolay bir yöntemdir. Malzemelerin ömrünü kısaltması dezavantajıdır (Pekbay 2005). Tablo 2.2'de kuru sıcaklık ile sterilizasyonda seçilebilecek sıcaklık zaman seçenekleri gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Kuru sıcaklık zaman parametreleri (Pekbay 2005).

Sıcaklık	Zaman
170 °C	1 saat
160 °C	2 saat
150 °C	3 saat
140 °C	4 saat

2.2.3 Düşük Sıcaklıkta Sterilizasyon Yöntemleri

Laparoskop, endoskop, sistoskop, artroskop, diğer rijit optik görüntüleme aletleri ve tüm komplike hassas cihazlarda düşük sıcaklıkla sterilizasyon yöntemleri uygulanması gerekmektedir (Perçin 2012).

2.2.3.1 Etilen Oksitle Sterilizasyon

Isıya ve neme duyarlı hassas tıbbi malzemeleri sterilize etmek için düşük sıcaklıkta (37-55 °C) kullanılan yöntemdir. Özellikle polimer plastik malzemelerde etilen oksit ve türev ürünlerinin atık konsantrasyonu etilen klorohidrin ve etilen glikol, kalıntı olarak kalabilir. Bu nedenle toksik ve kanserojen olmaması için işlemden sonra havalandırma odasında tutulmaktadır. Yayılma özelliği çok güçlü bir gaz olduğu için malzemenin özelliğine bağlı olarak emilebilmektedir. Sentetik, fiberoptik, plastik, lümenli aletlerin sterilizasyonunda kullanılırken bu yöntemle sıvılar steril edilemez. Kalan kalıntılar gaz kromatografisi ve biyolojik indikatör ile belirlenmektedir. Batı ülkelerinde etilen oksit gazı sakıncaları sebebiyle yerini gaz plazma sterilizasyonuna bırakmıştır (Dias ve diğ. 2009).

2.2.3.2 Formaldehitte Sterilizasyon

Formaldehit 19 °C'de kaynayan, suda çözünürlüğü yüksek, renksiz, yanıcı, toksik bir gazdır. Yüksek sıcaklıkta bozulabilecek kumaş, tahta, deri, lastik gibi malzemelerin sterilizasyonunda tercih edilmektedir. 50-80 °C sıcaklık aralığında %60-80 nem oranında işlem tamamlanmaktadır. Etilen oksit ile sterilizasyon yöntemine

göre daha kısa sürelidir fakat penetrasyon gücü düşüktür. Havalandırma işlemi olmasa bile nötralize edilmesi gerekmektedir (Dolapçı 2020).

2.2.3.3 Gaz Plazmayla (H₂O₂) Sterilizasyon

Plazma haline vakum altında verilen enerji ile geçmektedir. Radyo frekans (RF) enerjisi ile kimyasal ajanı iyonize ederek havaya karışmasıyla gaz plazma elde edilmektedir. Serbest radikaller, elektronlar, uyarılmış gaz moleküllerinin bulunduğu bir karışımdır. Neme ve sıcaklığa hassas malzemeler için uygun bir yöntemdir, sıvılara uygulanamaz. Hızlı bir döngüye sahiptir 1 saatte tamamlanmaktadır. Selüloz içermeyen, polipropilen, tyvek, wrap kağıtları gibi paketleme ürünleri kullanılmaktadır (Güven 2007).

2.2.3.4 Gamma Radyasyonula (Işınlama) Sterilizasyon

Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA) tıbbi aletlerin radyasyonla sterilizasyonu için kuralları önermiştir. Gama radyasyonu iyonize edilmiş (<1 nm dalga boyu) radyasyon tipidir. UV ışınlarından (240- 280 nm) daha büyük dalga boyu ve düşük enerji düzeyine sahip oldukları için sterilizasyon işlemi için uygundur. Birimi kGy olarak ifade edilir. Dozun ayarlanması radyasyonun emilimi, ürünün yoğunluğu, ambalaj boyutu, doz hızı, maruziyet süresine göre belirlenmektedir. ISO 11137 standardına göre sterilite güvence düzeyi (SAL) değeri belirlenmektedir. Mikroorganizma molekülleri uyarılmakta veya DNA, RNA yapılarında bağ kırılmaları yoluyla inaktivasyonu gerçekleşmektedir. Otoklav ile sterilizasyonda yüksek sıcaklığa maruz kalamayacak plastik malzemeler, etilen oksit ile sterilizasyon yönteminde zorlu geometriye sahip içerisine hava akımının kolay olmadığı malzemeler gama radyasyonu ile sterilize etmek bir alternatiftir. Gama radyasyon ile sterilizasyonda malzemeler üzerinde kalıntı kalmamaktadır (Özer 2005).

2.2.3.5 Perasetik Asitle Sterilizasyon

Endoskop, artroskop gibi boru sistemlerindeki mikroorganizmaları gidermekte kullanılan bir yöntemdir. Isıya duyarlı cerrahi aletler için kullanılmaktadır. İki dakikada 50 – 56 °C sterilizasyon uygulandıktan sonra steril su ile durulanmaktadır. Toplam işlemin 30 dakikada olması, güvenli ve cerrahi aletlerin çoğuyla uyumlu bir yöntem olması sebebiyle tercih edilmektedir (Günaydın 2020).

2.3 Sterilizasyonun Kullanım Alanları

Sağlık hizmetlerinde merkezi sterilizasyon üniteleri hem steril hem de steril olmayan malzemelerin bulunduğu bu malzemelerin temizlendiği, paketlenildiği, saklandığı bölümlerdir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında da sterilizasyon işlemi önemlidir. Bu alanlarda kullanılan patojen içeren atıkların çevreye zararı olmaması için sterilizasyon işlemi uygulanmaktadır. Gıda endüstrisinde sterilizasyon işleminde hedeflenen tüm mikroorganizmaların yok olması değildir, bu sebeple tıbbi sterilizasyondan ayrılmaktadır (Web Anonim 4 2020).

2.4 Sterilizasyonun Kontrolü

Elektromekanik monitörler, sıcaklık-zaman ve basınç-vakum dedektörlerini ve kayıt çizelgelerini içermektedir. Fiziksel kontrol yöntemleri sıcaklık, basınç, nem, zaman parametrelerini içeren göstergeleri kapsamaktadır. Cihazın kontrolü sağlanmaktadır. Haftada 1 kez vakum kaçak testiyle buhar sterilizatörünün basınç testi yapılmaktadır. Bowie&Dick testi sterilizatörün vakum aşamalarının hızını ve yüke girip girmediğini, doymuş buharın penetrasyonun başarılı olup olmadığını göstermektedir (Günaydın ve Sünbül 2003). Şekil 2.2’de Bowie&Dick testinden elde edilebilecek örnek sonuçlar verilmiştir.



Şekil 2.2: Bowie&Dick testi örneği (Web Anonim 19 2020).

Ancak bu değerler yeterli değildir. Kimyasal kontrol yöntemleri paketin sterilizasyon süresinde maruz kaldığı koşulları göstermektedir. Standart boyutlara sahip bir pakette kimyasal indikatörler sterilizatörün; buhar, sıcaklık, kimyasal gaz gibi etkenlerin ulaşabileceği en zor kısmına yerleştirilmeli ve oluşan renk değişimi yorumlanarak sonuçlar değerlendirilmelidir. Kimyasal kontrol yöntemleri de sterilite hakkında net bilgi vermemektedir. Biyolojik kontrol ise steril ürün kontrolü olarak adlandırılabilir (Soylu 2005).

2.5 Sterilizasyonun Kontrolünde Kullanılan Uluslararası Standartlar

ISO 14937: Sterilizasyon maddesinin özellikleri için genel kurallar ve tıbbi cihazlar için sterilizasyon işleminin geliştirilmesi, geçerliliği ve rutin kontrolü standardını kapsamaktadır. Kapsamı tıbbi cihazlar olmasına rağmen mikroorganizmaların fiziksel veya kimyasal yollarla inaktive edildiği sterilizasyon işlemlerine uygulanır. Mikroorganizmaların seçiminde göz önünde bulundurulması gereken faktörleri kapsamaktadır (Web Anonim 14 2020). ISO 14937 standardına göre seçilebilecek olan mikroorganizmalar Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3: Potansiyel seçilebilecek mikroorganizmalar (Web Anonim 14 2020).

Bakteriyel sporlar	<i>Bacillus atropheus</i> <i>G. stearothermophilus</i> <i>Clostridium sporogenes</i>
Vejetatif bakteri	<i>S. aureus</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Mantar	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Candida spp.</i>
Mikobakteri	<i>Mycobacterium terrae</i>
Zarfsız Virüs	Hepatitis A Parvovirus Pollovirus type 1
Zarflı Virüs	<i>Herpes simplex</i>
Parazit	<i>Cryptosporidium parvum</i>

Mikroorganizmaların seçilmesinde etkin parametreler:

- İyi karakterize edilmiş sterilizasyon işlemlerine karşı dirençli mikroorganizmalar
- Sterilize edilecek ürünün yapım malzemelerinde ve bulunduğu ortamda bulunan mikroorganizmalar
- İşlenecek biyolojik yük tipik ürününün belirlenmesi sırasında izole edilen mikroorganizmalar
- Bir hastanın önceki kullanımının sonucunda yeniden kullanılabilir olması halinde bulunabilecek mikroorganizmalar (Web Anonim 14 2020).

ISO 18472: Sağlık malzemelerinin sterilizasyonunu, biyolojik ve kimyasal indikatörlerin deney donanımlarını kapsamaktadır. Otoklavın sterilizasyon başarısı için kimyasal ve biyolojik indikatör gerekliliklerini içermektedir (Web Anonim 17 2020).

ISO 11138: Sağlık bakım ürünlerinin sterilizasyonu için kullanılan biyolojik indikatörlerin standartlarını içermektedir. Üretim gereksinimlerini etiketleme standardını belirtir. Seçilen sterilizasyon işleminin validasyonu ve kontrolünde kullanılan biyolojik indikatörlerin test etme koşullarını belirlemektedir. ISO 11138-3 standardına göre test mikroorganizmaları *G. stearothermophilus* veya eşdeğer mikroorganizma suşları olacaktır. Termofilik mikroorganizmaların inkübasyon sıcaklığı 55-60 °C, mezofilik mikroorganizmalarınki 3-37 °C arasındadır. 11138-1 ve 11138-3 tarafından belirtildiği gibi D değerleri Stumbo-Murphy-Cochran veya Spearman-Karber yöntemiyle hesaplanır. D değeri: koloni oluşturan birimlerin doğrudan sayılmasıyla hayatta kalan test organizmalarının sayısını belirtmektedir (Web Anonim 15 2020).

ISO 11140: Kimyasal indikatörlerin standartlarını içermektedir. Tek parametrelili indikatörler, çok parametrelili indikatörler, entegratörler ve emülasyon indikatörleri olarak kimyasal indikatörleri sınıflandırmıştır. Sterilizasyon sürecinde paketlenme aşamasında kullanılan kimyasal indikatörlerin standartlarını içermektedir (Web Anonim 16 2020).

ISO 17665: Tıbbi cihazlar için nemli ısı ile sterilizasyon işleminin geliştirilmesi, geçerliliği ve rutin kontrolü için gereksinimleri belirtmektedir (Web Anonim 18 2020).

ISO 14161: Sonuçların seçimi, kullanımı ve yorumlanması için kılavuz sterilizasyon işlemlerinin rutin kontrolünde kullanılan biyolojik indikatörlerin uygulanmasından elde edilen sonuçların seçimi, kullanımı ve yorumlanmasına kılavuzluk etmektedir (Web Anonim 19 2020).

3. STERİLİZASYONUN KONTROLÜNDE KULLANILAN İNDİKATÖRLER

3.1 Kimyasal İndikatörler

Kimyasal göstergeler, maruziyetin zaman-sıcaklık değerini entegre etmek, belirli bir sıcaklığın elde edilip edilmediğini belirlemek, buhar nüfuzunun tek tip olup olmadığını belirlemek veya hangi ambalajların işlendiğini ve hangilerinin işlenmediğini ayırt etmek için kullanılmaktadır (Ward 1991).

Kimyasal indikatörler ISO 11140 sağlık malzemelerinin sterilizasyonu kimyasal indikatörler standardına göre 6 kategoriye ayrılmıştır:

- Sınıf I işlem indikatörleri: Paketin sterilizasyon işlemine girip girmediği hakkında bilgi vermektedir.
- Sınıf II Spesifik testlerde kullanılan indikatörler: Bowie & Dick testi buhar sterilizastöründe buharın penetrasyonu hakkında dağılımı test etmektedir.
- Sınıf III Tek değişkenli indikatörler: Zaman veya sıcaklık gibi tek parametrelili göstergeleri elde etmek için kullanılmaktadır.
- Sınıf IV Çok değişkenli indikatörler: İki ve daha fazla fiziksel kontrol yöntem parametrelerinin 2 °C değişimini ve bu değişimde oluşan %0-25 farklılığı göstermektedir.
- Sınıf V Entegratörler: Çok değişkenli indikatörlere göre farkı 1 °C düşüşü ve %0-15 farklılığı renk değişimli ya da ilerlemeli şerit şeklinde göstermektedir.
- Sınıf VI Emülasyon indikatörleri: 1 °C düşüşü ve test edilen parametredeki %0-6 farkı gösterebilmektedir. Sterilizasyonun çeşidine ve süresine göre özel üretilmekte olup, buna uygun test seçilmelidir (Web Anonim 16 2020).

3.2 Biyolojik İndikatörler

Biyoindikatörler, belirli bir sterilizasyon işleminde kullanılan ve dayanma gücü olan canlı mikroorganizmalar içeren kalitatif test sistemidir. Biyoindikatörler, bir sterilizasyon işleminde belirli koşulların sağlanıp sağlanmadığıyla ilgili güven seviyesi sağlar. Biyolojik göstergeler, sterilizasyon döngüsüne oldukça dayanıklı bakteri sporları seçilerek işlevini gerçekleştirmektedir. Bu biyolojik göstergeler, sporları çoğaltarak ve büyüme ortamındaki asit metabolitlerinin üretimini ölçmek için bir pH göstergesine dayanır. Spor emdirilmiş kâğıt şeritler, kendinden besiyerli kapalı sistemler ve enzim bazlı biyolojik indikatörler olarak 3 çeşit biyolojik indikatör üretilmektedir. Biyolojik indikatörlerin ilk çeşidi, zarfların içinde aşılınmış kâğıt şeritler şeklindedir bunlar sterilizasyon işleminden sonra steril kültür ortamına aktarılır ve 7 gün süreyle inkübe edilir. Yeni bir sterilizasyon yöntemi için 7 günlük bir referans inkübasyon süresini desteklemek için yeterli veri bulunmadığında, doğrulamanın dayandırılacağı referans inkübasyon süresi olarak en az 14 gün kullanılmaktadır. Bu yöntemde indikatör kâğıtları rulo şeklinde saklanarak yüksek kalite filtre kâğıtlarından oluşmaktadır. Test kâğıtları; ışık, nem, ve ortam havası gibi dış etkenlerden korunmuş olur. Kovalent bağ ile bağlanan reaktif kâğıt sayesinde indikatör boyalarında renk değişimi olmaktadır. İndikatör kâğıtlarındaki boya 3-5 yıl dayanıklı olduğu için bekleme durumunda kontaminasyon riskine neden olmaz (Shintani 2011, Pflug ve Odlaug 1986).

İkinci çeşit biyolojik indikatörler gerekli bakteri sporlarını ve büyüme ortamını içeren bağımsız sistemlerdir. Sterilizasyon sonrası, bir tüpün içerisinde iki sistemin karışması sağlanarak sonuç elde edilmektedir. Sporları çoğaltarak ve hücreleri kopyalayarak büyüme ortamındaki asit metabolitlerinin üretimini ölçen biyolojik göstergeler, pH ölçümüne dayanır. Bu sistemle birlikte, birinci olarak açıklanan kâğıt şeritlere kıyasla kontaminasyon sorununu ortadan kaldırır, ancak hayatta kalan sporların tespiti için 24-168 saat okuma süresi gerekmektedir. Üreme tespit sistemine göre değişmekle birlikte yaygın olarak 1-48 saat içinde sonuç alınmaktadır. Bakteri sporları ve büyüme ortamını içeren bu tüp spektrofotometrik yöntemle okunarak, renk değiştiren besiyerinin tespit süresi kısaltılmıştır. Günümüzde en hızlı sonuç veren ve enzim

aktivitesini tespit eden biyoindikatörlerde, 1 saatte sonuç alınmaktadır. Enzim aktivitesi sayesinde daha kısa inkübasyon süreleriyle tespit edilebilen biyolojik kalıntı, enzim tabanlı algılama sistemleri sayesinde tespit edilerek bu süre kısaltılmıştır. Standart yöntemler ile 24 saatte sonuç alınırken, enzim aktivitesi ile bu süre 1-4 saatte yapılabilmektedir. Florimetrik okuma yöntemi sayesinde ise floresan vermeyen maddeyi floresan verir hale getiren alfa-glukozidaz veya alfa-galaktozidaz aktivitesi okunmaktadır. Floresans veren substratların kullanıldığı ve floresansın otomatik okuyucu tarafından okunduğu yöntemdir. Biyolojik indikatörlerde sonuç almak için uzun inkübasyon zamanı gerekmektedir. Bu problem, 1 saat gibi kısa sürede floresan vermeyen bir maddeyi floresan verir hale getiren spor enzimlerinden alfa-glikozidaz ile çözülmüştür (Web Anonim 18 2021, Rutala ve diğerleri 1996, Albert ve diğ. 1998, Web Anonim 17 2020, Web Anonim 16 2021, Web Anonim 15 2020).

Bazı bakteriler, buldukları ortamın şartları bozulduğunda (ısı, kuruluk, toksik maddeler) kendilerini korumak için endospor oluşturmaktadır. Şekilleri oval veya yuvarlıktır. Bakteriyel sporlar sıcaklık, kimyasal maddeler ve zamana karşı direnç gösterebilmektedir. Sporulasyon ismi verilen bu olayda bakteriler kendi kendini koruma stratejisi göstermektedir. Spor hareketsiz bir formdadır ve bu durumda yıllarca bekleyebilmektedir. Sporlar çok hafif oldukları için hava akımıyla toz partiküllerine tutunarak taşınabilmektedir. Uygun şartlar sağlandığında tekrar çimlenerek bakteriye dönüşmektedir. Tüm bakteriler spor oluşturamaz ve biyolojik indikatör seçiminde zorlu koşullara en dirençli olanlar tercih edilmektedir. Spor oluşumu *Bacillaceae* familyasının bir özelliğidir, çubuk şeklinde gram pozitif bakterilerdir. *Geobacillus*, *Bacillus* ve *Clostridium* spp. yaygın olarak biyolojik indikatör üretiminde kullanılan türlerdir. *Geobacillus* ve *Bacillus* aerobik, *Clostridium* spp. anaerobik bir türdür. ISO 11138 standardında ayrıntıları belirtilmiştir. Her indikatörün üzerinde içerdiği bakteri tipi, koloni sayısı, üretim numarası bulunmalıdır. Endospor bulundurmeyen hücreye vejetatif hücre denir (Web Anonim 15 2020).

3.2.1 *Geobacillus stearothermophilus*

Kalın hücre duvarlı, termofilik ve çubuk şeklinde, aerobik ya da fakültatif anaerobik solunum yapan, gram pozitif bir bakteridir. Sıcak su kaynaklarından, havadan veya konserveden izole edilmektedir. Islak ortamda üreme dirençleriyle birçok bakteriden ayrılmaktadır. *G. stearothermophilus* sporları o kadar dirençlidir ki etilen oksit, buharlı, hidrojen peroksit ve yüksek basınçlı buhar kullanan sterilizasyon sistemlerinde kullanılmaktadır. Agar konsantrasyonu ve pH parametreleri sıcaklığa direnci artırmaktadır. Bu yüzden *G. stearothermophilus*, buhar sterilizasyonu için biyolojik bir gösterge olarak kullanılmaktadır. 30-75 °C aralığında dayanıklıdır. Optimum büyüme sıcaklığı 55-65 °C olan termofilik bir bakteridir (Akkaya ve Kıvanç 2008). D değeri ölçümleri aynı koşullar altında gerçekleştirilmelidir. Sporulasyon sırasındaki pH, besin maddeleri, sıcaklık, nem gibi parametrelerin D ve z değerlerini etkilediği bilinmektedir (Ridgeway 2020).

3.2.2 *Escherichia coli*

E. coli basil, gram negatif, sporsuz, hareketli bir bakteridir. Fakültatif anaerob ve aerob olup 4-45 °C aralığında üreyebilmektedir (Web Anonim 6 2020). Genellikle insan ve hayvan bağırsaklarında olmakla birlikte her ortamda bulunabilmektedir. Hastanede üriner sistem kateterizasyonu işlemi gerçekleştirilirken enfeksiyona neden olabilir. *E. coli* glukozdan asit ve gaz yaparak ekildiği besiyerlerinde kolay renk değişimi oluşturmaktadır. Nişastadan gaz oluşturmaz (Telekoğlu 2019).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1 Gereçler

4.1.1 Kullanılan Besiyerleri

4.1.1.1 Tryptic Soy Broth

Tablo 4.1: Tryptic soy broth bileşimi (Web Anonim 8 2020).

Bileşen Adı	Miktarı
Peptone	23,0 g/L
Peptone from soymeal	3,0 g/L
D(+) Glucose	2,5 g/L
NaCl	5,0 g/L
K ₂ HPO ₄	2,5 g/L

Tryptic soy broth hazır besiyeri içeriği Tablo 4.1’de açıklanmıştır. Tryptic soy broth hazır besiyerinden 15 g, brom cresol purple 0.08 g tartılarak 500 ml saf su içerisinde çözdürülmüş ve çözeltinin pH değeri 7.5 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra eklenen maddeler mikrodalga fırında tamamen eritilerek, otoklavda 121 °C’da 15 dakika sterilize edilmiştir. Bu işlemler brom cresol purple yerine 0.08 g phenol red koyularak tekrarlanmış, toplamda sekiz tüp steril besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri mezür ile ölçülerek 10 mL ölçülerinde tüplere koyulmuştur. Besiyerinin rengi berrak sarımsı renkte olup, 25 °C’de pH değeri 7,3±0,2’dir. Tablo 4.2’de tryptic soy broth kalite kontrolünde seçilebilecek mikroorganizmalar verilmiştir.

Tablo 4.2: Tryptic soy broth kalite kontrol (Web Anonim 8 2020).

Test mikroorganizmaları	Gelişme	Test mikroorganizmaları	Gelişme
20-25 °C'da 3 gün inkübasyon		35 °C'de 24 saat inkübasyon	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	<i>E. coli</i> ATCC 8739	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	+
<i>S. aureus</i> ATCC 12228	+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+
20-25 °C'da 5 gün inkübasyon		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	+	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	+
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	+		
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	+		

4.1.1.2 Tryptic Soy Agar

Tablo 4.3: Tryptic soy agar bileşimi (Web Anonim 9 2020).

Bileşen Adı	Miktarı
Peptone from casein	15,0 g/L
Peptone from soymeal	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L
NaCl	5,0 g/L

Tryptic soy agar hazır besiyeri içeriği Tablo 4.3'te açıklanmıştır. Saf su içerisinde 40 g/L olacak şekilde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyerinin rengi berrak ve sarımsı kahve renktedir. 25°C'de pH değeri

7,3±0,2'dir. Tablo 4.4'te tryptic soy agar kalite kontrolünde seçilebilecek mikroorganizmalar verilmiştir.

Tablo 4.4: Tryptic soy agar kalite kontrol (Web Anonim 9 2020).

Test mikroorganizmaları	Ekim(kob/mL)	% Geri kazanım
<i>E. coli</i> ATCC 8739	10 ³ - 10 ⁵	≥ 70
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ³ - 10 ⁵	≥ 70
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 21059	10 ³ - 10 ⁵	≥ 70
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 ³ - 10 ⁵	≥ 70
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ³ - 10 ⁵	≥ 70
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	10 ³ - 10 ⁵	≥ 70

4.1.1.3 Brain Heart Broth

Tablo 4.5: Brain heart bileşimi (Web Anonim 10 2020).

Bileşen Adı	Miktarı
Nutrient Substrate	27,5 g/L
D(+) Glucose	2,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Na ₂ HPO ₄	2,5 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Brain heart broth hazır besiyeri içeriği Tablo 4.5'te açıklanmıştır. 7.4 g brain heart infusion hazır besiyeri , 3.84 g nişasta, 0.032 g phenel red 200 mL distile suda manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Aynı işlem nişasta yerine 3.84 g glukoz eklenerek tekrarlanmıştır. Besiyerinin rengi berrak ve kahverengidir. 25 °C'de pH

değeri $7,4 \pm 0,2$ 'dir. Tablo 4.6'da brain heart broth kalite kontrolünde seçilebilecek mikroorganizmalar verilmiştir.

Tablo 4.6: Brain heart broth kalite kontrol (Web Anonim 10 2020).

Test Mikroorganizmaları	İnkübasyon	Atmosfer	Gelişim
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	35 °C/ 24 s	aerobik/ anaerobik	iyi/ çok iyi
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	35 °C/ 24 s	aerobik/ anaerobik	iyi/ çok iyi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	35 °C/ 24 s	aerobik	iyi/ çok iyi
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	35 °C/ 48 s	aerobik	iyi/ çok iyi
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	35 °C/ 2-5 g	anaerobik	iyi/ çok iyi
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	35 °C/ 2-5 g	mikroaerofilik	iyi/ çok iyi
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35 °C/ 24 s	aerobik	iyi/ çok iyi

4.1.1.4 Plate Count Agar

Plate count agar hazır besiyeri içeriği Tablo 4.7'de açıklanmıştır

Tablo 4.7: Plate count agar bileşimi (Web Anonim 11 2020).

Bileşen Adı	Miktarı
Peptone from casein	5,0 g/L
Yeast extract	2,5 g/L
D(+) Glucose	1,0 g/L
Agar-agar	14,0 g/L

Tablo 4.8: Plate count agar kalite kontrol (Web Anonim 11 2020).

Test mikroorganizmaları	Ekim (kob/mL)	% Geri kazanım
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	103-105	≥ 70
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	103-105	≥ 70
<i>Lactococcus lactis</i> spp. ATCC 19435	103-105	≥ 70
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	103-105	≥ 70
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	103-105	≥ 70
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	103-105	≥ 70
<i>E. coli</i> ATCC 11775	103-105	≥ 70

Tablo 4.8’de plate count agar kalite kontrolünde seçilebilecek mikroorganizmalar verilmiştir. Saf su içerisine 22.5 g/L ölçülerinde koyulur, ısıtılarak eritilir. Otoklavda 15 dakika 121 °C’de sterilize edildikten sonra pH değeri 25 °C’de 7,0±0,2 ölçülmüştür.

4.1.1.5 Maximum Recovery Diluent

Maximum recovery diluent içeriği Tablo 4.9’da açıklanmıştır. Tablo 4.10’da ise kalite kontrolünde seçilebilecek mikroorganizmalar verilmiştir.

Tablo 4.9: Maximum recovery diluent bileşimi (Web Anonim 12 2020).

Bileşen Adı	Mikarı
Peptone	1,0 g/L
NaCl	8,5 g/L

Tablo 4.10: Maximum recovery diluent kalite kontrol (Web Anonim 12 2020).

Test Mikroorganizmaları	Oda sıcaklığında belirli süre sonunda koloni sayımı*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0; 2; 4; 6 saat
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	0; 2; 4; 6 saat

*: Test organizmaları, Maximum recovery diluent tüpüne eklendikten sonra t p, oda sıcaklığında (20-25 C) bekletilir. 0; 2; 4; 6. saatlerde sayım yapılır.

Saf su içerisinde 9.5 g/L ölçülerinde hazırlanmıştır. 121  C 15 dakika sterilize edildikten sonra pH değeri 25  C'de $7,0\pm 0,2$ ölçülmüştür.

4.1.1.6 Enerji Kaynaklarının Seçimi

Hazırlanan TSB 125 mL olarak dörde ayrılmıştır. 125 mL olarak ayrılan dört beherdeki karışımın birincisine 1.2 g nişasta, ikincisine 1.2 g glukoz, üçüncüsüne, 1.2 g nişasta, dördüncüsüne 1.2 g glukoz eklenerek manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir.

4.1.1.7 Nişasta Solüsyonu

Nişasta (Sigma S9765-1KG) besiyerileri hazırlandıktan sonra besiyerlerinin içerisine 4.2 gram eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra tüplere aktarılmış ve 121  C'de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanmıştır.

4.1.1.8 Glukoz Solüsyonu

Glukoz (Sigma 158968-1KG) besiyerileri hazırlandıktan sonra besiyerlerinin içerisine 4.2 g eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra tüplere aktarılmış ve 121  C'de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanmıştır.

4.1.1.9 İndikatörler

4.1.1.9.1 Phenol Red

7.4 ± 0.2 pH değerine sahiptir. Bu çalışmada 1 litre distile su için 0.16 g phenol red kullanılmıştır.

4.1.1.9.2 Brom Cresol Purple

7,0±0,2 pH değerine sahiptir. Bu çalışmada 1 litre distile su için 0.16 g brom cresol purple kullanılmıştır.

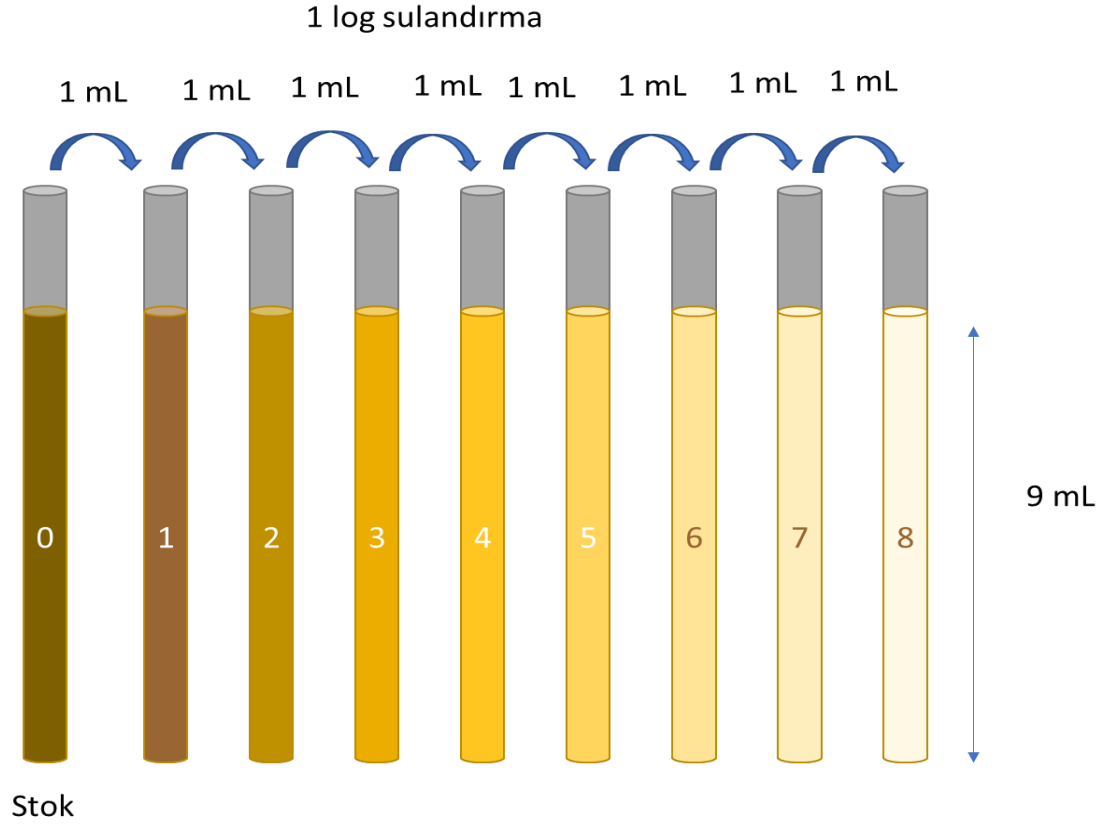
4.1.2 Bakterinin Canlandırılması ve Gücünün Saptanması

-20 °C’de stoklanmış loop kültürlerden BHI broth içerisine aktararak uygun inkübasyon sıcaklığında bir gece tutulmuş ve seri dilüsyonlar halinde sayım yapılmıştır. Hazırlanan besiyerleri için kullanılan malzeme oranları Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11: Besiyeri malzeme oranları.

İçindeki maddeler	Miktarlar mg/100 mL	Miktarlar mg/100 mL	Miktarlar mg/100 mL	Miktarlar mg/100 mL
	Besiyeri 1	Besiyeri 2	Besiyeri 3	Besiyeri 4
TSB	7.5 g	7.5 g	7.5 g	7.5 g
Glukoz	1.2 g	1.2 g	1.2 g	1.2 g
Nişasta	1.2 g	1.2 g	1.2 g	1.2 g
Phenol red	0.04 g	0.04 g	0.04 g	0.04 g
Brom creosol purple	0.04 g	0.04 g	0.04 g	0.04 g

Bakterinin gücü saptanırken seri dilüsyonlar yapılarak 10 ve güçleri halinde azaltarak hesap yapılmıştır. 10^8 'den başlanıp, 10^1 azaltılarak giden bu seyreltme işlemi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



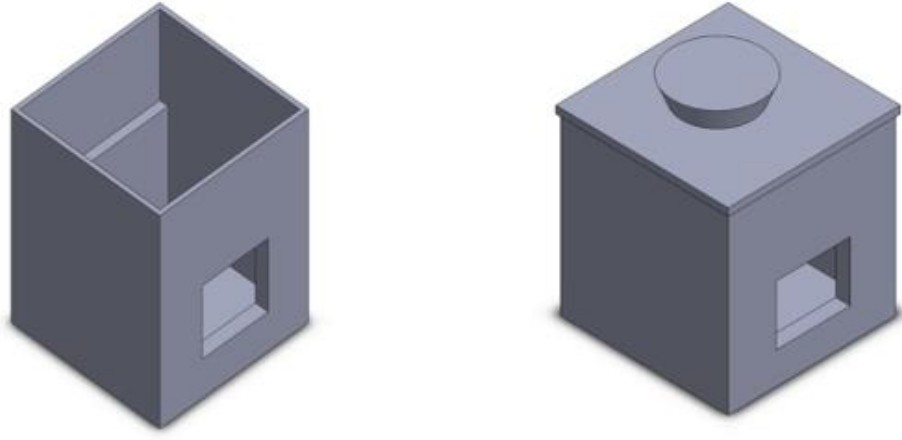
Şekil 4.1: Dilüsyon şeması.

4.1.3 Süre ve Renk İlişkisinin Kurulması

Farklı enerji kaynakları ve farklı renk indikatörleri eklenerek hazırlanan brothlar içerisine ISO 13485 uygun olacak şekilde düşük, orta ve yüksek seviyelerde bulaştırma yapılmıştır. Düşük bulaştırma için 10-99 kob/mL, orta için 100-999 kob/mL, yüksek için 1000-9999 kob/mL aralığında kalacak şekilde bulaştırma yapılmıştır. Buna bağlı olarak renk değişimi görsel ve takiben cihaz ile ölçülmüştür (Web Anonim 13, 2020).

4.1.4 Biyoindikatör Tespit Düzenegini

Tespit aşamasında yerleştirilecek olan eppendorf tüp için tasarlanan kutu Şekil 4.2'deki gibi üç boyutlu yazıcıdan yazdırılmıştır. Kutunun boyutları 70x70x70 cm, orta kısma yerleştirilen renk sensörünün boyu 6.6x6.6 cm olarak ayarlanmıştır. TCS3200 renk sensörü orta kısımdaki bu boşluğa yerleştirilmiştir. Kapak boyu 7.5x7.5 cm, kapağın alt kısmı ise 6.59x6.59 cm olarak tasarlanmıştır. Kapağın alt kısmı için 1.2 cm çapında eppendorf tüp girişi ayarlanarak üç boyutlu yazıcıdan basılmıştır.



Şekil 4.2: Renk sensörü ve eppendorf tüpün yerleştirildiği kutu.

Arduino kartları bir mikrodenetleyiciyi desteklemek için gereken elektronik bileşenleri içeren küçük devre kartlarıdır. Şekil 4.3'te kullanılan Arduino Uno gösterilmiştir. Arduino Uno USB kablosuyla bilgisayara bağlanarak 5V çalışma gerilimiyle sensöre güç sağlamaktadır. ATmega328-pu entegre sayesinde arduino istenilen programlamayla kontrol edilmektedir. Tavsiye edilen besleme gerilimi 7-12V aralığındadır. 16 MHz hızında çalışır, 2 KB belleğe sahiptir. Arduinodaki pinleri kontrol etmek için Arduino bilgisayara bağlanmaktadır. 14 dijital giriş/çıkış pini bulunur, bunlardan 6'sı PWM çıkışı olarak kullanılabilir. ICSP başlığı ve reset butonu vardır (Web Anonim 1 2020).



Şekil 4.3: Arduino Uno R3 kartı (Web Anonim 5 2020).

Renk sensörlerinde en kullanışlı olan renk uzayı RGB (red, green, blue) ana renklerinin birleşimi ile oluşmuştur. Görme işlemi ortamda ışık bulunduğunda, bir cisimden yansıyan ışığın gözün saydam tabakasında kırılmasından sonra göz bebeğine gelmektedir. Göz bebeğine gelen ışık miktarı göz merceğinde bir kez daha kırılarak ağ tabakada bulunan sarı benek üzerine düşmektedir. Daha pek çok ayrıntının bulunduğu görme olayında renk sensörün çalışma prensibi benzerdir. Deney aşamasında kullanılan TCS3200 renk sensörü Şekil 4.4’te verilmiştir. TCS3200 renk sensöründeki 4 adet beyaz LED ile cisme ışık gönderir, bu ışıklar cisme çarparak geri yansımaktadır. Sensör yansıyan ışınları değerlendirerek renk büyüklüklerini belirlemektedir (Web Anonim 2 2020).

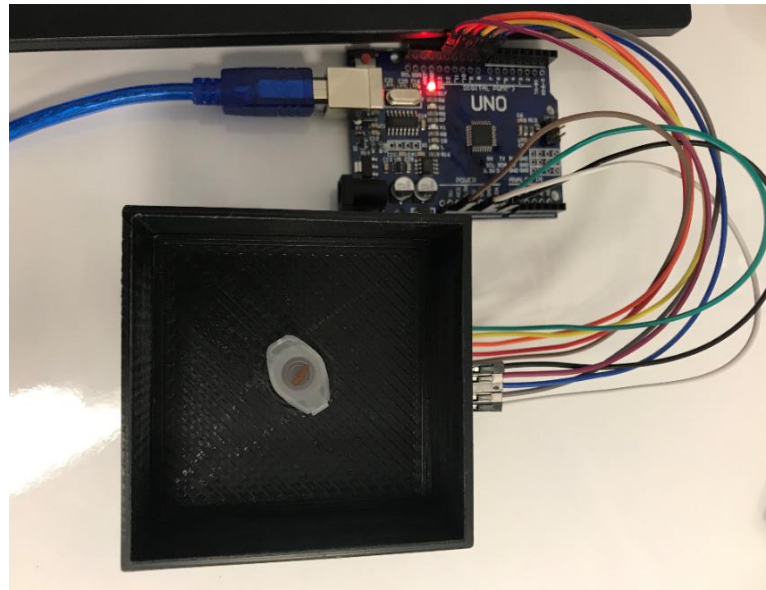


Şekil 4.4: TCS3200 renk sensör kartı (Web Anonim 5 2020).

TCS3200 renk sensörü fotodiyotlar ve akım frekans dönüştürücü sayesinde verileri oluşturmaktadır. Dört adet giriş ve bir adet çıkış pini bulunmaktadır. Gelen ışığın şiddetiyle doğru orantılı bir kare dalga üretilir ve bu kare dalgayı kullanarak veri alınmaktadır. Sensör renkleri fotodiyotların üzerindeki filtreler sayesinde ayırt etmektedir. Sensörde 8×8 diziminde bulunan fotodiyotların 16'sı mavi, 16'sı kırmızı, 16'sı yeşil filtreye sahip, geriye kalan 16 fotodiyotta ise filtre bulunmamaktadır. Bu fotodiyotların renk bilgisini kontrol etmek için S2 ve S3 pinleri kullanılmıştır. S0 ve S1 uçlarından gelen frekans değerlerinde renk bilgisi işlenmiş olmaktadır. TCS3200 renk sensöründe pinlerin frekans ölçeği Tablo 4.12'de gösterilmiştir. RGB renk uzayında veriler 0 ile 255 arasında elde edilir. Örneğin 255-0-0 kırmızıyı ifade etmektedir (Web Anonim 2, 2020). Renk sensöründen elde edilecek sonuç için Arduino IDE uygulamasında kodlar yazıldı (bkz. Ek A).

Tablo 4.12: Pinlerin renklere göre durumu (Web Anonim 2, 2020).

S0	S1	Çıkış Frekans Ölçeği	S2	S3	Fotodiyot Tipi
Low	Low	Kapalı	Low	Low	Kırmızı
Low	High	2%	Low	High	Mavi
High	Low	20%	High	Low	Filtresiz
High	high	100%	High	High	Yeşil



Şekil 4.5: Eppendorf tüplerden renk tespiti yapılan deney düzeneğinden görünüm.

Şekil 4.5'te deney aşamasından bir görüntü verilmiştir. Üretilen biyoindikatörler eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra 37 °C ve 55 °C etüve yerleştirildi. 2 saatte bir etüvden çıkarılarak Şekil 4.5'teki kutuya yerleştirildi ve okuma sonucu bilgisayar ekranından alındı.

4.2 YÖNTEM



Şekil 4.6: Yapılan işlemlerin akış şeması.

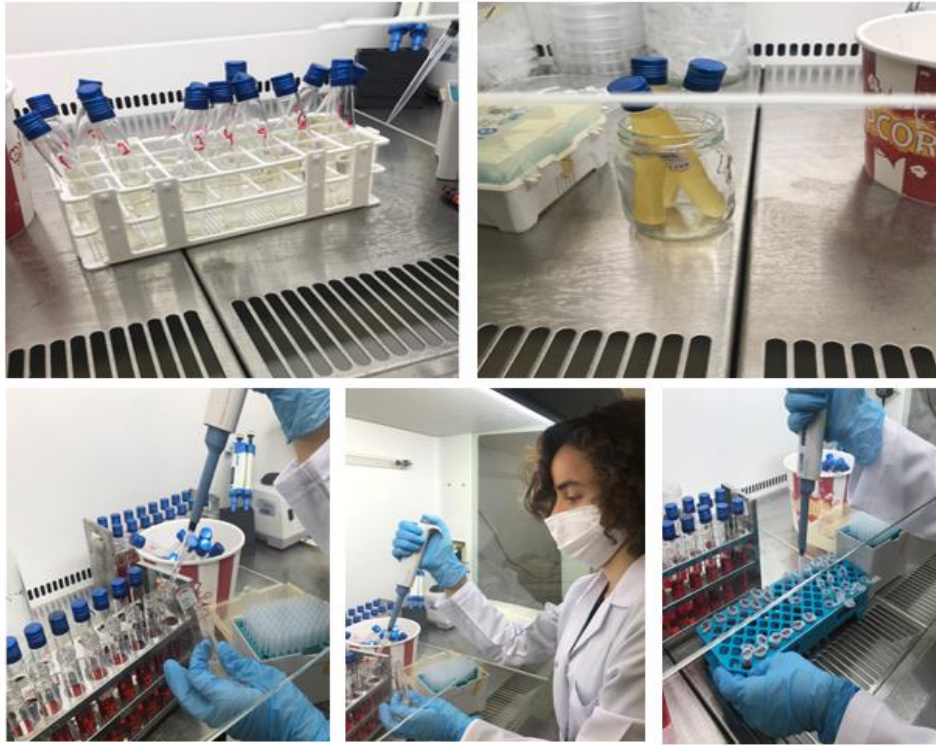
Bu çalışma üç aşamadan oluşmuştur. Aşamalar ayrıntılarıyla Şekil 4.6'da bölümlere ayrılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, kullanılan besiyerlerinin hazırlanması tamamlanmıştır. İkinci aşamasında bakterinin canlandırılması gerçekleştirilmiştir. Üçüncü aşamada, biyoindikatörün sterilizasyon başarısı tespit düzeneğinde test edilmiştir. Çalışmada aerob, aneorob olarak seçilen bakterilerin sterilizasyonda verdiği cevap ISO 11138 standardına göre belirlenmiştir. Termofilik bakteri olarak *G. stearothermophilus*, mezofilik bakteri olarak *E. coli* kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler ATCC kültür koleksiyonundan edilmiştir.

Tryptic soy broth, brain heart broth uygun ölçülerde hassas terazide tartılarak cam beherdeki saf suya eklenmiştir. Daha sonra nişasta, glukoz ve uygun renk indikatörü eklenerek manyetik karıştırıcıda beş dakika karıştırılmıştır. Mikrodalga fırında iki dakika ısıtılarak tamamen homojenize olması sağlanmıştır. Ağız kapalı cam tüplere koyularak besiyerlerinin sterilizasyonu sağlanmıştır.

Besiyerlerinin sterilizasyonu gerçekleştirildikten 24 saat sonra steril kabinde, 10 mL lulerinde mikropipet ile bakteri ekimi gerçekleştirildi. Şekil 4.7’de ekim esnasındaki örnek görüntüler verilmiştir. *G. stearothermophilus* 55 C, *E. coli* 37 C etvlere yerleştirildi. 2, 4, 6, 8, 24. saatlerde renk takibi yapılarak üreme kontrol edilmiştir.

Tryptic soy agar, plate count agar uygun ölçülerde tartılarak saf suyun olduğu cam tüpe eklenmiştir. Homojenize etme işlemleri tamamlandıktan sonra otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. UV işınları ile sterilize kabinde 50 C olması beklenecek, petri kutularına dökülerek kurumaya bırakılmıştır.

Maximum recovery diluent saf su içinde uygun ölçülerde hazırlanmıştır. Otoklavda sterilizasyon işlemi tamamlandıktan 24 saat sonra dispenserle vidalı kapaklı tüplere dağıtılmıştır ve bakteri sayımında kullanılmıştır.

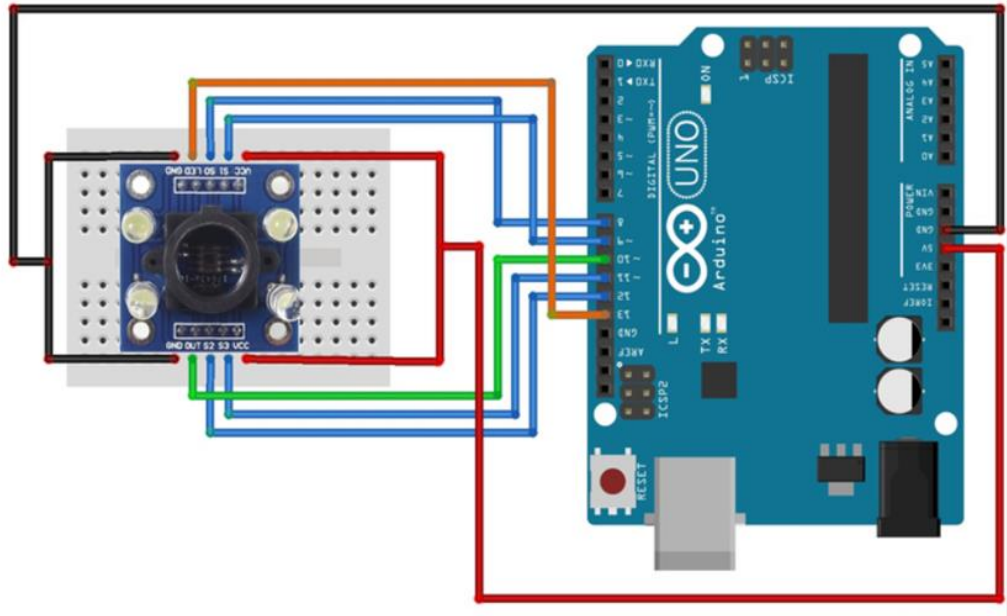


Şekil 4.7: Optik donanımda okumak üzere örneklerin hazırlanması.

4.2.1 Biyoindikatör Tespit Düzenine Hazırlanması

Sterilizasyonun gerçekleştiğinin tespiti donanımsal olarak Arduino Uno ve TSC3200 renk sensörüyle sağlanmıştır. Arduino sketch programına yüklenen kodlarla istenilen saatte değişen renk tonu incelenmiştir. Elde edilen 0 ile 255 arası değerler renk yüzdesi şeklinde elde edilerek renk sonucu ekrandan alınmıştır. Renk sensöründeki VCC ucunu board üzerinden Arduino'nun 5V girişi sensördeki VCC girişlerine, arduinodaki GND ucu sensördeki GND uçlarına, S0, S1, S2, S3'ü sırasıyla 8,9,11,12. pin girişlerine ve OUT ucu 10. pin girişine bağlanmıştır. Bağlantı şeması görsel olarak Şekil 4.8'de verilmiştir.

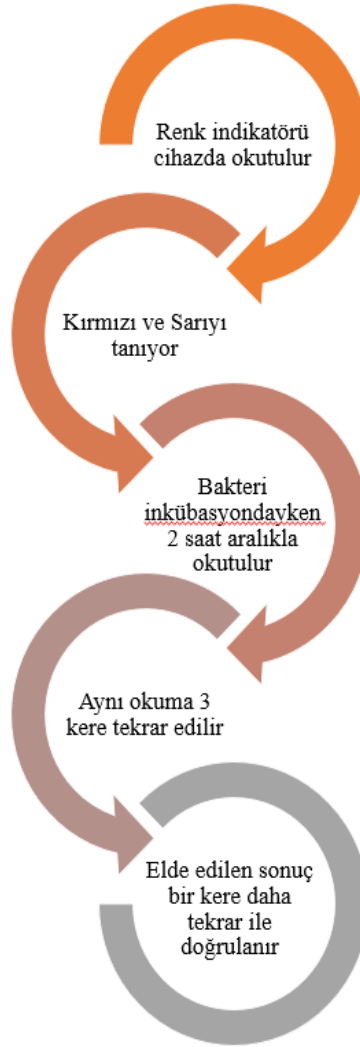
Biyoindikatörlerin renk dönüşümünü doğru ve hızlı tespit edebilmek için TCS3200 renk sensörü kullanılmıştır. Renk sensörü tasarlanan kutuya yerleştirilmiştir. Renk sensörü, saatlik olarak yerleştiren eppendorf tüplerin rengini algılayarak seri port üzerinden bilgisayara aktarmaktadır.



Şekil 4.8: Arduino Uno ile renk sensörünün bağlantı şeması.

4.2.2 Validasyon ve Verifikasyon

Cihazın validasyonunda ISO 13485 standardına uygun olacak şekilde kör okumalar ve düşük, orta ve yüksek seviyede bulaştırma yapılmış örnekler ile okuma yapılmıştır. İlk aşamada renk indikatörleri cihaza tanıtılmış ve kırmızı ve sarı renk değişimlerini tanınması sağlanmıştır. Bu amaçla yapılan analizde pozitif kontrol olarak 10 adet kırmızı ve 10 adet sarı, negatif kontrol olarak 10 adet mor okutulmuştur. Takiben bakterinin inokulasyon seviyesine göre değişim 2 saatte bir ölçülmüştür. Bu aşamada aynı örnek 3 kere okutulmuş ve hepsinde aynı sonuç alınması hedeflenmiştir. Tüm örnekler iki paralelli çalışmıştır. Bu çalışmanın akışı Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9: Validasyon verifikasyon çalışması.

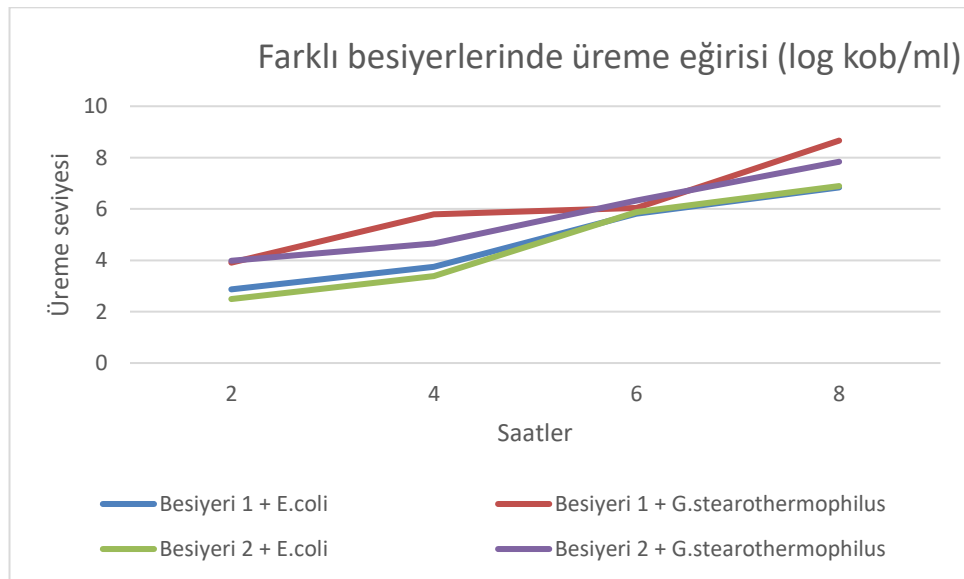
5. BULGULAR

Bu çalışmada biyoindikatörlerin hızlı şekilde cevap vermesine yönelik bir sistem dizayn edilmiştir. Bu amaçla iki farklı bakteri, iki farklı besin kaynağı ve iki farklı indikatör ile tespit yapılması istenmiştir.

Bu amaçla farklı indikatörler ve farklı şekerlerin olduğu besiyerlerine *G. stearothermophilus* ve *E. coli* eklenmiştir. Ekimleri takiben 2, 4, 6, 8. saatlerde kontrol edilmiştir. Ölçüm sonuçları Tablo 5.1’de gösterilmiştir. Üremenin grafiği ise Şekil 5.1’deki gibidir.

Tablo 5.1: Farklı besiyerlerinde saatlere göre bakterilerin üreme sayıları (\log_{10} kob/mL)

Kontrol saatleri	Besiyeri 1 + <i>E. coli</i>	Besiyeri 1 + <i>G. stearothermophilus</i>	Besiyeri 2 + <i>E. coli</i>	Besiyeri 2 + <i>G. stearothermophilus</i>
2	2,869232	3,908485	2,491362	3,982271233
4	3,748188	5,78533	3,380211	4,653212514
6	5,819544	6,041393	5,875061	6,322219295
8	6,838849	8,662757832	6,892095	7,838849091



Şekil 5.1: Üreme eğrisi.

Tablo 5.2: Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

Bakteri	İndikatör	Enerji kaynağı	2.saat	4.saat	6.saat	8.saat	24.saat
<i>E. coli</i>	PR	Nişasta	-	+	+	+	+
		Glukoz	-	+	+	+	+
	BCP	Nişasta	-	+	+	+	+
		Glukoz	-	+	+	+	+
<i>G. stearothermophilus</i>	PR	Nişasta	-	+	+	+	+
		Glukoz	-	+	+	+	+
	BCP	Nişasta	-	-	-	-	+
		Glukoz	-	-	-	-	+

*: PR: phenol red *:BCP: brom cresol purple

Biyoindikatörde kullanılacak renk indikatör seçimi için yapılan çalışmada kullanılan PR ve BCP arasından hızlı sonuç alan renk indikatörü seçilmiştir. Alınan sonuçlar Tablo 5.2’de gösterilmiştir. PR daha hızlı ve etkili olduğu için seçildikten sonra biyoindikatör üretimine başlanmıştır. Bu üretim sonucunda ise tasarlanan deney düzeneğinde biyoindikatörler optik donanıma okutulmuştur.

Tablo 5.3: Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

Saat	Bakteri adı	Enerji Kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			
			R	G	B	Değerlendirme
0. saat	<i>G. stearothermophilus</i>	Glukoz	38	31	32	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			30	26	35	Pozitif
6. saat			29	29	38	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			29	31	40	Pozitif

*: R: kırmızı *: G: yeşil *: B: mavi

G. stearothermophilus ile yapılan glukoz enerji kaynağı olarak kullanılmış deney setinde RGB değerlerine bakıldığında 4. saat itibariyle pozitif sonuç elde edilmiştir. Buna ait ayrıntılı bilgiler Tablo 5.3'te gösterilmiştir. Şekil 5.2 ve Şekil 5.3'te ise 4. saat için *G. stearothermophilus* içeren indikatör resimleri verilmiştir. 10^8 , 10^7 değerinde ekim yapılan indikatörlerde renk değişimi gözlemlenmiştir.

Tablo 5.4: *G. stearothermophilus* glukoz çözeltisi için optik okuma değerlendirme.

Saat	Bakteri adı	Enerji Kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			Değerlendirme
			R	G	B	
0. saat	<i>G. stearothermophilus</i>	Nişasta	38	30	33	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			32	27	38	Pozitif
6. saat			31	41	41	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			30	24	32	Pozitif

*: R: kırmızı *: G: yeşil *: B: mavi

G. stearothermophilus ile yapılan nişasta enerji kaynağı olarak kullanılmış deney setinde RGB değerlerine bakıldığında 4. saat itibariyle pozitif sonuç elde edilmiştir. Buna ait ayrıntılı bilgiler Tablo 5.4'te gösterilmiştir.

Tablo 5.5: *E. coli* nişasta çözeltilisi için optik okuma değerlendirmesi.

Saat	Bakteri adı	Enerji Kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			
			R	G	B	Değerlendirme
0. saat	<i>E. coli</i>	Nişasta	40	30	28	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			33	27	39	Pozitif
6. saat			29	29	38	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			30	28	36	Pozitif

*: R: kırmızı *: G: yeşil *: B: mavi

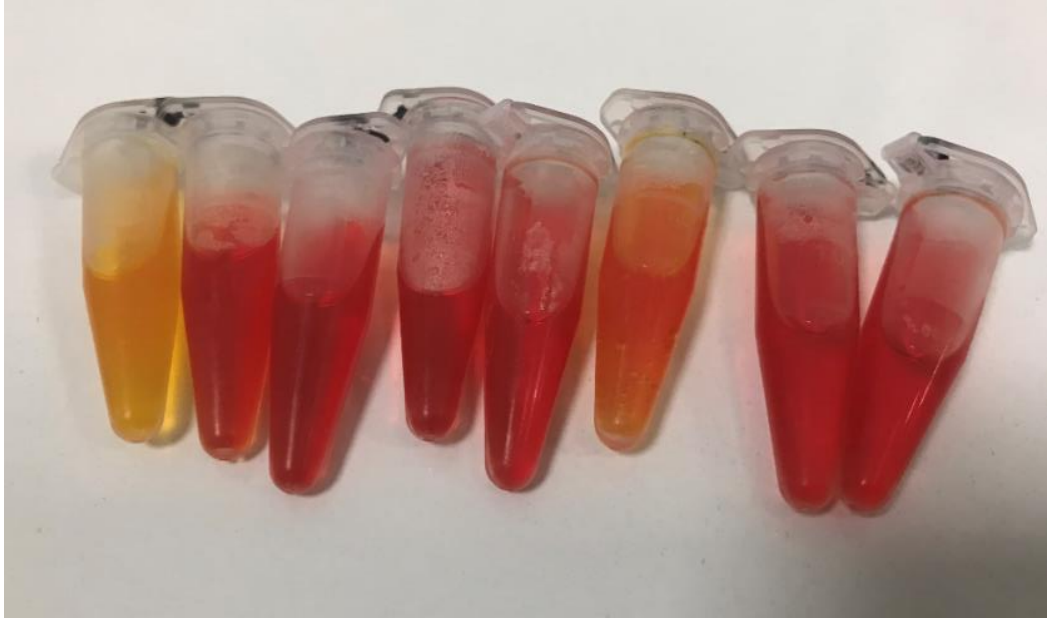
E. coli ile yapılan nişasta enerji kaynağı olarak kullanılmış deney setinde RGB değerlerine bakıldığında 4. saat itibarıyla pozitif sonuç elde edilmiştir. Buna ait ayrıntılı bilgiler Tablo 5.5'te gösterilmiştir. *E. coli* içeren indikatörlerin 4. saat resimleri Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'te gösterilmiştir. 10^8 , 10^7 , 10^6 değerinde ekim yapılan indikatörlerde renk değişimi gözlemlenmiştir.

Tablo 5.6: *E.coli* glukoz çözeltilisi için optik okuma değerlendirilmesi.

Saat	Bakteri adı	Enerji Kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			
			R	G	B	Değerlendirme
0. saat	<i>E. coli</i>	Glukoz	38	30	34	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			32	28	38	Pozitif
6. saat			31	28	36	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			29	28	38	Pozitif

*: R: kırmızı *: G: yeşil *: B: mavi

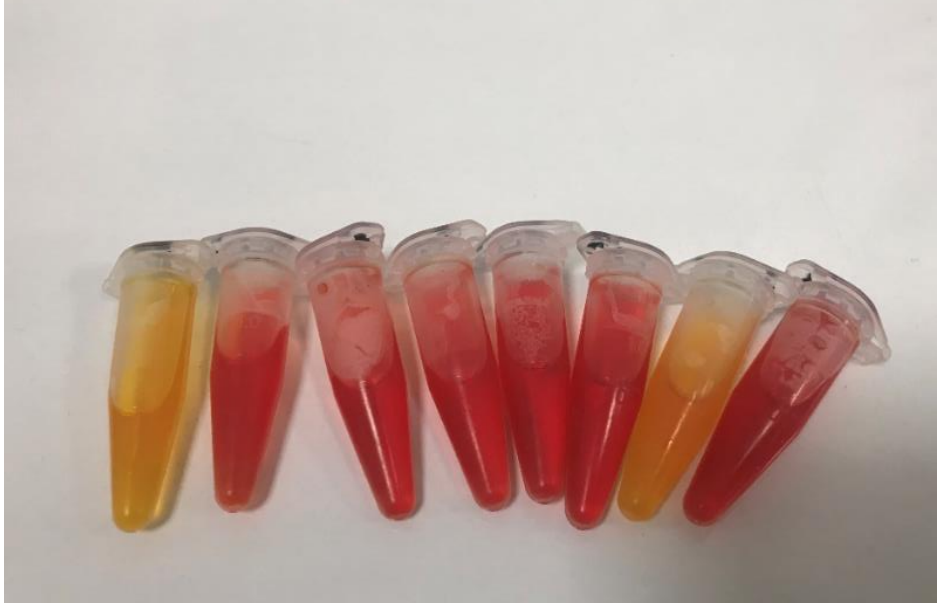
E. coli ile yapılan, nişastanın enerji kaynağı olarak kullanıldığı deney setinde RGB değerlerine bakıldığında 4. saat itibariyle pozitif sonuç elde edilmiştir. Buna ait ayrıntılı bilgiler Tablo 5.6'da gösterilmiştir.



Şekil 5.2: 4.saat *G. stearothermophilus* glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.



Şekil 5.3: 4.saat *G. stearothermophilus* nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.

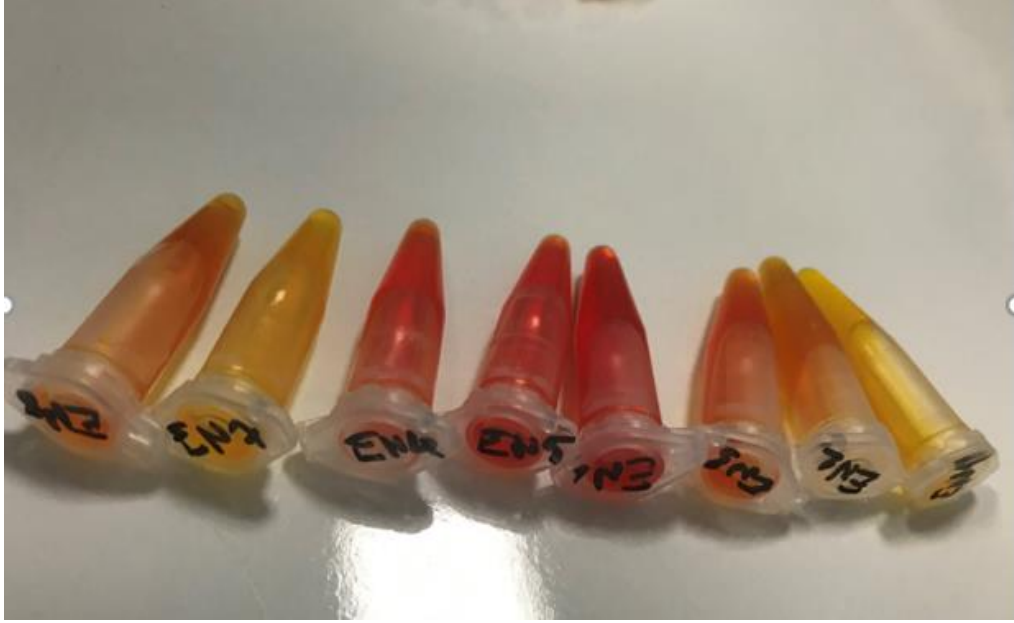


Şekil 5.4: 4.saat *E. coli* glukoz çözeltilisi eppendorf tüpleri.



Şekil 5.5: 4.saat *E. coli* nişasta çözeltilisi eppendorf tüpleri.

Şekil 5.6 ve Şekil 5.7’de *E.coli* içeren biyoindikatörlerin 8.saat görüntüleri verilmiştir. Bakteri gücü yüksek olan biyoindikatörlerin renk değişimi gözlemlenmiştir.



Şekil 5.6: 8.saat *E. coli* nişasta çözeltisi eppendorf tüpleri.



Şekil 5.7: 8.saat *E. coli* glukoz çözeltisi eppendorf tüpleri.

Şekil 5.8 ve Şekil 5.9’da *G. stearothermophilus* içeren biyoindikatörlerin 8.saat görüntüleri verilmiştir. Bakteri gücü yüksek olan biyoindikatörlerin renk değişimi gözlemlenmiştir.

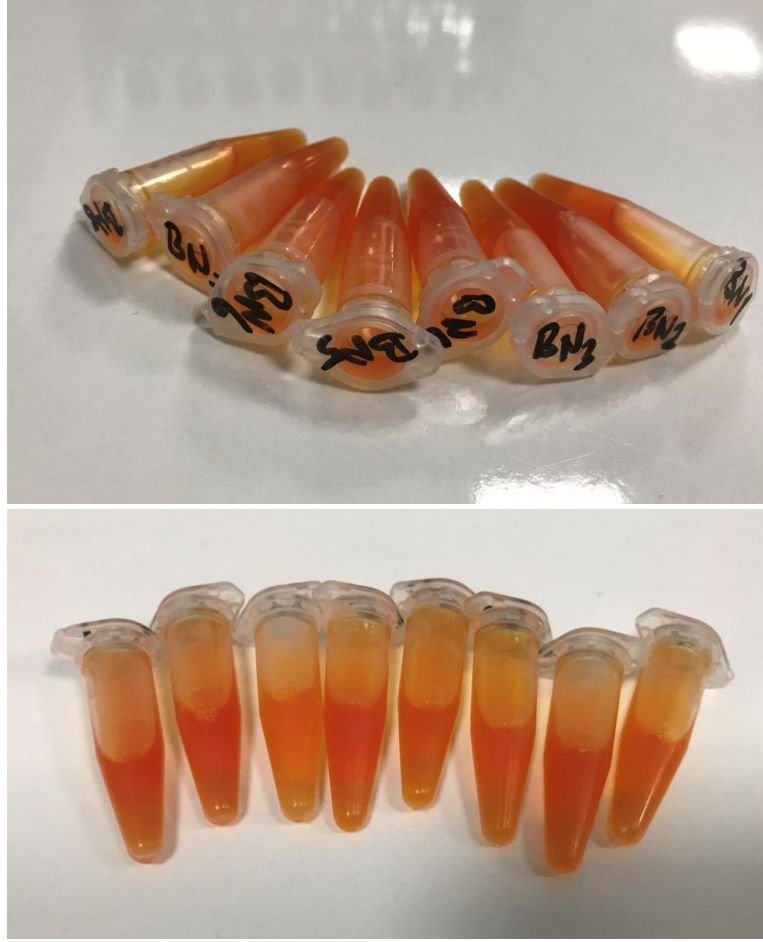


Şekil 5.8: 8.saat *G. stearothermophilus* glukoz çözeltisi eppendorf tüpleri.



Şekil 5.9: 8.saat *G. stearothermophilus* nişasta çözeltisi eppendorf tüpleri.

Şekil 5.10 ve Şekil 5.11’de *G. stearothermophilus* içeren biyoindikatörlerin 24.saat görüntüleri verilmiştir. Renk değişiminin gerçekleştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.10: 24.saat *G. stearothermophilus* nişasta çözeltisi eppendorf tüpleri.



Şekil 5.11: 24.saat *G. stearothermophilus* glukoz çözeltisi eppendorf tüpleri.

Şekil 5.12 ve Şekil 5.13'te *E. coli* içeren biyoindikatörlerin 24.saat görüntüleri verilmiştir. Renk değişiminin gerçekleştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.12: 24.saat *E. coli* glukoz çözeltisi eppendorf tüpleri.



Şekil 5.13: 24.saat *E. coli* nişasta çözeltisi eppendorf tüpleri.

Hazırlanan biyoindikatörlerden *E. coli* 37 °C’de, *G. stearothermophilus* 55 °C’de inkübasyona bırakılarak 2 saatte bir ölçüm yapılmıştır. Yukarıda görsellerle özetlenen verilere göre hassasiyet çalışması yapıldığında normalde bir biyoindikatörde 8 logaritma mikroorganizma bulunması istenirken 2 logaritma hassasiyet seviyesine kadar inilebileceği gözlemlenmiştir. Genellikle 10^6 biyolojik yük ile *G. stearothermophilus* kullanılarak üretilen biyoindikatörlerden 24 saatte sonuç alınırken, bu çalışmada farklı olarak; 10^8 , 10^7 , 10^6 gücündeki ekimlerden 6 saatte sonuç alındı. Tablo 5.8’de *G. stearothermophilus* için saate göre sonuçların değişimi verilmiştir. 24 saatin sonunda ise 10^2 gücündeki *G. stearothermophilus* için sonuç alınmıştır. Düşük sıcaklıklardaki sterilizasyon yöntemleri için seçilen *E. coli*; hızlı ürediği için 10^8 , 10^7 , 10^6 gücündeki tüplerde 4 saat sonunda tespit gerçekleşmiştir. 24 saatin sonunda ise Tablo 5.7’deki sonuçların gösterdiği gibi tüm seviyelerde tespit edilebildiği gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan enerji kaynakları için yapılan deneysel ölçümlerde niceliksel fark gözlemlenmemiştir ancak nişastanın kullanımını sonucunda oluşan bulanıklık sebebiyle glukoz tercih edilebilir.

Tablo 5.7: Vejetatif bakteri için hassasiyet sonuçları.

<i>E. coli</i> seviyesi (log ₁₀ kob/mL)	2. saat	4. saat	6. saat	8. saat	24. saat
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	+
5	-	-	-	+	+
6	-	+	+	+	+
7	-	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+

Tablo 5.8: Sporlu bakteri için hassasiyet sonuçları.

<i>G. stearothermophilus</i> seviyesi (log ₁₀ kob/mL)	2. saat	4. saat	6. saat	8. saat	24. saat
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	+
5	-	-	-	+	+
6	-	-	+	+	+
7	-	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ISO 11138 içerisinde bildirilen indikatör organizmalardan vejetatif grubu temsilen *E. coli* ve sporlu mikroorganizmaları temsilen *G. stearothermophilus* seçilmiştir. Bu amaçla seçilen *E. coli*'nin vejetatif olması ve 100 °C üzerinde canlılığını kaybetmesi düşük sıcaklıkların etkisini gözlemlemede, *G. stearothermophilus*'un ise 121 °C'de 15 dakikada veya 134 °C'de 4 dakikada canlılığını kaybeden sporlu bir mikroorganizma olması dolayısıyla çiftli kontrol yapılmak üzere seçilmiştir. Buna ek olarak çalışmanın amacı geleneksel sistemlerde inkübasyonda 24 saatte sonuç elde ederken, tarafımızdan seçilen bakterilere farklı enerji kaynakları verilerek daha hızlı üremeleri ve renk değişiminin gözle görülmeyecek seviyede olması halinde bile etkili optik donanım ile tespiti hedeflenmiştir. Böylece yapılan otoklav işleminde bir başarısızlık olması durumunda hızlı biçimde tedbir alınması mümkün kılınmıştır.

Çalışmada farklı indikatörler ve farklı şekerlerin olduğu besiyerlerine *G. stearothermophilus* ve *E. coli* eklenmiştir. Ekimleri takiben 2, 4, 6, 8. saatlerde kontrol edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *E. coli*'nin birçok karbon kaynağından enerji elde edebildiği bildirilmiştir (Baev ve diğ. 2006). Farklı şekerler üzerine anerobik büyüyen mikroorganizmalar karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma katabolik hücresel hızın aktivitesiyle ilgilidir. Şekerlerin enerji kaynağı olarak düşük seviyede eklendiği bir çalışmada yüksek metabolizma tetiklendiği ve üremenin teşvik edilebildiği gözlemlenmiştir (Belaich ve Belaich 1976). Bu da çalışmamızda eklenen az miktarda glukoz ile elde edilen hızlı üremeyi haklı çıkartmakta ve sonuçlarımızla uyum göstermektedir. George ve arkadaşları (2019) spektroskopi teknikleri ile bakteriyel kültür gelişimini glukoz ve laktöz şekerlerini bir arada kullanarak diğer şekerler ile yalnızca ortamda glukoz bulunmadığında beslendikleri sonucuna varmıştır.

Okamoto ve diğ. (2015) nişastadan bir vinil monomer itakonik asidin fermentatif üretimi üzerine çeşitli çalışmalar yapmıştır. Benzer başka çalışmada, *E. coli*'nin

şekerleri kullanım metabolizması karşılaştırılmış, glukoz, galaktaz, mannoz, maltoz ribozdan hemen yararlanırken galaktozda büyüme gecikmeli olarak başlamıştır (Lendenmann ve Egli 2020). Bu çalışmalar ile bu tez çalışmasında elde edilen veriler uyum göstermektedir.

E. coli genomunun minimal ve zengin glukoz ortamında bulunmasıyla minimalde hücre süreçleri düzenleyicilerin önü açılmıştır Başta asetat gibi oluşan metabolitlerin stresinden kendini koruyabildiği bildirilmiştir. Buna bağlı olarak çalışmamızda glukoz ortamında üremenin neden yüksek seviyede olduğu açıklanabilmiştir (Tao ve diğ. 1999).

Smerilli ve arkadaşları (2015)'te yaptığı çalışmada biyorafineri için önemli bir kimyasal olan laktik asit üretiminde *G. stearothermophilus* ve nişastayı kullanarak laktik asit oluşumu sağlamıştır. Mtimet ve diğerleri (2015)'te bu alanda yaptığı çalışmada 45 °C'de oluşan sporlar 57 °C'de oluşan sporlara göre daha dayanıklı olduğunu kaydetmişlerdir *G. stearothermophilus* konserve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *G. stearothermophilus* için nişasta kullanımını tarafımızdan yapılan çalışma desteklemiştir.

Laskaris ve arkadaşları (1969) düşük ısıya dayanıklı *B. subtilis* bakterisinin otoklav sterilizasyonunda verimli olmadığını belirtmiştir. *B. stearothermophilus* üzerine çalışmalar yapmış spor şerit preparatlarında standardizasyon eksikliğini kaydetmiş, son kullanma tarihinden önce ısı direncinde düşüş olduğunu belirtmiştir. Buna bağlı geleneksel biyoindikatör tasarımı yapılmış ve 24 saatte cevap vermesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda aynı bakterinin daha kısa sürede cevap verebildiği tespit edilmiş olup, bu sürenin kısılmasının halk sağlığı açısından daha önemli olduğu düşünülmüştür.

Cabbari ve arkadaşları (2012) İran Tebriz hastanesinde 1997'den 2011'e kadar sterilizasyon sürecinin kontrolünü iyileştirmeye odaklanmış kimyasal indikatör kullanımını %100'e biyolojik indikatörlerin kullanımını %69'e yükseltmiştir. Biyoindikatör kullanımının yüksek sayılara ulaşmasının hastalık ile mücadele de önemli olduğu düşünülmüştür.

Whitman ve arkadaşları (2011) bizmut bileşiği içeren kimyasal indikatör bileşenleri elemental kükürtün yüksek sıcaklıkta su buharında alkali olduğunu ve kimyasal indikatör yapma ve kullanma sürecini açıklamıştır. Huesca-Espitia ve diğerleri (2016) dipikolinik asit (DPA) salınımı, nükleik asit boyama, α -glukozidaz aktivitesi, protein yapısı ve mutajenez parametrelerini *G.stearothermophilus* için ölçmüştür. DPA kaybı ve spor çekirdek nükleik asit boyamasındaki artışlar spor canlılığı kaybından daha yavaş kaybedilirken α -glukozidaz daha hızlı kaybedilmiştir. Etkili bir otoklav sterilizasyonunda sporların ve enzimlerin tekrar canlanmadığını, α -glukozidaz enziminin spor canlılığından daha yavaş kaybolduğunu kaydetmiştir. Garibaldi ve arkadaşları (2017) ebola salgınında Johns Hopkins Hastanesi'nde 2 geçişli otoklav kurmuştur. Otoklavın belirli tıbbi atıklar için etkisiz olduğunu ortaya çıkarmış, tıbbi atıkları paketlemenin önemini vurgulayarak atık yönetimi protokolleri belirlemiştir. Kaseman ve diğerleri (2012) Afrika ve Güney Asya gibi ülkelerde elektrik şebeke dışında kalan topluluklar için güneş termal enerjili otoklav sistemi kurmuştur. Güneş enerjisi ile çalışan otoklav sisteminin test sonuçları, biyolojik test ajanlarına karşı da dahil olmak üzere ıslak sterilizasyon hakkındaki CDC yönergelerine göre tamamen etkili olduğunu göstermiştir. Bu da mikroorganizmanın otoklav indikatörü olarak uygun olmasını belirler.

G. stearothermophilus dışında kullanılabilen başka bakteriler de indikatör olarak kullanılabilir. ISO standardına göre kullanılabilen bakteriler arasında *E. coli* bulunmaktadır. *E. coli* indikatör mikroorganizma olarak birçok kaynakta kabul edilmektedir. Biyogaz tesislerinde patojen azaltma kapasitesi *E. faecalis* ve *C.perfringens* sırasıyla 55 °C ve 70 °C sıcaklıklarda gösterge organizmalar olarak kullanılabilirken, 37 °C'de *E. coli* indikatör organizma olarak kullanılmıştır (Watcharasukarn ve diğ. 2009). Hossain ve arkadaşları (2015) klinik katı atıklarda bulunan *Enterococcus faecalis*, *E. coli* ve *Bacillus sphaericus*'un inaktivasyonu için buharla otoklavlama ve süper kritik karbon dioksit (SC-CO₂) tekniğini kullanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 60 dakika ve 131 °C'de 30 iken SC-CO₂ sterilizasyonuna tabi tutulan klinik katı atıktaki bakterilerin tamamen inaktivasyonu basınçlara göre 30 ile 120 dakika sonra elde edilmiştir. Buharla otoklavlama sisteminde fiziksel olarak inaktivasyon sağlanırken SC-CO₂ tekniğinde hem fiziksel hem de kimyasal yok olma sağlanmıştır. Çalışmada farklı bakterilerin indikatör kullanımı gösterilmiştir. Mikrodalga plazmanın sterilizasyon için kullanılması yeni bir yöntem olup, *E. coli* ve

metisiline dirençli *S. aureus* bakterileri bu yöntemin sterilizasyon etkilerini araştırmak için seçilmiştir. Yüksek plazma yoğunluğu, çok sayıda serbest radikal ve üretilen UV ışığının güçlü yoğunluğu nedeniyle bakteriler üzerinde etkinliği kaydedilmiştir. Bu çalışmada da geleneksel uygulama dışında *E. coli* kullanımını uygulanmıştır (Lee ve diğ. 2005). Tez çalışmasında *E. coli* seçimimizi destekleyen çalışmalar ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Klinik katı atık (iğneler, neşterler, kültür, stoklar ve çubuklar, kirli veya kana bulanmış bandajlar) yönetiminde yakma teknolojisine bir alternatif belirlemek için buhar otoklavı tercih edilmiş (0, 5, 15, 30 ve 60 dakika) ve yüksek sıcaklıkta (111 °C, 121 °C ve 131 °C) etkili olduğu kaydedilmiştir. Sonuçlar, artan temas süresi ve sıcaklıkla, hayatta kalan bakteri sayısının azaldığını göstermektedir. Gram negatif bakteriler için optimum inaktivasyon derecesi 121 °C 15 dakika, gram pozitif bakteriler için 60 dakika 121 °C'de veya 30 dakika ve 131 °C olarak bulundu. Atığın sterilizasyonundan 6 gün sonra incelenen ürünlerde bakterilerin yeniden canlanması gözlemlendiği için buharlı otoklavın klinik katı atık yönetiminde alternatif bir yakma teknolojisi olarak düşünülmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır (Hossain 2012). Otoklav uygulama prosedüründe göz önüne aldığımız parametreleri desteklemiştir. Hassasiyet ile ilgili yapılan çalışmada, piyasada mevcut ürünlerde 8 log₁₀ kob/mL mikroorganizma mevcutken, yaptığımız şeker desteğine bağlı olarak 4. saat itibariyle 5 log₁₀ kob/mL seviyesinde renk değişimi gözlemlenmiştir. Bu da hem mikroorganizmanın az kullanılmasını, hem hızlı belirlemeyi sağladığı gibi hassasiyetin de seçkin olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada optik sensör olarak Arduinio Uno ve TCS3200 renk sensörü kullanılmıştır. Spektrofotometre; gıda mühendisliği, fizik, biyoteknoloji alanlarında yaygın kullanılır ve numunelerin temel ölçüm aracıdır. Kim ve diğerleri (2015) LED ve renk sensörünü kullanarak numune konsantrasyonunu ve renk bilgisini içeren sistem oluşturmuştur. Saflık ve dalga boyu değerlerini elde ederek spektrofotometreye göre daha ekonomik bir sistem elde etmişlerdir. Bu veriler çalışmamızda elde edilen LED ve sensör uyumluluğu için destekleyici kabul edilmiştir.

Çevredeki ışık renk sensörü üzerinde çok etkilidir, bu nedenle renk okuma aşamasında otomatik kalibrasyonu üç aşamalı yapılmıştır. Nguyen ve arkadaşları (2019) lazer kenar bantlama makinesinde, TCS3200 renk sensörü kullanarak, sensörün

gelen rengi tanımasını ve gelen renge uygun şekilde aynı renkle bantlamasını amaçlamıştır. Ürünlerden elde ettiği renkleri sabitleyerek kararsız faktörleri ve işçiliği azaltmıştır. Wardana ve arkadaşları (2019) RGB TCS3200 sensörü kullanarak arduino tabanlı bir sistem oluşturmuştur. Diyabet hastalarından ve normal kişilerden idrar örnekleri alarak idrar renklerinden hastalık belirlemiştir. Juliano ve arkadaşları (2020) Endonezya’da bol yetişen çilek için olgunluk belirleme sistemini TCS3200 renk sensörü kullanarak Arduino Uno web tabanlı sistemi kurmuştur. Hasat sonrası kalite için çilek olgunlaştığında bilgi almayı amaçlamıştır. Sihombing ve arkadaşları (2018) benzer sistemle narenciye ayıklama cihazını tasarlamıştır. Turunçgilleri bir kaba koyarak rengine göre uygun kaba yönlendirmeyi amaçlamıştır. Kustija ve diğerleri (2017) kör insanların para alışverişinde yaşadığı dolandırıcılık sebebiyle bir rengi ve parayı tespit ederek Arduino Nano ile dönüşen verileri hoparlör yoluyla ses olarak kişiye bildirmiştir. Hasan ve diğerleri (2018) ileri görme bozukluğu olan bireylere ve çocuklara yardımcı olabilmek için TCS3200 sensörü ile renk algılama dedektörü geliştirmiştir. Bu sensör, %80 ileri görme bozukluğu olan bireylerde %70 çocuklar için başarılı olduğunu kaydetmiştir. Singh ve arkadaşları (2020) siyanür gibi zararlı elementler için kâğıt bazlı sensör geliştirmiştir. Analitlerin konsantrasyonunu TCS3200 sensör ile belirlenip, tehlikeli analitlerin kantitatif analizi için kullanılmıştır. Ardunio Uno ve TSC3200 sensörlerinin yeterli bulunduğu çalışmalarla uyumlu olarak bu tez çalışmasında da sonuçlar verimli olarak elde edilmiştir.

Türkiye’de otoklav biyoindikatörü üretilmemektedir ve yaptığımız bu tezle üretim bilgisini elde edip, süreci hızlandırarak toplam kaliteye hizmet etmek hedeflenen bu tezde üretim metodolojisi ve optimizasyonuna ek olarak sterilizasyon tespit süresi kısaltılmıştır. Literatürde bu yönde bir tespit gözlemlenmemiştir. Bu da şeker kaynaklarının kullanımının göz ardı edilmesinden kaynaklı olabilir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Otoklavlar modern sterilizasyon teknikleri arasında en yaygın, en aktif kullanılan ve en çok güvenilen teknikler arasında yer almaktadır. Otoklav işleminin başarısız olması halinde tetiklenebilecek olası bir salgın, enfeksiyon veya bulaşımın halk sağlığı açısından etkisi çok belirgin, sağlık kuruluşunun saygınlığı açısından da çok sıkıntılı olacağı aşikardır. Bu kapsamda kontrolünde kullanılacak kimyasal indikatörler buhar doyumluğu üzerinden hareket ederken biyoindikatörlerin kullanımı sistemin tam çalışırılığı ve güvenirliliği açısından değerli bir bilgi sağlamaktadır.

Mevcut biyoindikatörlerin 24 saat sonunda sonuç veriyor olması; sterilizasyon işleminin başarısız olması durumunda kontamine operasyon malzemesi, tıbbi cihaz parçası veya diğer laboratuvar malzemelerinin kullanımı halinde sonuçlar etkileneceği gibi aynı zamanda enfeksiyon riski ve bulaşımın da başlayabileceği düşünülebilir.

Bu çalışmada, farklı şeker katkısı eklenen brothlarda üretilen *E. coli* ve *G. stearothermophilus* bakterileri kullanılarak hazırlanan otoklav biyoindikatörlerinden Arduino Uno ve TCS3200 sensör ile hızlı cevap almak hedeflenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, her iki bakterinin de yeterli olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak yapılan bir otoklav işleminin kontrolünün 24 saatten önce en kısa 4 saatte belirlenebileceği tespit edilmiştir. Bu amaçla her iki bakterinin de sistemde kullanılmasının halk sağlığı amacıyla uygun olacağı kanaati oluşmuştur.

Aynı zamanda bu tezden elde edilen veriler ile sahada yerli biyoindikatör üretimine yönelik bir prototip oluşturulmuş ve bu ürünlerin hazırlanmasında da rehber doküman olarak hizmet etmesi hedeflenmiştir. Bütün yukarıda anılan verilerin ışığında elektronik ve optik donanım ile insan gözünden daha hızlı sonucu okuyabilen ve analitik veriler ile optimize edilebilen, kayıt altına alınabilen bir cihazla kalite kontrol süreçlerinin daha doğru yapılabilceği kanaati oluşmuştur.

8. KAYNAKLAR

Albert, H., Davies, D., Woodson, L. and Soper, C., “Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme”, *Journal Of Applied Microbiology*, 865-874, (1998).

Baev, M., Baev, D., Radek, A. and Campbell, J., “Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of sugars, alcohols, and organic acids with transcriptional microarrays”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 310-316, (2006).

Belaich, J. and Belaich, A., “Microcalorimetric study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: measurements of the affinity of whole cells for various energy substrates”, *Journal of Bacteriology*, 19-24, (1976).

Cabbari, H., Alikhah, H., Alamdari, N., Behzad, M., Mehrabi, E., Borzui, L. and Bakhshian, F., “Developing the Use of Quality Indicators in Sterilization Practices”, *Iranian Journal of Public Health*, 64-69, (2012).

Castillo, R. B., “Establishment of Penetration Time on Medical Device Product Families Based on ISO 17665-3 During Performance Qualification of Steam Sterilization: A Case Study”, 4-7, Bonn: 18th Word Sterilization Congress, (2017).

Çevik Telekoğlu, M., “Piyasada Satılan Etilerde *Salmonella* spp. ve *E. coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması”, Afyon, (2019).

Dias, F., Ishii, M., Nogaroto, S., Piccini, B. and Penna, T., “Sterilization of medical devices by ethylene oxide, determination of the dissipation of residues, and use of Green Fluorescent Protein as an indicator of process control”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 1-5, (2009).

Dolapçı, İ., “Sterilizasyon Ve Dezenfeksiyon” (11 11, 2020), <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/41248/STER%C4%B0L%C4%B0ZASYON%20VE%20DEZENFEKS%C4%B0YON.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, (2011).

Dumlu, G., “*Geobacillus stearothermophilus* Spor Jerminasyonunu Erken Belirlemede Farklı Yöntemlerin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, (2016).

Ercan Akkaya, S. ve Kıvanç, M., “Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gr (+) Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri” *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 61-69, (2008).

Długokenski, R., Sella, S., Guizelini, B., Vandenberghe, L., Woiciechowski, A., Soccol, C. and Minozzo, J. Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 713-719, (2011).

Gillis, J., Mosley, G., Kowalski, J., Krushefski, G., Nirgenau, P. and McCauley, K. Understanding biological indicator grow-out times. *Journal of Pharmaceutical Technology*, (2010).

Guizelini, B., Vandenberghe, L., Sella, S. and Soccol, C., “Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization”, *Archives of Microbiology*, 991-999, (2012).

Günaydın, M., “Sterilizasyonun Monitorizasyonu”, (15 11, 2020), <https://www.das.org.tr/dosya/mg/sm9seminer.pdf>, (2008).

Günaydın, M. ve Sünbül, M., “Sterilitenin Kontrolü” (13, 11, 2020), <https://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2003/05.htm>, (2003).

Güven, R., Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı, Ankara, 411-421., (2007).

Hancı, M. B., “Sterilizasyon Kontrolü İçin Biyolojik İndikatör Üretimi”, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir, (2019).

Hasan, M., Marwanto, A. and Suprajitno, A., “Colour Detector Tool Using TCS3200 and Arduino Uno for Blind and Child”, *Journal of Telematics and Informatics*, 37-44, (2018).

Hossain, M., Balakrishnan, V., Rahman, N., Sarker, M. and Kadir, M., “Treatment of Clinical Solid Waste Using a Steam Autoclave as a Possible Alternative Technology to Incineration”, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 855-867, (2012).

Hossain, M., Rahman, N., Balakrishnan, V., Rajion, Z., and Kadir, M., “Mathematical modeling of *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Bacillus sphaericus* inactivation in infectious clinical solid waste by using steam autoclaving and supercritical fluid carbon dioxide sterilization”, *Chemical Engineering Journal*, 221-234, (2015).

Huesca-Espitia, L., Suvira, M., Rosenbeck, K., Korza, G., Setlow, B., Li, W. and Setlow, P., “Effects of steam autoclave treatment on *Geobacillus stearothermophilus* spores”, *Journal of Applied Microbiology*, 1300-1311, (2016).

Juliano, A., Hendrawan, A. and Ritzkal., “Information System Prototyping of Strawberry Maturity Stages using Arduino Uno and TCS3200”, *Journal of Robotics and Control*, 86-91, (2020).

Juwarkar, C. S., “Cleaning and Sterilisation of Anaesthetic Equipment”, *Indian Journal Of Anaesthesia*, 541-549, (2013).

Karadağ, A., 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı, Samsun, (2005).

Kim, J. S., Kim, A. H., Oh, H. B., Goh, B. J., Lee, E. S., Kim, J. S. and Jun, J. H. “Simple LED spectrophotometer for analysis of color information”, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 1773-1780, (2015).

Kustija, J. and Andika, F., “Nominal of Money and Colour Detector for the Blind People”, *Materials Science and Engineering*, (2017).

Laskaris, T. and Chaney, A., “Reliability of Biologic Autoclave Sterilization Indicators” *American Journal of Clinical Pathology*, 495-500, (1969).

Lee, K. Y., Park, B., Lee, D., Lee, I. S., Hyun, S., Chung, K. H. and Park, J. C. “Sterilization of *Escherichia coli* and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure”, *Surface and Coatings Technology*, 35-38, (2005).

Lendenmann, U. and Egli, T., “Is *Escherichia coli* growing in glucose-limited chemostat culture able to utilize other sugars without lag?”, (16, 11, 2020), <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/141/1/mic-141-1-71.pdf?expires=1605721776&id=id&accname=guest&checksum=BF39A4A3CE8AAF93AB4857F5F2336640>, (1995).

Metcalf, G., Alahmari, S., Smith, T. and Hippler, M., “Cavity-Enhanced Raman and Helmholtz Resonator Photoacoustic Spectroscopy Monitor the Mixes Sugar Metabolism of *E. Coli*”, *Analytical Chemistry*, (2019).

Mikrobiyoloji., “Bromocresol-purple Azide Broth”, (4 10, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF1084D1ED2B222F12>, (2009).

Mikrobiyoloji., “Phenol Red Broth Base”, (4 10, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF7433890CBCD25B16>, (2009).

Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A. G., Venaille, L., Laguerinel, I., Coroller, L. and Couvert, O., “Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980

throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries”, *Food Microbiology*, 153-162, (2015).

Neumann, O., Feronti, C., Neumann, A., Dong, A., Schell, K., Lu, B. and Halas, N., “Compact solar autoclave based on steam generation using broadband light-harvesting nanoparticles”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2013).

Nguyen, T., Nguyen, T., Nguyen, V., Cao, C. and Hua, J., “Application of Arduino Control Mainboard with Color Light Sensor TCS3200 in Color Recognition of Edge Banding In Laser Edge Banding Machine”, *Earth and Environmental Science*, (2019).

Okamoto, S., Chin, T., Nagata, K., Takahashi, T., Ohara, H. and Aso, Y., “Production of itaconic acid in *Escherichia coli* expressing recombinant α -amylase using starch as substrate”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 548-552, (2015).

Özer, Y., “Gama Radyasyonla Sterilizasyon ve Tıbbi Malzemeler”, (eds: M. Günaydın, A. Sarnıç ve B. Gürler), 4. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, Ankara, 220-227, (2005).

Panta, G., Richardson, A., Shaw, I., Chambers, S. and Coope, P., “Effectiveness of steam sterilization of reusable medical devices in primary and secondary care public hospitals in Nepal and factors associated with ineffective sterilization: A nation-wide cross-sectional study”, *Plos One*, (2019).

Pekbay, A., “Pastör Fırını ve Yakma ile Sterilizasyon”, (eds: M. Günaydın, A. Sarnıç ve B. Gürler), 4. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, Samsun, 70-75, (2005).

Perçin, D., “Düşük Sıcaklıkta Sterilizasyon Yöntemlerinden Hangisini Seçelim?”, *ANKEM*, 320-323, (2012).

Pflug, I. and Odlaug, T., “Biological indicators in the pharmaceutical and medical device industry”, *Journal of Parenteral Science and Technology*, 242-248, (1986).

Royalty-Hann, W., “Solutions for Biological Indicator Problems from a Quality Assurance Viewpoint”, *Biocontrol Science*, 77-81, (2007).

Rutala, W. and Weber, D., “Disinfection and sterilization: An overview”, *American Journal of Infection Control*, 2-55, (2013).

Shintani, H., Factors in the preparation of biological indicators that affect the decimal reduction time. *Biomedical Instrumentation & Technology*, 449-453, (1996).

Shintani, H., “Validation of Sterilization Procedures and Usage of Biological Indicators in the Manufacture of Healthcare Products”, *Biocontrol Science*, 1-4, (2011).

Sigwarth, V. and Moirandat, C., “Development and Quantification of H₂O₂ Decontamination Cycles”, *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 286-304, (2000).

Ridgeway, B., “Organisms and Their Uses in Biological Indicators”, (13 11, 2020), <https://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2014/04/Spore-News-Vol-10-No-1.pdf>, (2019).

Schuler, D., Boubour, J. and Kaseman, T., “Validation of the Efficacy of a Solar-Thermal Powered Autoclave System for Off-Grid Medical Instrument Wet Sterilization”, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 602-607, (2012).

Shintani, H., “Validation of Sterilization Procedures and Usage of Biological Indicators in the Manufacture of Healthcare Products”, *Biocontrol Science*, 1-4, (2011).

Sihombing, P., Tommy, F., Sembiring, S. and Silitonga, N., “The Citrus Fruit Sorting Device Automatically Based on Color Method by Using TCS320 Color Sensor and Arduino Uno Microcontroller”, *Journal of Physics*, (2018).

Singh, H., Singh, G., Mahajan, D., Kaur, N. and Singh, N., “A low-cost device for rapid ‘Color to Concentration’ quantification of cyanide in real samples using paper-based sensing chip”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2020).

Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Frühauf, S. and Fuchs, W., “Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions”, *Chemical Technology and Biotechnology*, (2015).

Soylu, T., “Sterilizasyonun Kontrolü”, (eds: M. Günaydın, A. Sarnıç, ve B. Gürler), *4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, İstanbul, 87-98, (2005).

Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. and Conway, T., “Functional Genomics: Expression Analysis of *Escherichia coli* Growing on Minimal and Rich Media”, *Journal of Bacteriology*, (1999).

Thill, S., “Toward Efficient Low-Temperature Ozone Gas Sterilization of Medical Devices”, *The Journal of the International Ozone Association*, 386-398, (2020).

Vesley, D., Langholz, A., Rohlfing, S., & Foltz, W., “Fluorimetric Detection of a *Bacillus stearothermophilus* Spore-Bound Enzyme, α -d-Glucosidase, for Rapid Indication of Flash Sterilization Failure”, *Applied Environmental Microbiology*, 717-719, (1992).

Wallace, C., “New developments in disinfection and sterilization”, *American Journal of Infection Control*, 23-27, (2016).

Ward, O., “Sterilization and Preservation in Bioprocessing, *Bioprocessing*”, Boston, Springer, 73-80, (1991).

Wardana, H., Indahwati, E. and Fitriyah, L., “Measurement of Non-Invasive Blood Glucose Level Based Sensor Color TCS3200 and Arduino”, *Materials Science and Engineering*, (2019).

Watcharasukarn, M., Kaparaju, P., Steyer, J.-P., Krogfelt, K. and Angelidaki, I., “Screening Escherichia coli, Enterococcus faecalis, and Clostridium perfringens as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants”, *Environmental Microbiology*, 221-230, (2009).

Web Anonim 19, “Sterilization of health care products — Biological indicators — Guidance for the selection, use and interpretation of results”, (25 11, 2020), <https://www.iso.org/standard/43350.html>, (2009).

Web Anonim 1, “Arduino Uno”, (11 11, 2020), <http://arduinoturkiye.com/arduino-uno/>, (2012).

Web Anonim 10, “Brain Heart Broth”, (20, 10, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF1ACFAB512C425173>, (2009).

Web Anonim 11, “Plate Count Agar”, (4 11, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF8B4D9CE4CD50D2D4>, (2009).

Web Anonim 12, “Maximum Recovery Diluent”, (4 11, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020001.pdf>, (2009).

Web Anonim 13, “Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes”, (25 11, 2020), <https://www.iso.org/standard/59752.html>, (2016).

Web Anonim 14, “Sterilization of health care products — General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices”, (25 11, 2020), <https://www.iso.org/standard/44954.html>, (2009).

Web Anonim 15, “Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 1: General requirements”, (25, 11, 2020), <https://www.iso.org/standard/66442.html>, (2017).

Web Anonim 16, “Sterilization of health care products — Chemical indicators — Part 1: General requirements”, (25 11, 2020), <https://www.iso.org/standard/55080.html>, (2014).

Web Anonim 17, “Sterilization of health care products — Biological and chemical indicators — Test equipment”, (25 11, 2020), <https://www.iso.org/standard/66450.html>, (2018).

Web Anonim 18, “Sterilization of health care products — Moist heat — Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices”, (25 11, 2020), <https://www.iso.org/standard/43187.html>, (2006).

Web Anonim 19, “Common Causes for Failure of a Bowie-Dick Test”, (25 11, 2020), <https://consteril.com/bowie-dick-test/>, (2007).

Web Anonim 2, “TCS3200 ve Arduino ile Renk Algılama Uygulaması”, (11 11, 2020), <https://maker.robotistan.com/tcs3200-ile-renk-algilama-uygulamasi/#Gerekli-Malzemeler>, (2018).

Web Anonim 3, “Otoklavda Elektronik Sistemler”, (13 11, 2020), http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Otoklavda%20Elektronik%20Sistemler.pdf, (2012).

Web Anonim 4, “Sterilizasyona Giriş”, (14 11, 2020), http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Sterilizasyona%20Giri%C5%9F.pdf, (2012).

Web Anonim 5, “Arduino Uno R3”, (14 11, 2020), <https://diyot.net/arduino-uno-r3/>, (2020).

Web Anonim 6, “Escherichia coli”, (15 11, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF7CC333BB17DDB54C>, (2009).

Web Anonim 7, “Autoclave”, (24 11, 2020), <https://en.wikipedia.org/wiki/Autoclave>, (2020).

Web Anonim 8, “Tryptic Soy Broth”, (3 10, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020058.pdf>, (2020).

Web Anonim 9, “Bromocresol-purple Azide Broth”, (3 10, 2020), <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF1084D1ED2B222F12>, (2009).

Weber, D. and Rutala, W., “New Disinfection and Sterilization Methods”, *Emerging Infectious Diseases*, (2001).

Whitman, D., Read, D., Parthasarathy, R., Landgrebe, K. and Bennett, A., *Amerika Birleşik Devletleri Patent No. US9176103B2*, (2011).

Zuijdweg, J., “Cleaning of Hollow Instruments”, Delft: TU Delft & Erasmus MC, (2014).

EKLER

9. EKLER

Ek A

```
int S0 = 8;

int S1 = 9;

int S2 = 12;

int S3 = 11;

int OUT = 10;

int LED = 13;

int RenkYuzdesi[5][3] = { {29,33,29}, // Sarı renk
                          {70,80,29}, // Mavi renk
                          {77,80,19}, // Beyaz renk
                          {34,38,27}, // Kırmızı renk
                          {23,34,45}}; // Yeşil renk

String Renkler[5] = {"Sterilizasyonbasarısız", "Mavi", "Beyaz",
"sterilizasyonbasarılı", "Yeşil"};

int aralik = 7;

int KirmiziYuzdesi, YesilYuzdesi, MaviYuzdesi;

void setup() {

  Serial.begin(9600);

  pinMode(S0,OUTPUT);

  pinMode(S1,OUTPUT);

  pinMode(S2,OUTPUT);

  pinMode(S3,OUTPUT);
```

```

pinMode(LED,OUTPUT);

pinMode(OUT,INPUT);

}

void loop() {

  RengiTanimla();

  delay(1000);

}

void TCS3200_Ac() {

  digitalWrite(LED,HIGH); // switch LED on

  digitalWrite(S0,HIGH); // output frequency scaling (100%)

  digitalWrite(S1,HIGH);

  delay(5);

}

void TCS3200_Kapat() {

  digitalWrite(LED,LOW); // switch LED off

  digitalWrite(S0,LOW); // power off sensor

  digitalWrite(S1,LOW);

}

void Filtresiz() {

  digitalWrite(S2,HIGH); // select no filter

  digitalWrite(S3,LOW);

  delay(5);

}

void KirmiziFiltre() {

  digitalWrite(S2,LOW); // select red filter

```

```

digitalWrite(S3,LOW);

delay(5);

}

void YesilFiltre() {

digitalWrite(S2,HIGH); // select green filter

digitalWrite(S3,HIGH);

delay(5);

}

void MaviFiltre() {

digitalWrite(S2,LOW); // select blue filter

digitalWrite(S3,HIGH);

delay(5);

}

void RengiTanimla() {

float BeyazFrekansi, KirmiziFrekansi, YesilFrekansi, MaviFrekansi;

TCS3200_Ac();

Filtresiz();

BeyazFrekansi = float(pulseIn(OUT,LOW,40000));

KirmiziFiltre();

KirmiziFrekansi = float(pulseIn(OUT,LOW,40000));

YesilFiltre();

YesilFrekansi = float(pulseIn(OUT,LOW,40000));

MaviFiltre();

MaviFrekansi = float(pulseIn(OUT,LOW,40000));

TCS3200_Kapat();

```

```

KirmiziYuzdesi = int((BeyazFrekans / KirmiziFrekans) * 100.0);
YesilYuzdesi = int((BeyazFrekans / YesilFrekans) * 100.0);
MaviYuzdesi = int((BeyazFrekans / MaviFrekans) * 100.0);

RengiBul();
}

void RengiBul() {

    Serial.println("Renk Yuzdeleri");

    Serial.print("Kirmizi=");

    Serial.print(KirmiziYuzdesi);

    Serial.print("Mavi=");

    Serial.print(MaviYuzdesi);

    Serial.print("Yesil=");

    Serial.println(YesilYuzdesi);

    Serial.println();

    Serial.print("Okunan Renk=");

    int okunduMu=0;

    for(int renk =0; renk < 5; renk ++){

        if(KirmiziYuzdesi > RenkYuzdesi[renk][0] - 7 && KirmiziYuzdesi <
RenkYuzdesi[renk][0] + 7 &&

            MaviYuzdesi > RenkYuzdesi[renk][1] - 7 && MaviYuzdesi <
RenkYuzdesi[renk][1] + 7 &&

            YesilYuzdesi > RenkYuzdesi[renk][2] - 7 && YesilYuzdesi <
RenkYuzdesi[renk][2] + 7 ){

            Serial.println(Renkler[renk]);

            okunduMu=1;

            break;

```



```
    }  
  }  
  if(okunduMu == 0)  
    Serial.println("Renk Algilanamadi");  
  Serial.println();  
  Serial.println();  
}
```