

Farmasötik Preparatların Mikrobiyolojik Analizleri



- Tedavi amacıyla kullanılan ilaçların mikroorganizma içereceği ve infeksiyona yol açabileceğine dair herhangi bir yayın yok iken..
- 1963 sonrasında oral olarak alınan ya da lokal uygulanan *kontamine ürünlerin bazı infeksiyonlara yol açtığı.. İlaçların da infeksiyon kaynağı olabileceği anlaşıldı.
- Oral yolla alınan ilaçlar besin tipi inf.-*Salmonella*, *P.aeruginosa* içeren göz merhemleri, göz damlaları yaygın göz inf.
- İlaçlar mikrobiyolojik olarak steril, patojen içermeyecek!

***Kontaminasyon:** Bulaşma, yabancı maddelerin karışması, kirlenme.



Eskiden - Eczacı tarafından hasta reçetesine göre ilaç hazırlanıp kısa sürede tüketilirken,



Bugün - İlaç fabrikalarında hazırlanmakta ve fabrikasyondan uzun bir süre sonra büyük bir hasta kitlesi tarafından kullanılmaktadır.

İyi İmalat Uygulamaları-GMP

Üretimdeki her seri ürünün kalitesi istenen tüm standartlara uygunluğuna bağlıdır.

Yani;

- Personelin yeterli eđitimi, uygun bina ve gereçlerin sađlanması
- Dođru materyallerin kullanımı
- Denenmiř işlemlerin uygulanması
- Uygun depolama ve taşıma donanımlarının hazır bulundurulması
- Dođru kayıt anlamına gelir -GMP

- Farmasötik ürünlerde mikrobiyal kontaminasyonun engellenmesi ve mikrobiyal kalitenin sağlanması ve ilaca bağlı infeksiyon riskini en aza indirmek için, **üretimin her aşamasında mikrobiyolojik kalite kontroller yapılmalıdır.**
- Farmasötik üründe meydana gelen mikrobiyal kontaminasyon, ürünün ve hasta sağlığının bozulmasına neden olduğu gibi üretici firma için maddi ve manevi kayıplara neden olmaktadır.
- **İlaçta meydana gelen istatikselsel olarak önemsiz görünen küçük bir hata, ürünü kullanan hasta için ölümcül bir tehlike yaratabilir.**

- İlaça baēlı infeksiyon riskini en aza indirmek için, üretimin her aşamasında mikrobiyolojik kalite kontrol yapılmalıdır.
- Farmasötik ürünlerin tüm özelliklerinin hatasız ve istenilen kalitede olması zorunludur.
- Bu amaçla ilaç üretimi, kontaminasyon riskinin en az olduēu koşullarda yapılmalıdır.

İlaçlarda kontaminasyon;

- İlacın yapısından
- Çalışılma ortamından
- Etken & yardımcı maddelerden kaynaklanabilir.

Preformülasyon, formülasyon, üretim, ambalajlama ve kullanma dönemlerinde oluşabilir.

- Kontaminasyon ilaç içindeki etken maddelerin aktivitelerinin yok olmasına ve ilaçlarda birtakım fiziksel değişimlere yol açabilir.

Tabletlerde şişme, sulanma,

Şuruplarda üst kısımlarda tabakalaşma, gaz çıkışı, kötü koku oluşumu vb.

Farmasötik Preparatların Mikrobiyolojik Kontaminasyonlarının Nedenleri

1. Hammadde tabiatı ve özelliđi:

İlaçların mikrobiyolojik kontaminasyonunda rol oynayan en önemli faktörler **bitkisel ve hayvansal** kökenli hammaddelerdir.

Bunun yanında bazı organik maddeler, vitaminler, steroidler, talk, laktoz, magnezyum karbonat, magnezyum hidroksit, alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat vb.

2. Farmasötik şekil :

Bir ilacın mikrobiyolojik kontaminasyonu ile direkt ilişkilidir.

Örn; sıvı ve yarı katı preparatlar son derece tehlikelidir. Bu tür preparatlara etanol, şeker gibi antimikrobiyal maddeler ilave edilerek bakterinin çoğalması inhibe edilir.

- ❖ *Pseudomonas*lar ve *Enterobacter*ler oluşturdukları enzimlerle bu tür preparatları bu tür preparatlarda çoğalabilmektedirler.

3. İmalat aşaması- Fabrikasyon Hijyeni:

İlacın imalatı sırasındaki çevre koşulları, kullanılan araç ve gereçler ile personel hijyeni, optimal kontaminasyon şansını arttıran ya da azaltan etmenlerdir.

İlacın hammadde temininden, kullanıma hazır forma getirilinceye kadar geçen bütün işlemleri mikrobiyolojik açıdan kontrol altına tutulmalıdır.

- *İmalatta rol oynayan faktörler;*
 - *Su*
 - *Çevre*
 - *Ambalajlama*
 - *Depolama ve rafta bekleme süresidir.*

- İmalat sırasında kontaminasyona neden olan tüm faktörler ortadan kaldırılmalıdır.

- Kullanılan **su** mikrobiyolojik standartlara uygun olmalıdır. Özellikle enjektabl olmayan ilaçların hazırlanmasında kullanılan deiyonize su mikrobiyolojik kontrollerden sonra kullanılmalıdır.
- Üretimin yapıldığı alana filtre edilmiş **hava** sevk edilmelidir.
- Eğitimli **personel** çalıştırılmalıdır.
- Uygun koşullarda paketleme-ambalajlama yapılmalıdır.

Ürünlerin rafta bekleme sırasındaki kontaminasyonları engellenmelidir.

4. İnsan Kaynaklı Kontaminasyon:



- İlacın el ile verilmesi ile gerçekleşen kontaminasyonda normal el florasında bulunan *Staphylococcus*, *Micrococcus* ve Diphtheroid basiller ilacın kontaminasyonuna yol açmakta, kontamine ilaçlar aracılığıyla organizmaya ulaşmaktadır.
- Çok dozlu ürünlerin kullanımı sırasında kontaminasyon oluşabilir.

Çapraz Kontaminasyon: Patojen bakterilerin ya da virusların kontamine bir yüzeyden başka bir yüzeye geçişine denir.

- Çalışan elinden ilaca,
- Kullanılan aletten ilaca
- İlaçtan ilaca, ilaçtan organizmaya olabilir.





- Kontaminasyonun yayılması;

Hastanede kullanılan malzeme kaynaklı olabilir.

Bu yüzden gerek hastanın kendisine, gerek hastadan hastaya ilaç kullanımında kaşıkların, iğnelerin, enjektörlerin ikinci kez kullanılmaması ve topik ürünlerin kullanımından sonra aplikatörlerin atılması-aplikatörlerin tek kullanımlık olması gibi yöntemlerle kontaminasyon yayılımını azaltılabilir.



5. Çevre Kaynaklı Kontaminasyon:



- Havada bulunan mikroorganizmalar çok az miktarda bile olsa ağız açık bulunan ilaçların üzerine yerleşebilir.
- Ev ve hastanelerde normalde mevcut olan mikroorganizma sayısı oldukça farklıdır. Ancak hastanelerde kullanılan ilaçlara patojen mikroorganizmaların bulaşma oranı çok daha fazladır.



- İlaçların açılıp kullanıldıktan sonra pek çoğunun sabit sayıda fakat yüksek oranda kontaminant içerdiği tespit edilmiştir.
- 1965 yılında İsveç Ulusal Sağlık Heyeti'nce yapılan bir araştırmada; non steril olarak üretilen ilaçların üretiminden hemen sonra mikrobiyolojik kalite kontrolleri yapıldığında, pek çok mikroorganizmanın varlığı tespit edilmiştir.
- Günlük kullanılan tabletlerin çoğunda *Bacillus subtilis*, bira mayası ve küflere rastlanmıştır.

- Hastanelerde kullanılan non steril ürünlerdeki kontaminasyon oranlarıyla ilgili 1971 yılında The Public Health Laboratory Service tarafından yapılan bir çalışmada numunelerin % 18'inde 10^4 cfu/0.1ml-g 'ın üzerinde mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir.

Bunların % 2,7' sinde *Pseudomonas aeruginosa* saptanmıştır.

- Buna karşılık evde kullanılan ilaçların kontaminasyon oranı az olduğundan patojen m.o. ve kontaminanta maruz kalma olasılıkları düşüktür.

İlaçlarda Mikrobiyolojik Bozulma ve Korunma

Bir farmasötik preparatın;

- Patojen veya potansiyel patojen mikroorganizma içermesi
- Mikroorganizmanın toksik metabolik artıklarını bulundurması
- Belirgin ve açık şekilde fiziksel ve kimyasal değişiklik içermesi halinde o preparat mikrobiyolojik açıdan tamamen bozulmuş olarak kabul edilir.

Farmasötik Preparatlarda Karşılaşılan Mikroorganizmalar

Kontamine olan bir ilacın içerdiği mikroorganizma türleri; hava, su, insan, hayvan ve bitkisel flora ya bağlı olarak değişir.

- ❖ **Aerop sporlu basiller**, rastlanılan mikroorganizmaların başında gelir. *Bacillus anthracis* hariç çoğunluğu saprofit bakterilerdir. Spor şekilleri özellikle ısıya ve antimikrobik ajanlara karşı dirençlidir.
- ❖ **Gram (-) basiller** kontamine prep.larda bulunabilecek bir diğer bakteri grubudur. *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* ile *Pseudomonas* grubu mikroorganizmalar sayılabilir.

Bu mikroorganizmaların çoğu oportunisttir (potansiyel patojen).

İnsan ve hayvan normal mikroflorasında bulunan bu bakteriler, buldukları ortam dışına çıktıklarında patojenite kazanır. Bu mikroorganizmalar biyolojik orijinli hammaddelerde çoğunlukla bulunabilir ve bunları içeren kuru preparatlar da intestinal orijinli kirlilik belirtisi olarak saptanabilirler.

Dear Optimist, Pessimist,
and Realist,
While you guys were busy
arguing about the glass of
water, I DRANK IT.
Sincerely,
the Opportunist

❖ **Gram (+) koklar** (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *D* grubu *Streptococcus*)

❖ **Maya ve Küfler** (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*)

ilaçlarda karşılaşılan mikroorganizmalar arasında yer alır ve bunlarında çoğu ısıya dirençlidir.

- İlaçların mikrobiyolojik kontaminasyonlarının önemi anlaşıldıktan sonra, ilaçlarda bulunabilecek mikroorganizma miktarı sınırlanmak istenmiştir.
- Bu amaçla **Uluslararası Eczacılık Federasyonu (FIP)** steril olma zorunluluğu olmayan farmasötik preparatların mikrobiyolojik saflığı konusundaki genel problemleri içeren bir rapor yayınlamıştır.

Farmasötik Preparasyon Grupları ve Mikrobiyolojik Saflık Dereceleri

Kategori	Farmasötik Şekil	İzin verilen mikroorganizma miktarı
1a	Enjektabl preparatlar	Mutlaka steril ve apirojen
1b	Oftalmik preparatlar	Steril
2	Yaralı deriye uygulanan prep Kulak, burun ve boğaz prep Jinekolojik prep İnhalasyon prep Oral ve diğer yolla uygulanan prep	Canlı mikroorganizma miktarı gr ya da ml' de 10^2 kob/ml-gr'yi geçmeyecek. <i>Enterobacteriaceae</i> familyasına ait m.o' lar ile <i>P.aeruginosa</i> ve <i>S.aureus</i> bulunmayacak.
3	Kozmetik ürünler	Canlı m.o miktarı: aerob bakteriler için : $10^3 - 10^4$ kob/ml-gr Her türlü durumda; Patojen bakteri ve mantar İÇERMEYECEK! 1 gr veya ml' de <i>Salmonella</i> bulunmayacak. 1 gr veya ml' de <i>P. aeruginosa</i> bulunmayacak. 1 gr veya ml' de <i>S.aureus</i> bulunmayacak.

- Şüphesiz organizma, salyanın bakterisid etkisi, mide asiditesi ve enzimleri, pankreas öz sayu, safra, kıl, deri, göz yaşı, kalın barsaktaki normal flora ile buraya tesadüfen gelen mikroorganizmalar arasındaki rekabet vs. gibi mikroorganizmalara karşı savunma araçlarıyla donatılmıştır.
- Bununla beraber, bazı patolojik hallerde bu savunma mekanizması bozulmakta, ilaçlar yoluyla gelen mikroorganizmaların vücuda yerleşmesin kolaylaşmaktadır.

Farmasötik Formların Mikrobiyolojik Saflığını İnceleme Yöntemleri

İlaçların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılan yöntemlerin aşağıda belirtilen maddeleri kapsamaması gerekir.

Metotlar:

- ❖ Özellikle ilaçların karakteristik özelliklerine bağlı olarak incelenmesi sağlanmalıdır.
- ❖ Bileşimi oluşturan maddelerden her birinin tabiatına ve ürünün eriyebilirlik özelliğine dayanmalıdır.
- ❖ Analize alınan numunede antibiyotik varlığını saptayabilmelidir.
- ❖ İlaçta mevcut kontaminasyon derecesini belirleyebilmelidir.
- ❖ Mikrobiyolojik analizde kullanılacak olan bütün reaktifler, besiyeri ve diğer tüm malzemeler steril olmalıdır.

Numunelerin Ayrılması

- ❖ Numuneler, analize başlamadan önce asepsi ve antisepsiye uyarak ayrılmalı ve bütün deneylerin yapılmasına, gerekirse tekrarlanabilmesine yetecek miktarda olmalı.
- ❖ Her deneme için 10 gr ya da ml numune alınması önerilir. Çok pahalı veya güç temin edilebilen numunelerde ise minimum 1 gr ya da ml olmalıdır.
- ❖ 10 gr alınabilen numunelerde mümkünse aynı seriye ait 3 ayrı ambalajdan toplam 10 gr numune alınmalıdır.

Numunelerin Hazırlanması

a) Suda eriyebilen numuneler :

Numunelerin pH'ı 7 olan fosfat tamponu ile % 10 luk homojenizat olacak şekilde süspansiyonu hazırlanır.

b) Suda erimeyen fakat yağlı olmayan numuneler :

İncelenecek numunedan 10 gr tartılır ve üzerine yaklaşık 85 ml pH 7 olan fosfat tamponu (tween 20 veya 80 gibi bir yüzey aktif madde içeren) ilave edilerek homojen bir karışım hazırlanır. Aynı tampondan ilave dilerek 100 ml' ye tamamlanır. Karışım iyice homojenize edilir.

c) Yağlı numuneler:

İçerisinde cam boncuk ve 10 gr Polysorbate 20 veya 80 bulunan steril bir erlene incelenecek pomat, krem, losyon vs gibi numunelerden 10 gr steril koşullarda alınır. Öncelikle 40°C' ye kadar su banyosunda bir pilot tüp yardımıyla ısıtılır. Karıştırılır. 40°C' ye kadar ısıtılmış tampon solüsyondan 80 ml ilave edilir. Karıştırılır. Hazırlanan homojenizatın pH' ı kontrol edilir.

Mikroorganizma Sayım Yöntemleri

- 1) Agar plaklarında Sayım
- 2) Filtrasyon ve membranlar üzerinde kültüre ederek sayım
- 3) Seri tüplere ekerek ve statik değerlendirme ile sayım

Numunelerde yapılacak mikroorganizma sayımları için çeşitli besiyerleri kullanılır.

Total bakteri sayımında :

Casein-peptone Soya Agar (CSA) veya Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA)

30-300 koloni sayılır

Maya ve küf sayımı için:

Antibiyotikli Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

10-100 koloni sayılır

Enterobacteriaceae için:

Mac Conkey Agar (MCA) veya Eosine Metilen Blue agar (EMB)

besiyerleri kullanılır.

30-300 koloni sayılır

- Bu besiyerleri uygun koşullarda hazırlanıp steril edildikten sonra 37°C'de 1 gece bekletilerek sterilizasyon kontrolleri yapılır. Kullanılacağı zaman 90°C'nin üzerinde su banyosunda eritilir ve 45 - 50°C'ye soğutulularak kullanılır.
- Analize alınacak farmasötik preparatlardaki m.o türlerinin tayini için selektif besiyerlerinin [Salmonella-Shigella Agar (SS Agar)] kullanımı gerekir. İzole edilme olasılığı düşük olan m.o lar içinse zenginleştirme besiyerlerinden (Selenit F) yararlanır.

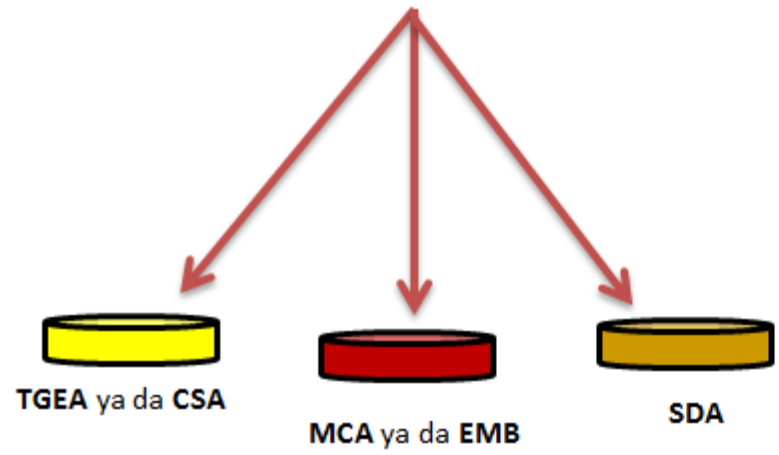
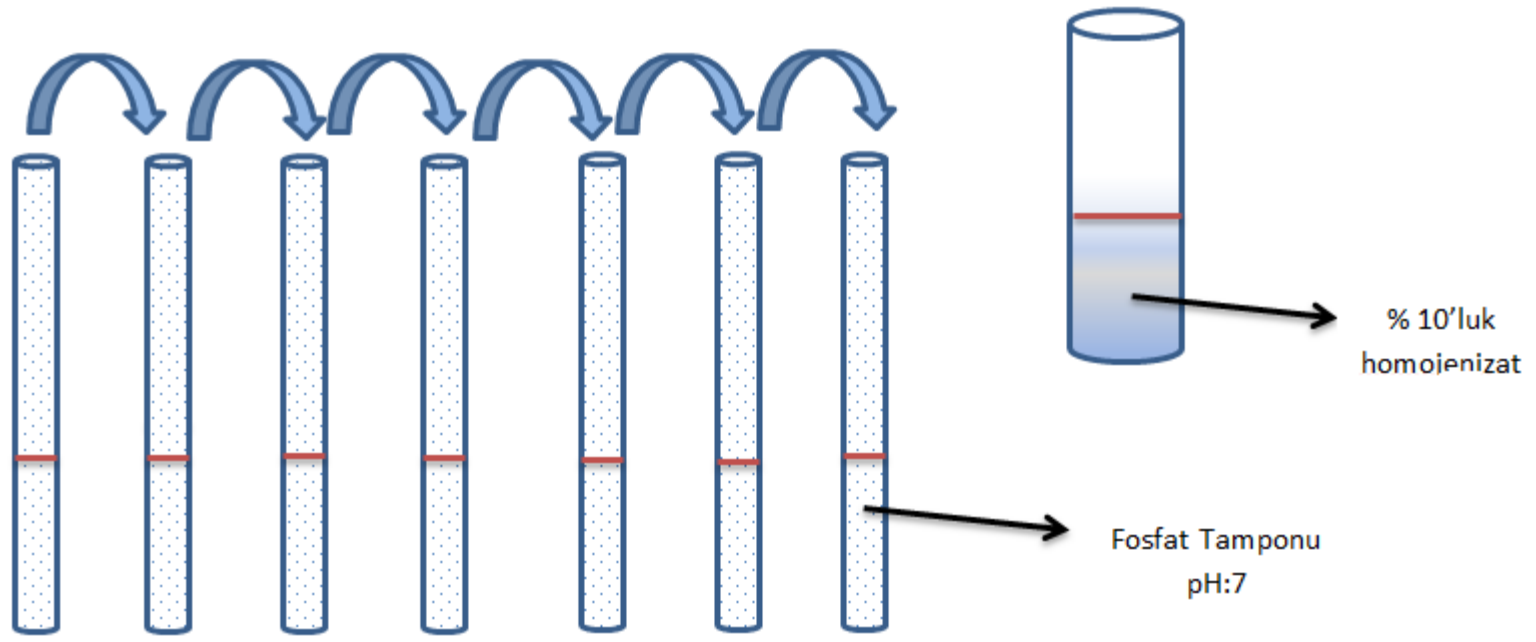
Mikroorganizma Sayım Yöntemleri

1) Agar Plaklarında Sayım

Hazırlanan % 10 luk homojenizat muhtemel bulaş derecesine göre pH:7 fosfat tamponu ile bir seri dilüsyonu hazırlanır. Her dilüsyondan 1'er ml alınarak 3 ayrı petri kutusuna aktarılır. Üzerlerine daha önceden eritilip 45-50 °C' ye soğutulmuş 15ml besiyeri dökülür numune ve besiyerinin homojen bir şekilde karışması için rotasyon ile çalkalanır ve donması beklenir. Donduktan sonra besiyerlerinden 6-7ml daha ilave edilir ve yüzeyde bir tabaka olacak şekilde dondurulur. Petriler 30 – 35 °C 'de inkübe edilir. 2-5 gün sonra koloniler sayılır.

Numunenin 1 gr ya da ml' deki aerob bakteri miktarı dilüsyon faktörü de hesaba katılarak saptanır.

Sayımlarda 30- 300 arasında koloniler sayılır. Koloni sayısı 300' ü geçmemelidir. 300' den fazla ise dilüsyon arttırılmalıdır. 30' un altında ise kontaminasyondan kaynaklanabileceği düşünülerek deney tekrarlanmalıdır.



- Maya ve küf sayımı için kloramfenikol, tetrasiklin, penisilin G gibi antibiyotiklerden birkaçı ilave edilmiş Sabouraud Dekstroz Agar kullanılır.

Maya ve küf sayımında plaklar 20-25 °C' de inkübe edilir. 2-5 gün sonra koloniler sayılır.

Numunenin 1gr ya da ml' deki maya ve küf miktarı dilüsyon oranı ile çarpılarak saptanır. Maya ve küf için 10 -100 arası küf kolonileri içeren petriyer dikkate alınmalıdır.

2) Filtrasyon ve membranlar üzerinde kültüre ederek sayım

Bu yöntem **suda eriyen** numuneler için kullanılır. Numunenin %10 luk homojenizatı hazırlanır. Bundan dilüsyonlar hazırlanır. Her bir dilüsyon gözenek çapı 0,45 µm olan membran filtreden süzülür. Membran filtreler içinde CSA veya TGEA besiyeri dökülüp dondurulmuş petrilerdeki besiyerlerinin yüzeyine dikkatlice ve steril penslerle tutularak yerleştirilir.

Maya ve küf sayımı da içinde antibiyotikli SDA besiyeri bulunan petrilerle aynı Şekilde yapılır. Petriler uygun inkübasyon sıcaklıklarında belirli srelerde tutulur.

Bu srenin sonunda tespit edilen m.o sayısı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 gr ya da ml' deki değer belirlenir.

3) Seri tüplere ekerek ve statik değerlendirme ile sayım

Gram ya da ml'sinde 100 den az m.o. içeren ve kolaylıkla kontamine olabilen farmasötik preparatlarda veya hammaddelerde gerçek ya da gerçeğe yakın sayım yapabilmek için kullanılan bir yöntemdir.

Bu yöntemde besiyerlerinin sıvı şekilleri kullanılır.

Numunenin % 10 luk homojenizatı ve dilüsyonları hazırlanır.

Pepton – Kazein Soya Buyyon (CSB) ve Saboraud Dekstroz Buyyon (SDB) besiyerlerine her bir desimal dilüsyondan 1' er ml ekilir. CSB besiyerine ekilen numuneler 35°C ve SDB besiyerine ekilenler 25 °C de inkübasyona bırakılır.

Tüpte görülen bulanıklık üremenin olduğunu gösterir.