

Derleme Makaleler

Pharmacia-JTPA
24: 51 (1), 47-52, 1984

STERİL OLMA ZORUNLULUĞU OLMAYAN FARMASÖTİK FORMLARIN MİKROBİYOLOJİK SAFLIĞINI İNCELEME YÖNTEMLERİ

Ahmet AKIN (*)

Özet:

Bu çalışmada; Uluslararası Eczacılık Federasyonu tarafından önerilen, steril olma zorunluluğu olmayan farmasötik formların mikrobiyolojik saflığı inceleme yöntemleri ile tarafımızdan yapılan modifikasyonlar açıklanmıştır. Bu modifikasyonların, yurdumuzda ilaçların mikrobiyolojik analizleri üzerinde çalışan kişilere faydalı olacağını umuyoruz.

METHODES D'ETUDE DE LA PURETE MICROBIOLOGIQUE DES FORMES PHARMACEUTIQUES NON OBLIGATOIREMENT STERILES

Résumé:

Dans cette recherche, nous avons expliqué les méthodes d'étude de la pureté microbiologique des formes pharmaceutiques non obligatoirement stériles qui ont été proposées par la Fédération Internationale Pharmaceutiques (F.I.P.) et notre modifications. Nous espérons que ces notre modifications soient utiles pour les personnes qui travaillent sur l'analyse microbiologique des médicaments en Turquie.

GİRİŞ

Bu güne değin yurdumuzda yayınlanmış olan Farmakopeler incelendiğinde; farmakopeye giren ilaçların kimyasal özellikleri ile ele alındığı ve kimyasal analiz yöntemlerinin açıklandığı görülür.

Oysa 1963 yılında oral veya lokal yolla kullanılan kontamine farmasötik formların bazı enfeksiyonlara neden olduğu (1); Pseudomonas aeruginosa içeren bir göz damlasının yaygın göz hastalıkları oluşturduğu (2); oral yolla alındıktan sonra ortaya çıkan gıda tipi enfeksiyon-

(*) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Tandoğan, Ankara

larda Salmonella'lar (3); diğer bazı enfeksiyonlarda da Enterobacteriaceae familyasına ait mikroorganizmalar ile Pseudomonas spesiesleri ve diğer Gram (-) basillerin sorumlu tutulduğu (4, 5, 6, 7) bildirilmektedir.

Bu nedenle, yurdumuzda üretilen ilaçların mikrobiyolojik analizlerinde yararlanılabilecek yöntemlerin zaman geçirilmeden saptanması ve bu yöntemlere farmakopelerimizde yer verilmesi gerekmektedir.

Uluslararası Eczacılık Federasyonu (F.I.P.) 1972 yılında steril olma zorunluluğu olmayan farmasötik preparatların mikrobiyolojik saflığı konusunda genel problemleri içeren bir rapor yayınlanmıştır. (8). Bu rapor ilaçların mikrobiyolojik saflığı konusunda önerilen genel hükümleri ve mikrobiyolojik analiz yöntemlerini içeriyordu. Daha sonra yapılan çalışmalar ile pratikteki uygulamalar sonucu elde edilen yeni veriler dikkate alınarak bazı modifikasyonlar yapılmış ve bunlar 1975 yılında ikinci bir rapor halinde yayınlanmıştır.(9).

Bu çalışmada; Uluslararası Eczacılık Federasyonu'na önerilen ilaçların mikrobiyolojik analiz yöntemleri ile, laboratuvarcı açısından yapılmasında fayda umduğumuz modifikasyonları bildirmeye çalıştık. Bu noktadan hareketle, çalışmamızın tüm yurt çapında uygulanabilecek yöntemlerin saptanmasında, yapılacak yöntem standardizasyonunda faydalı olacağı ümidini taşımaktayız.

YÖNTEMLER

2.1. Genel Bilgiler:

İlaçların mikrobiyolojik analizlerinde geliştirilecek yöntemlerin aşağıda belirtilmiş olan özellikleri kapsamı gerekmektedir.

a- Metodlar; Özellikle ilaçların karakteristik özelliklerine bağlı olarak incelenmesini sağlamalıdır

b- Bileşimi oluşturan maddelerden her birinin tabiatına ve ürünün eriyebilirlik özelliğine dayanmalıdır.

c- Analize alınan farmasötik formda

antibiyotik hassa mevcudiyetini saptayabilmelidir.

d- ilaçta mevcut bulaş (kontaminasyon) derecesini belirleyebilmelidir.

Ürünün (ilaç veya hammadde) tabiatına göre, numuneler dilüe olabilmeli, eriyebilmeli, emülsiyon veya suspansiyon yapılabilmelidir.

İncelenen ürünün varsa antimikrobik özelliğinin saptanmasında, numuneye belirli oranda ve yine belirli bir mikroorganizma ilave edilmeli, sonra bu mikroorganizmanın mevcudiyeti incelenmelidir. Eğer antimikrobik özellik varsa, dilüsyon, nötralizasyon ve filtrasyonla elimine edilerek ortaya çıkarılabilir.

2.2. Numunelerin Ayrılması:

Numuneler analize başlamadan önce asepti ve antisepsiye uyarak, bir başka deyişle işlemler sırasında çevreden yabancı mikroorganizmalar bulaştırılmadan ayrılmalı ve bütün denemelerin yapılmasına gerekirse yinelenbilmesine yetecek oranda olmalıdır.

Her deneme veya grup denemeler için prensip olarak 10 g (veya 10 ml) numune alınmalıdır. Çok pahalı veya güç temin edilebilen numunelerde ise bu oran minimum 1 g (veya 1 ml.) olmalıdır. 10 g alınabilen numunelerde mümkünse aynı seriye ait 3 ayrı ambalajdan alınmalı ve birleştirilerek 10 g'a tamamlanmalıdır.

2.3. Numunelerin Hazırlanması:

Bütün reaktifler, besiyerleri ve kullanılan tüm malzemeler steril olmalı ve denemeler sırasında bir bulaş olasılığından kaçınmak için, işlemler uygun koşullarda ve ortamlarda gerçekleştirilmelidir.

İncelenecek mikroorganizmaları belirleyebilmek için, küçük miktarlardan başlayan bir homojenizat hazırlanmalı mekanik yöntemlerin yardımıyla numuneler emülsiyon veya suspansiyon yapılabilmelidir.

3. Mikroorganizma Sayım Yöntemleri

Bu maksat için genellikle aşağıda belirtilmiş olan yöntemlerden yararlanılmaktadır.

a- Agar plaklarında sayım,

b- Filtrasyon ve membranlar üzerinde kültüre ederek sayım.

c. Seri tüplere ekerek ve statik değerlendirme ile sayım (Most Probable Number: En Yüksek Yaklaşık Sayım).

İncelenecek numeneler ve bunların hazırlanması, uygun bir besiyeri ve tekniği gerektirecektir. Suda eriyebilen ve filtre edilebilen numuneler için, bir meb-randan filtre edilmesi yöntemi seçilirken, aynı yöntem suda erimeyen numuneler için geçerli değildir. Seri tüplere ekme yöntemi, numunelerdeki gerçek jerm miktarının saptanmasında çok yararlı olan bir yöntemdir.

3.1. Suda Eriyebilen Numuneler.

3.1.1. Numenelerin Hazırlanması:

Numenelerin, aşağıda formüle edilmiş olan ve pH'sı 7.0 olan bir tampon solüsyon ile, bir solüsyon veya dilüsyonu hazırlanmalıdır. % 10 homojenizat olacak şekilde her 100 ml. tampon solüsyon için 10 g veya 10 ml numune kullanılır. Son pH'nın 7.0'ye yakın olduğundan emin olunmalıdır.

Monopotasylum fosfat:	3.56 g
Disodyum fosfat 2 H ₂ O:	7.23 g
Sodyum klorür:	4.30 g
Pepton:	1.00 g
Distile su:	1000 ml.

pH: 7.0 ye ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. İstenirse % 0.1-1.0 Polysorbate 20 veya 80 ilave edilir.

3.1.2. Agar Plaklarında Sayım:

Hazırlanan % 10 homojenizat veya suspansiyondan hareketle, muhtemel bulaş derecesine göre, yukarıda belirtilmiş olan tampon çözelti ile birbirini takibeden desimal dilüsyonlar hazırlanır. Böylece bulaş derecesi basitleştirilerek değerlendirilmiş olur.

Bu tekniğe göre petri Kutusunda 2 agar tabakası oluşturulmaktadır. İlk tabaka temel tabakadır.ve petri Kutusuna Pepton Kazein - Soya Agar (CSA) besiyerinden 13-15 ml ilave edilip dondurularak elde edilir.

Yukarıda hazırlanış şekli bildirilen her bir desimal dilüsyondan 1 ml alınarak, eritilmiş ve 45°C'ye soğutulmuş 7 ml CSA besiyeri içeren tüplere ekilir. Tüpler karıştırılır ve zaman geçirmeden temel tabakanın yüzeyine yayılır, donmaya

terkedilir.

Pepton Kazein - Soya Agar (CSA)

Besiyeri

Kazein Tripsinik Pepton:	15.0 g
Soya Papainik Pepton:	5.0 g
Sodyum klorür:	5.0 g
Dekstroz:	2.5 g
Agar - agar:	15.0 g
Distile su:	1000 ml

pH: 7.2 ± 0.2'ye ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Bu yöntemde, temel tabaka Petri Kutusu içinde önceden hazırlanıp dondurulmakta ve numunenin ekildiği CSA besiyeri bu tabakanın yüzeyine yayılmaktadır. Oysa 7 ml agar içeren bir besiyerine 1 ml numune ilave edildiğinde bu karışım temel tabakanın yüzeyinde yarı katı halde kalmaktadır. Bu da inkübasyondan sonra koloni sayımı ve ayırımı güçleştirmektedir. Oysa yaptığımız incelemeler sonucu aşağıda açıklamaya çalıştığımız modifikasyonun kullanılmasının daha olumlu sonuç verdiğini gözledik.

Tarafımızdan uygulanan bu modifikasyonda: temel tabakayı daha önceden hazırlamak yerine, içinde 13-15 ml CSA besiyeri bulunan tüplere, her bir desimal dilüsyondan 1 er ml ekilip, iyice karıştırıldıktan sonra boş ve steril Petri Kutularına aktarılmakta, düz günce donmaları sağlanmaktadır. Daha sonra 7 ml CSA besiyeri ilk tabakanın yüzeyine yayılmakta, böylece dışardan düşen mikroorganizmalar ile numunelerde daha önce var olan mikroorganizmaların da ayırımı mümkün olmaktadır. Çünkü çalışmaya, yapılan manipulasyonlara ve çalışılan yerdeki hava cereyanı vs. ye bağlı olarak dışardan düşen mikroorganizmalar ikinci tabakanın yüzeyinde, buna karşın numunede mevcut mikroorganizmalar ise iki tabaka arasında üremektedir.

Petriler 30-35°C de inkübe edilir ve 2-5 gün sonra koloniler sayılır. Numunenin 1 g veya 1 ml sindeki aerop bakteri miktarı, dilüsyon faktörü de hesaba katılarak saptanır. Yalnız Petrilerde sayılan koloni adedinin 300 ü geçmemesi gerekir.

Maya ve Küf Sayımı: Aynı yöntem; bakterilerin üremesini engellemek için Chloramphenicol, Tetracycline ve Penicillin G gibi antibiyotiklerden biri veya birkaçı ilave edilmiş "Saburo Dekstroz Agar (SDA)" gibi uygun bir besiyeri ile tekrarlanmasıyla yapılabilir.

Maya ve küf sayımında da yukarıda önerdiğimiz modifikasyonun uygulanması olumlu sonuç vermektedir.

Saburo Dekstroz Agar (SDA) Besiyeri

Pepton	: 15 g
Dekstroz	: 40 g
Agar-Agar	: 15 g
Distile su	: 1000 ml

pH: 5.6 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanır ve 121°C de 15 dakika sterilize edilir. Filtrasyonla sterilize edilmiş olarak 100 mg Penicillin G ve 100 mg Tetracycline veya sterilizasyondan önce her bir litre için 50 mg Chloramphenicol ilave edilir.

Plaklar -20-25°C de inkübe edilir. 2-5 gün sonra koloniler sayılır. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin bulunabilme olasılığı dikkate alınarak, bir yanlışlığı düşmemek için, maya kolonilerinden mikroskopik preparat hazırlanarak kontrol edilmelidir.

Numunenin 1 g veya ml'indeki maya ve küf miktarı, dilüsyon faktörü hesaba katılarak saptanır. Gerekirse küf kolonilerinden hareketle tip tayinine de gidilebilir. 50-100 küf kolonisi içeren plaklar dikkate alınmamalıdır.

3.1.3. Filtrasyon ve Membranlar Üzerinde Kültüre Ederek Sayım:

Önce numunenin, 3.1.1 de belirtildiği gibi % 10 homojenizati hazırlanır. Bundan desimal dilüsyonlar yapılır. Her bir dilüsyon iyice karıştırılır ve gözenekleri 0.45 µm olan bu membrandan sıratlı bir sistem yardımıyla filtre edilir.

Membran filtreler içinde CSA besiyeri bulunan 10 cm çapındaki Petri Kutusundaki besiyerinin yüzeyine yerleştirilir.

Bu yöntemde numunelerin filtre

edildiği membran filtreler Petri Kutusundaki CSA besiyerinin yüzeyine konmaktadır. Oysa mevcut mikroorganizmaların üreyebilmeleri için, besiyerindeki besin unsurlarından yararlanmaları gerekmektedir. Filtre besiyerinin yüzeyine yerleştirildiğinde, mikroorganizmalar besin unsurlarından yararlanmaları mümkün değildir. Hal böyle olunca, membran filtrelerin ince bir besiyeri tabakası içeren steril Petri Kutularına konmaları ve üzerine CSA besiyeri ilave edilerek donmaya terk edilmeleri daha olumlu sonuç vermektedir.

İnkübasyon ve aerop bakteriler sayımı yukarıda açıklandığı gibi yapılmaktadır. Yalnız gerçek bir sayım için membranların 200 koloniden fazla içermemesi gerekir.

Maya ve Küf Sayımı: Bunun için ikinci bir seri desimal dilüsyon alınarak aynı şekilde filtre edilir ve membranlar içinde antibiyotikli SDA gibi uygun bir besiyeri bulunan Petri kâğıtlarına yerleştirilir.

Maya ve küf sayımında yukarıda söz konusu ettiğimiz modifiye yöntemin kullanılması olumlu sonuç vermektedir.

Maya ve küf sayımında inkübasyon ve sonucun değerlendirilmesi, 3.1.2 bölümünde açıklandığı gibi hareket edilerek yapılır.

3.2. Suda Erimeyen Fakat Yağlı Olmayan Numuneler

3.2.1. Numunelerin Hazırlanması:

İncelenecek numuneden 10 g tartılarak ve üzerine yaklaşık 85 ml tampon çözelti ilave edilip, homojen bir süspansiyon hazırlanır. Aynı tampon çözeltiden ilave edilerek 100 ml ye tamamlanır. Mekanik bir yolla karışım iyice homojenize edilir.

Numuneden süspansiyon hazırlanmasında, suyun analize alınan maddede yayılması güçlük arzedebilir. O takdirde örneğin % 0.1 Polysorbate 20 veya 8 gibi uygun bir tansiyoaktif madde, tampon solüsyon içersine ilave edilir. Elde edilen % 10 luk homojenizatın pH sı kontrol edilerek, nötre yakın olduğundan emilim olmalıdır.

3.2.2. Agar Plaklarında Sayım:

Mevcut bulaş derecesine göre % 10 luk homojenizattan desimal dilüsyonlar hazırlanır. Her bir dilüsyondan 3.1.1 bölümünde belirtildiği gibi veya önerdiğimiz modifiye yöntem uygulanarak ekim yapılır. İnkübasyon ve sonucun değerlendirilmesi aynı şekildedir.

3.2.3. Seri Tüplere Ekerek ve Statik Değerlendirme ile Sayım:

Gramında 100 den az mikroorganizma içeren ve kolaylıkla kontamine olabilen ilaçlarda veya ham maddelerinde, gerçek veya gerçeğe yakın bir sayım yapabilmek için, numuneler seri tüplere ekilir. "Most Probable Number (MPN): En Yüksek Yaklaşık Sayım" yöntemiyle ve statik tablo yardımıyla sonuç değerlendirilir.

% 10 luk homojenizat ve desimal dilüsyonlar 3.2.1 bölümünde açıklandığı gibi hazırlanır. Pepton Kazein—Soya Buyyon (CSB) ve Saburo Dekstroz Buyyon (SDB) besiyerlerine her bir desimal dilüsyondan 1 er ml ekilir.

Pepton Kazein—Soya Buyyon (CSB)

Pepton (Tripsinik) 17.0g

Pepton (Papainik) : 3.0 g

Sodyum klorür : 5.0 g

Dipotasyum fosfat : 2.5 g

Dekstroz : 2.5 g

Distile su : 1000 ml

pH: 7.3±0.2

121° C de 15 dakika sterilize edilir.

Saburo Dekstroz Buyyon (SDB)

Pepton : 10 g

Dekstroz : 20 g

Distile su : 1000 ml

pH: 5.7±0.2

121 C de 15 dakika sterilize edilir.

Saburo Dekstroz Agar Besiyerindeki antibiyotikler ilave edilir.

CSB besiyerini ekilen numuneler 30–35 °C de ve SDB besiyerine ekilenlerde 20–25°C de inkübe edilir. 2–5 gün sonra her tüpte üreme olup olmadığı araştırılır. Çoğunlukla denemeye alınan numunenin ekildiği tüpte bulanıklık bu-

lunduğu gözlemlendiğinde, her bir kipten uygun bir katı besiyerine pasaj yapılır. Kesin okuma inkübasyondan 2–3 gün sonra yapılır.

3.3. Yağlı Numuneler

3.3.1. Numunelerin Hazırlanması

İçersinde cam boncuk ve 10 g Polysorbate 20 veya 80 bulunan steril bir erlene incelenecek pomat, krem, losyon vs. gibi numunelerden 10 g steril koşullarda alınır. Öncelikle 40 °C ye kadar su banyosunda, bir pilot tüp yardımıyla ısıtılır. Özenle karıştırılır. 40°C ye kadar ısıtılmış tampon solüsyondan 80 ml ilave edilir. Bir emülsiyon elde etmek için karıştırılır. Hazırlanan bu % 10 homojenizatın pH sı kontrol edilerek nötr veya buna yakın olduğundan emin olunmalıdır.

3.3.2. Agar Plaklarında Sayım:

3.1.1. ve 3.2.2. bölümlerinde açıkladığımız gibi hareket edilir.

3.3.3. Seri tüplere Ekerek Sayım:

Bölüm 3.2.3 de belirtildiği gibi uygulanır.

4. Spesifik Jermilerin İncelenmesi:

Analize alınacak olan farmosötik formlar, Enterobacteriaceae familyasına ait (Salmonella, Klebsiella, Shigella, Proteus spesiesleri, E.coli vs.) mikroorganizmalar ile Pseudomonas grubu ve özellikle Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus gibi spesifik ve insan sağlığı açısından önemi tartışmasız kabul edilen bakteriler yönünden de incelenmelidir.

İzole edilme olasılığı düşük olan mikroorganizmalar için zenginleştirme besiyerlerinden yararlanılabilir. Ayrıca mikroorganizma türlerine bağlı olarak değişen, selektif besiyerlerinin kullanımda faydalı olacaktır. Bu nedenle incelenen grup veya türlere ait tipik kolonilerin görülmesinden sonra, bu kolonilerden selektif besiyerlerine pasaj yapılmalıdır. Elde edilen verilerin doğrulanması için tipik koloniler; Agar, Kanlı Agar vs. gibi besiyerlerine pasaj yapılarak üretilmeli ve Oksidaz, Katalaz, Şekerleri fermentasyon, İndol, Voges—Proskauer,

Metil Kırmızısı, H₂S teşkili gibi biyöşimik reaksiyonlar uygulanmalıdır.

Ancak yukarıda söz konusu ettiğimiz işlemlerin tamamlanmasından sonra dır ki, analize alınan ilaç kabul veya reddedilebilir.

Sonuç olarak; çalışmanın giriş bölümünde de belirttiğimiz gibi, yurdumuzda üretilen veya üretilecek olan ilaçların mikrobiyolojik analizlerinde yararlanılabilecek yöntemler, yurdumuz koşullarında dikkate alınarak zaman yitirmeden saptanmalı ve bunlara Farmakopelerimizde yer verilmelidir. Böylece tüm yurttan analiz yöntemleri beraberliği sağlanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1— Dony, J. : "La qualité Microbiologique des Médicaments Matières Premières et Produit Terminés". Labo-Pharma-Problèmes et Techniques. 262: 113—121, 1977.
- 2— Dony, J.: "Microbiologie du Médicament". Bull.Acad. Méd. Bel, 131: 323—335, 1976.
- 3— Komarmy, L.E., Oxley, M.E.: "Hospital—Acquired Salmonellosis Traced to Carmine Dye Capsules". New Engl.J.Med., 276: 850—857, 1967.
- 4— Mitchell, R.G., Hayward, A.C.: "Postoperative Urinary Tract Infections Caused by Contaminated Irrigative Fluid". Lancet.1: 793—782, 1966.
- 5— Noble, W.C., Savin, J.A.: "Steroid Cream Contaminated With Pseudomonas aeruginosa". Lancet., 1: 347—354, 1966.
- 6— Devleeschouwer, M.J., Akın, A., Dony, J.: "Flore Microbienne de Médicaments—Données Ecologiques et Sensibilité aux Antibiotiques". J.Pharm. Belg., 35(4): 266—272, 1980.
- 7— Akın, A.: "İlaçların Mikrobiyolojik Standardizasyonu". J.Fac.Pharm. Ankara., 11 (1): 70—79, 1981.
- 8— Comité des Laboratoires et Services Officiels de Contrôle des Médicaments et de la section des Pharmaciens de L'industrie—F.I.P.: "Pureté Microbiologique des Formes Pharmaceutiques non Obligatoirement Stériles". 1^{er} Rapport., J.Mond.Pharm., 15: 88—96, 1972.
- 9— Comité des Laboratoires et Services Officiels de Contrôle des Médicaments et de la Section des Pharmaciens de L'industrie—F.I.P.: "Pureté Microbiologique des Formes Pharmaceutiques Non Obligatoirement Stériles". 2^{me} Rapport., Pharm.Acta Helv, 50: 285—292, 1975.