

STERİLİZASYON

■ FİGEN TIRNAKSIZ

Mikrobiyolojik yük (bioburden), bir üründe bulunan mikroorganizma (MO) sayısı ve türünü belirten bir ifadedir. Farmasötik Teknoloji açısından bakıldığında, üretilen formülasyon türlerinin içereceği en yüksek mikrobiyolojik yük değerleri farmakopelerde bildirilmiştir¹. Üretim sonrası saptanan mikrobiyolojik yükün izin verilene eşit veya daha az olması, üretimin ve/veya ürünün uygunluğunun bir kanıtı olarak kabul edilir. Özellikle parenteral ürün imalatı için bu durum çok önemlidir. Üretim sonrasında ve sterilizasyon öncesi yapılan mikrobiyolojik denetimlerde saptanan mikrobiyolojik yük, sterilizasyon koşullarına karar verilmesinde belirleyici olmaktadır².

Sterilizasyon, steril durumun oluşturulması için yapılan bir işlemdir. Steril durum, tüm yaşayan MO'ların uzaklaştırıldığını veya yok edildiğini belirten mutlak bir kavramdır. MO'ların ölüm kinetikleri nedeniyle bu kavrama ulaşamaz. Ancak sterilizasyon tekniğinin iyileştirilmesi ile bu duruma yaklaşma olasılığı artırılır³.

Kullanılan sterilizasyon yönteminin çok dikkatli seçilmesi gerekir. Kullanılacak yöntem, üründe herhangi bir bozulmaya neden olmayan en etkili yöntem olmalıdır. Mesela, ürün sterilizasyon sıcaklığında bozuluyor ise, formülasyona antibakteriyel bir madde ilave edilerek daha düşük sıcaklıkta sterilizasyon işlemini yapmak mümkündür³.

MO'ların, süzme ile yapılan sterilizasyon yöntemi hariç, sterilizasyon tekniklerine karşı gösterdikleri direnç farklı olmaktadır. Spor oluşturmış

MO'lar zorlayıcı koşullara karşı büyük bir direnç gösterirler ve çok dayanıklıdır. Bu nedenle seçilen sterilizasyon tekniği, MO'nun spor şeklini de yok edebilmelidir. Mesela sıcaklık uygulanarak yapılan sterilizasyonda ortamda nemin bulunması sıcaklığın sporlar üzerindeki öldürücü etkisini artırmakta ve ölüm süresini kısaltmaktadır (Tablo 5.1)³.

Sterilizasyon işlemi,

- sıcaklık uygulayarak
- kimyasal madde yardımıyla
- ürünü süzerek
- ışın (UV veya radyasyon) vererek yapılabilir.

Seçilen sterilizasyon işleminin başarısı ürünün MO yüküne (bioburden) bağlıdır. Ne kadar çok ve/veya dayanıklı MO var ise, bunları üründen uzaklaştırmak için o kadar çok enerji gerekir. Süzme işlemi, MO'ların öldürülmediği bir işlemdir. Gözenek çapının üstündeki hiçbir MO (canlı veya ölü) ürüne geçemez. Ancak diğer sterilizasyon tekniklerinde MO'nun hücre yapısı bozularak büyüme ve çoğalma faaliyetleri geri dönüşümsüz olarak tahrip edilir ve böylece MO ölür⁴.

Mikroorganizmaların Ölüm Kinetiği

D değeri: MO'ların ölümü birinci mertebeden kinetiğe göre olmaktadır (Eşitlik 5.1). Ölüm hızı, başlangıçtaki MO sayısı veya derişimi ile ilişkilidir.

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (5.1)$$

Bu eşitlikte k, MO'ların ölüm hız değişimini; $-dN/dt$, zamanla MO derişiminin azalma hızını; N, t zaman (mesela sterilizasyon süresi sonunda) sonra sabit sıcaklıkta (sabit gaz derişiminde veya gama radyasyon dozunda) yaşayan MO sayısını veya yükünü göstermektedir. Bu eşitliğin integrali alındığında 5.2-5.4 eşitlikleri elde edilir.

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (5.2)$$

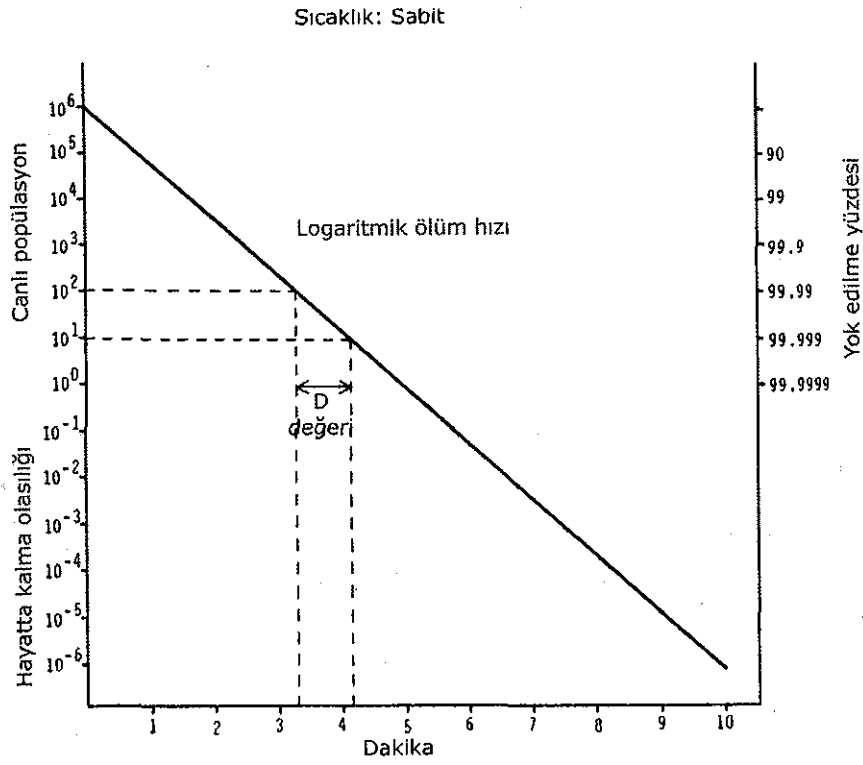
$$\ln N = \ln N_0 - kt \quad (5.3)$$

$$\log N = \log N_0 - kt \log e \quad (5.4)$$

Bu eşitliklerde N_0 ürünün sterilizasyon öncesi MO yükünü (bioburden) göstermektedir. N ve N_0 değerleri % olarak veya birim hacimdeki MO sayısı olarak alınabilir (Şekil 5.1). Anlaşılabacağı gibi, sterilizasyon öncesi ürünün MO sayısı ne kadar fazla ise, bunlardan kurtulmak için o kadar uzun bir zaman gerekmektedir.

Tablo 5.1 Sıcaklık ve/veya nemin bazı bakteri sporları üzerindeki öldürücü etki oluşturmaları için gerekli süre³

	Öldürücü etki için gerekli süre (dakika)					
	Nem varlığında			Nemsiz ortamda (kuru sıcak)		
Mikroorganizma	100°C	110°C	121°C	120°C	140°C	170°C
<i>Şarbon basili</i>	5-15	-	-	-	180	-
<i>Cl. botulinum</i>	330	90	10	120	60	15
<i>Cl. welchii</i>	5-10	-	-	50	5	7
<i>Cl. tetani</i>	5-15	-	-	-	15	-
<i>Toprak basili</i>	>1020	120	6	-	-	15

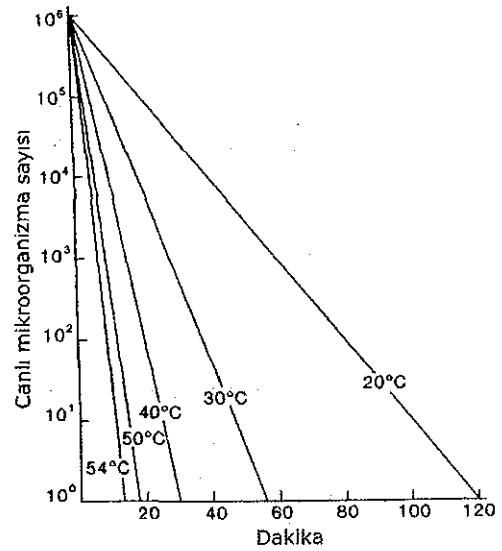


Şekil 5.1 Sabit sıcaklıkta mikroorganizmaların ölüm grafiği⁵

Şekil 5.1'de y eksenini % olarak alırsak, 10^6 değeri 100 mL'de 100 000 000 adet MO olduğunu, 10^0 (= % 100) değeri 100 mL'de 100 adet MO olduğunu; 10^{-2} (= % 1) değeri, 100 mL'de 1 adet MO olduğunu, 10^{-3} (= % 0.1) değeri 1000 mL'de 1 adet MO olduğunu, 10^{-6} (= % 0.0001) ise, 1000 L'de 1 adet MO olduğunu gösterir. Y eksenindeki 10^0 değerinin altındaki değerler üründe MO bulunma olasılığını ifade eder. Geçerli bir sterilizasyon işleminden sonra üründe MO bulunma olasılığının en fazla milyonda bir (10^{-6}) olması gerekir. Bu, üretilen birim sayısı açısından düşünülürse, ürünün steril olarak kabul edilebilmesi için 1000000 birim üründen en fazla bir tanesinde MO üremesinin kabul edilebileceği anlamına gelmektedir.

MO'ların başlangıç miktarında % 90 azalma, yani başlangıçtaki MO'ların % 90'ının ölmesi ve geriye % 10'unun kalması için geçen zaman "D" süresi olarak bilinir. D değerinin hangi sıcaklıkta olduğunu belirtmek için, sıcaklık değeri indis şeklinde yazılır (D_{121} , gibi). Sıcaklık, gaz derişimi veya radyasyon dozu arttıkça

MO'ların % 90'ının ölmesi için gerekli olan süre azalır, ölüm hızı değişmez büyür (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 B.subtilis var. niger sporlarının EtO gazı ile değişik sıcaklıklarda sterilizasyonu (EtO=1200 mg/L, bağıl nem=% 40)⁶

Başlangıçtaki MO sayısı 100 olarak kabul edilirse 5.2 eşitliği, aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$10=100e^{-kD} \quad (5.5)$$

$$\ln 10 = \ln 100 - kD \quad (5.6)$$

$$D = \frac{\ln 10}{k} = \frac{2.303}{k} \quad (5.7)$$

veya

$$\log 10 = \log 100 - kD \log e \quad (5.8)$$

$$D = \frac{\log 100 - \log 10}{k \cdot 0.434} \quad (5.9)$$

$$D = \frac{2.303}{k} \quad (5.9)$$

Mesela otoklavda 121°C'de 10 dakika tutulan bir parenteral ürünündeki MO sayısının, 4.10⁵'ten 2.10³'e indiği saptanmış olsun. D₁₂₁ değerini hesaplayabilmek için önce MO'ların ölme hız sabitlerinin hesaplanması gerekir. Bu amaçla 5.2 eşitliği kullanılır:

$$10^3 \ln 2 = 10^5 \ln 4 - k \cdot 10$$

$$k = 0.529 \text{ dakika}^{-1}$$

Daha sonra $D = \ln(10)/k = 2.303/k$ eşitliği kullanılarak D₁₂₁ değeri 4.35 dakika olarak hesaplanır.

Z Değeri: Bu değer D değerinde 10 kat değişiklik (1 log dilimi) olması için gerekli olan sıcaklık farkını belirtir. Mesela Z değeri 10°C denilince, bu ürünün sıcaklık değerinin 10°C artırılması ile D zamanının % 90 oranında azalacağı anlaşılır. Z sıcaklığının saptanabilmesi için sıcaklık değişimine bağlı olarak değişen D değerleri yarı logaritmik grafiğe geçirilir (Şekil 5.3). Görüldüğü gibi D zamanları ile sıcaklık arasında logaritmik olarak doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Buna göre 5.10-5.12 eşitlikleri yazılabilir.

$$D_2 = D_1 \cdot 10^{-k^{\oplus} (T_2 - T_1)} \quad (5.10)$$

$$\log D_2 = \log D_1 - k^{\oplus} (T_2 - T_1) \quad (5.11)$$

$$k^{\oplus} = \frac{\log D_1 - \log D_2}{T_2 - T_1} \quad (5.12)$$

Bu eşitliklerde k[⊕], D zamanının sıcaklığa bağlı olarak değiştiğini gösteren hız değişmezdir. D₁ ve D₂ zamanları T₁ ve T₂ sıcaklıklarında saptanmıştır. Buradan Z değerinin hesaplanabilmesi için eşitlik, D değerindeki % 90 azalmayı gösterecek şekilde getirilir (Eşitlik 5.13 ve Eşitlik 5.15).

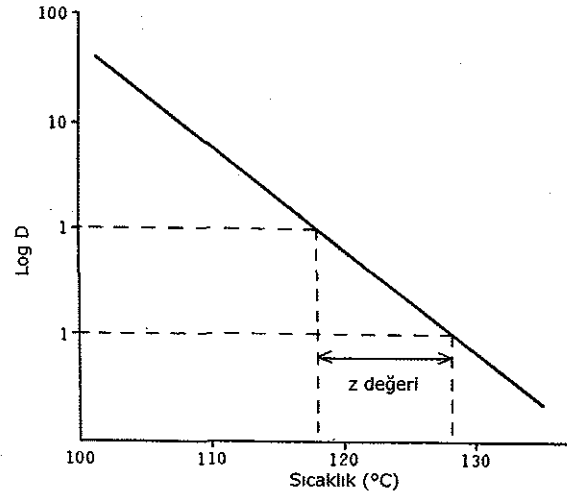
$$\log 10 = \log 100 - Zk^{\oplus} \quad (5.13)$$

$$Z = 1 / k^{\oplus} \quad (5.14)$$

k[⊕] yerine 5.12 eşitliği yerleştirildiğinde ise, 5.15 eşitliği elde edilir.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2} \quad (5.15)$$

Z değeri, sıcaklığa bağlı ölüm zaman doğrusunun eğiminin tersidir (Şekil 5.3).



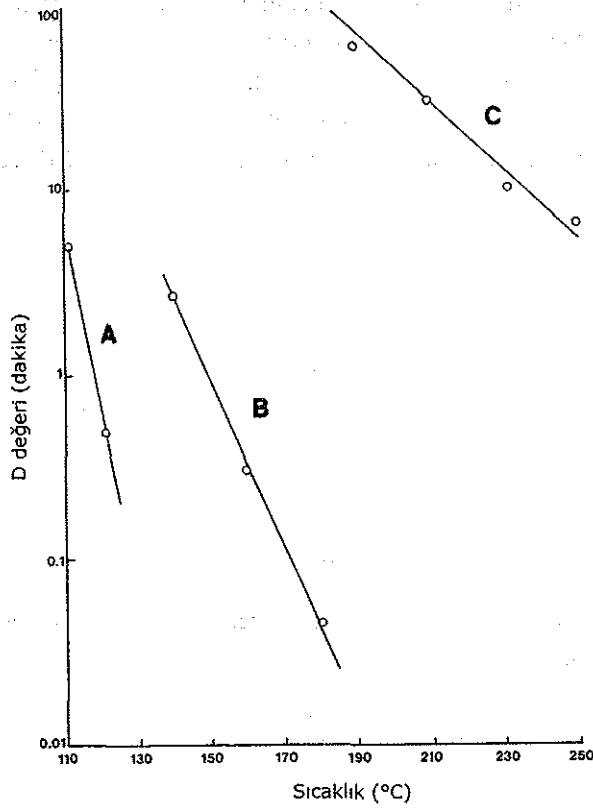
Şekil 5.3 Sıcaklığa bağlı ölüm zaman doğrusu⁵

Z ve D değerleri MO'ların süzme hariç diğer sterilizasyon koşullarına dayanıklılığının bir göstergesidir. Mesela Z değeri düşük olan bir MO'nun büyük olana göre sıcaklığa daha az dayanıklı olduğu düşünülür (Şekil 5.4).

Q₁₀ değeri: Sıcaklık katsayısı olarak bilinen bu değer, aralarında en az 10°C fark bulunan iki sıcaklıkta MO'ların ölüm hız değişmezlerinin oranıdır (5.16 eşitliği).

$$Q_{10} = k_2 / k_1 \quad (k_2 > k_1) \quad (5.16)$$

Bu değer süzme yöntemi dışındaki sterilizasyon tekniklerinde etkili olup, sıcaklık veya etilen oksit derişimi gibi değişkenlere bağlı olarak artar veya azalır.



Şekil 5.4 Sıcaklığa bağlı değişen D değerleri ve ilgili Z değerleri³ (A: *B. Stearothermophilus* sporlarının buhar sterilizasyonu için saptanmış Z değeri: 10°C, B: *B. Subtilis var niger* sporlarının kuru ısı sterilizasyonu için saptanmış Z değeri: 22°C, C: *E.coli* endotoksininin kuru ısı sterilizasyonu için saptanmış Z değeri: 54°C)

$F_{(T,Z)}$ değeri: Bu değer, sıcaklığın uygulandığı herhangi bir sterilizasyon yönteminde sterilizasyonun geçerli olması için gerekli olan sterilizasyon süresini göstermektedir. F değeri temel olarak:

- ürün kabının boyutu, şekli ve ısı geçirgenliğinden,
- ürünün hacmi ve viskozitesinden,
- sterilizasyon kazanına yerleştirilen birimlerin toplamının büyüklüğü ve yerleştirilme şekline etkiler.

Sterilizasyon sıcaklığı 121°C ve Z değeri 10°C ise, bu sıcaklık için gerekli olan sterilizasyon süresi, F_0 olarak gösterilir. F değeri iki farklı eşitlikle hesaplanabilir (5.17 ve 5.19 eşitlikleri).

$$F_{(T,Z)} = \int 10^{(T-121)/Z} dt \quad (5.17)$$

$$F_0 = \Delta t \sum 10^{(T-121)/10} \quad (5.18)$$

$$F_0 = D_{121} (\log N_0 - \log N) \quad (5.19)$$

F_0 ısı ile sterilizasyonun zaman/sıcaklık eğrisinin integrali alınarak hesaplanabilir (5.17 eşitliği). Bu amaçla genellikle 100°C'nin üzerindeki sıcaklık ve zaman değerlerine trapez kuralı uygulanarak eğri altında kalan toplam alan (F_0) hesaplanır (5.18 eşitliği). Burada dikkat edilmesi gereken nokta, T sıcaklığı olarak alınan sıcaklığın otoklav veya etüv sıcaklığı değil, ürünün sıcaklığı olmasıdır. Özellikle otoklav sterilizasyonunda otoklavın sıcaklığı ile ürünün sıcaklığının belli bir süre birbirinden farklı olacağı unutulmamalıdır (Şekil 5.5).²

Eşitlik 5.17'de görülen 121°C değeri farklı bir sıcaklık olarak alınabilir. Mesela kuru ısıda yapılan sterilizasyonda bu değer 170°C olarak alınmaktadır. Ayrıca Z değerinin de 10°C olması gerekmez. Z değeri MO'nun özelliğine göre seçilmesi gereken bir değerdir. Eşitlikteki $10^{(T-121)/Z}$ değeri ölüm hızını gösterir.

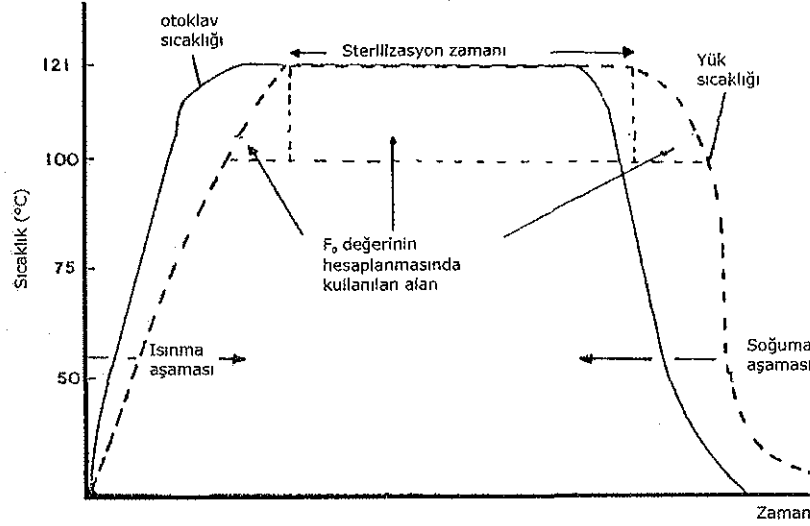
Eşitlik 5.18'de Δt değeri ürünün sıcaklık ölçümlerinin hangi zaman aralıklarında yapıldığını gösterir (her 2 veya 5 dakikada bir gibi).

Mesela 121°C de yapılan otoklav sterilizasyonu sırasında sterilize edilecek ürünün sıcaklığı, 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir ölçülüyor. Ölçümlerde sıcaklık değerlerinin sırasıyla 25°C, 110°C, 118°C, 128°C, 121°C, ve 100°C olduğu saptanıyor. Ayrıca önceden Z değeri 10°C olarak bulunuyor. Bu koşullarda yapılan otoklav sterilizasyon işleminin geçerli olabilmesi için F_0 değerinin,

$$F_0 = 5 \text{ dakika} (0 + 0.079 + 0.501 + 0.794 + 5 + 0.0079) = 31.91 \text{ dakika}$$

olması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Dikkat edilirse, 100°C'nin altındaki sıcaklık değerleri için hesaplanan $10^{(T-121)/10}$ değeri matematiksel olarak toplamın tümü üzerinde çok etkili olmamakta, dolayısıyla 100°C'nin altındaki sıcaklıklar için bu hesabın sonucunun sıfır olarak alınabileceği anlaşılmaktadır.

F_0 zamanının hesaplanması için kullanılan 5.19 eşitliği ise, ürünün mikrobiyolojik yükü (N_0) ve D_{121} süresi hesaplandıktan sonra kullanılabilen bir eşitliktir. Ürünün mikrobiyolojik yükünün fazla olması doğal olarak daha uzun süre sterilizasyon koşullarında kalmasını



Şekil 5.5 Buhar sterilizasyonunda sıcaklık/zaman eğrisi² (düz çizgi: otoklav sıcaklığı, noktalı çizgi: ürün sıcaklığı)

gerektirmektedir. Ayrıca sterilize edilecek ürün sadece tek bir MO türünü içermemektedir. Özellikle üründe sıcağa dayanıklı MO sporlarının (B.stearothermophilus sporları gibi) olabileceği düşünülmelidir. Bu nedenle sterilizasyon süresinin en kötü duruma göre ayarlanması gerekir².

Mikrobiyolojik yükü 10^2 ve D_{121} değeri 1 dakika olan bir ürünün steril olarak kabul edilebilmesi için MO sayısının 10^{-6} 'ya kadar inmesi veya steril olmama olasılığının 10^{-6} olması gerekir. Bu durumu sağlamak için F_0 değerinin 8 dakika olması yeterlidir.

$$F_0 = D_{121} (\log N_0 - \log N)$$

$$F_0 = 1 \text{ dakika} (\log 10^2 - \log 10^{-6}) = 8 \text{ dakika}$$

Yine 5.19 eşitliği ile uygulanan sterilizasyon süresinin yeterli olup olmadığı da hesaplanabilir. Mesela mikrobiyolojik yükü 10^2 ve D_{121} değeri 2 dakika olan bir ürün için 8 dakikalık sterilizasyon süresinin yetmeyeceği hesapla bulunabilir.

Inaktivasyon faktörü değeri (IF): Süzme hariç diğer sterilizasyon yöntemlerinde kullanılan IF değeri, sterilizasyon koşullarında t süresince kalan ve belli bir D değerine sahip MO'nun sterilizasyon öncesi sayısının, sterilizasyon sonrasında kaç logaritmik birim azaldığını gösterir⁷. Bu değer malzemenin MO yüküne bağlı olarak değişir. IF değeri 5.20 eşitliği ile hesaplanır. Mesela

mikrobiyolojik yükü 10^6 olan bir malzemenin otoklavda yapılan sterilizasyonunun geçerli olabilmesi için MO sayısındaki azalmanın 12 logaritmik birim yani 12 D olması gerekmektedir.

$$IF = 10^{12} \quad (5.20)$$

Mesela, D_{121} değeri 1.5 dakika olan bir bakterinin, 121°C 'de yapılan 15 dakikalık otoklav sterilizasyonu sonucunda sayısındaki azalma 10 logaritmik bölme kadardır. Eğer mikrobiyolojik yük 10^9 ise, 15 dakikalık sürenin sterilizasyon için yeterli olamayacağı anlaşılır.

IF değerinden hareketle F_0 değeri de hesaplanabilir⁷.

$$F_0 = D_{121} \log IF \quad (5.21)$$

Sterilizasyon yöntemleri

Sterilizasyon teknikleri temel olarak üç bölümde incelenmektedir^{3,8}:

I. Fiziksel sterilizasyon yöntemleri

Sıcaklığın uygulandığı sterilizasyon yöntemleri:

- Kuru ısı sterilizasyonu
- Doygun su buharı (saturated steam) ile sterilizasyon (yaş ısı sterilizasyonu)

Sıcaklığın uygulanmadığı sterilizasyon yöntemleri:

- UV ışını ile sterilizasyon
- İyonize radyasyon ile sterilizasyon
- Süzme ile sterilizasyon

II. Kimyasal sterilizasyon yöntemleri

Gaz sterilizasyonu:

- Etilen oksit (EtO) gazı ile sterilizasyon
- Hidrojen peroksit gazı ile sterilizasyon
- Klor dioksit gazı ile sterilizasyon

III. Aseptik yöntem

Sıcaklığın uygulandığı fiziksel sterilizasyon yöntemleri

Isı enerjisinin MO'lar üzerindeki öldürücü etkisi enerjinin şiddetine, malzemenin ısıda bekletilme süresine ve ortamda nemin bulunup bulunmamasına bağlıdır. Sıcaklığın artması ve nemin varlığı ısının öldürücü etkisini artırır. Ortamda nemin bulunması, düşük sıcaklıklarda sterilizasyon yapılmasına olanak vermektedir³.

Nemin olmadığı ortamda, sadece sıcaklık uygulanarak yapılan sterilizasyonda, ısı enerjisi MO hücresindeki protein ve nükleik asitlerin okside olmasına neden olur. Sıcak buhar kullanılarak yapılan sterilizasyonda ise, MO hücrelerindeki enzim ve nükleik asitler hidroliz olmaktadır. Daha büyük bir ısı enerjisine sahip olan buharın öldürücü etkisi, yoğunlaşması sırasında buharlaşma ısısını yoğunlaştığı yüzeye aktarmasından kaynaklanmaktadır⁹.

Sıcak kuru havanın 1 gramı 1 kalori ısı enerjisine sahip iken, 121°C'de 1 gram buhar 525 kalori ısı enerjisine sahiptir. Bu nedenle buharın malzemeleri ısıtma gücü kuru havanın yaklaşık 500 katıdır³.

Sıcaklığın uygulandığı sterilizasyon yöntemlerinde bir sterilizasyon döngüsü (sterilization cycle time) malzemenin ilgili sterilizasyon sıcaklığına gelmesi için geçen zamanı (gecikme süresi), bu sıcaklıkta bekleme süresini (sterilizasyon süresi) ve malzemenin oda sıcaklığına gelmesi için geçen zamanı (soğuma süresi) içermektedir.

Kuru ısı (dry heat) sterilizasyonu: Kuru ısı hem MO'ların, hem de MO'ların metabolik artıklarının (pirojenik maddeler) yok edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Doygun su buharı sterilizasyonundan çok daha yüksek sıcaklıkta yapılan pirojenlerin yok edilmesi işlemi, bu moleküllerin kimyasal olarak parçalanması esasına dayanır. Kuru ısı ile malzemedeki pirojenik maddeler yok

edildiğinde aynı zamanda sterilizasyon da sağlanmış olur. Buna karşılık, yaş ısı sterilizasyon koşulları pirojenik maddelerin parçalanmasını sağlayamaz. Kuru ısı sterilizasyonu için F değeri, D değeri ve Z değeri, ısıtılmış nem ile yapılan sterilizasyondan farklıdır. Kuru ısı ile yapılan sterilizasyon veya pirojenlerden kurtulma işlemi için genellikle aşağıda bildirilen koşullarda çalışılmaktadır⁸.

Sterilizasyon için:

160°C » 120 - 180 dakika

170°C » 90 - 120 dakika

180°C » 45 - 60 dakika

Pirojenlerin yok edilmesi için:

230°C » 60 - 90 dakika

250°C » 30 - 60 dakika

Yaklaşık 140°C'nin üstündeki sıcaklıklara dayanabilen malzeme veya maddeler kuru ısı sterilizasyonu ile etüvlerde sterilize edilebilir. 180°C de iki saat veya 260°C'de 45 dakika bekleme ile, başta sporlar olmak üzere MO'ların tümünün öldürülmesi mümkündür³. Mesela kuru ısı sterilizasyonuna dayanıklı olduğu bilinen *B. stearothermophilus* sporları ve *B. subtilis* sporlarının 150°C-160°C'de bir saat bekletilmeleri ölmeleri için yeterli olmaktadır¹⁰.

Kuru ısı sterilizasyonu için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda çoğu maddenin yapısında değişiklikler meydana gelir. Mesela selülozdan yapılmış malzemeler kömürleşmeye başlar, kauçuk oksitlenir ve termoplastikler erir. Bu nedenle kuru ısı sterilizasyonu, cam veya metal malzemeler, yüksek sıcaklıkta bozulmayan ve su içermeyen yağlar veya kimyasal maddeler için uygun bir sterilizasyon yöntemidir. Sterilizasyon sırasında bazı madde ve malzemelerin yüksek sıcaklıkta genişleyebilecekleri unutulmamalıdır. Özellikle cam malzemelerin sıkışarak kırılmasına neden olan bu durumun engellenmesi için malzemelerin yeterince aralık bırakılarak yerleştirilmesi; yağ ve benzeri maddelerin ise genişleyerek taşmalarını engellemek için uygun büyüklükteki kaplara konması gerekmektedir³.

Kuru ısı sterilizasyonunda malzemenin ısınarak sterilizasyon sıcaklığına gelmesi, sterilizasyon odasının ısınmasından daha geç olur. Sterilize edilecek malzeme-

nin çok olması, ısı geçirgenliğinin düşük olması veya ıslak olması sterilizasyon sıcaklığına erişme süresini etkileyen önemli özelliklerdir. Validasyon çalışmaları sırasında bu etkenlerin sterilizasyona etkisi dikkatle incelenerek işlemin her aşaması için gerekli olan süreler saptanır^{3,8}.

Malzemelerin sterilizasyon sıcaklığında bekleme süresi, sterilizasyon odasının en soğuk noktasının saptanması ile belirlenir. Bu amaçla ısı duyargaları (termoçift, thermocouple) kullanılır. Öyle ki, sterilizasyon süresi, saptanan bu soğuk noktanın sterilizasyon sıcaklığına gelmesinden sonra başlar. Bu arada şu husus akılda tutulmalıdır: Sterilizasyon odasında bulunan ve soğuk noktadan daha önce sterilizasyon sıcaklığına ulaşabilen malzemeler daha uzun süre yüksek sıcaklıkta bekleyeceklerdir. Bu durum stabilite sorununa neden olabilir. Sonuç olarak malzemelerin sıcaklıktaki stabiliteleri bilinmeli ve en uygun sıcaklık ve süre saptanmalıdır³.

Kuru ısı sterilizasyonu için iki tür etüv kullanılır: Bunlar, ısının doğal konveksiyonla iletildiği ve ısının zorlanmış konveksiyonla iletildiği etüvlerdir. Normal konveksiyonda ısınan hava yükselerek yerini daha serin havaya bırakır. Odanın içindeki bu hava devinimi, malzemelerin veya rafların neden olduğu engelle aksar ve verimli bir ısı dağılımı elde edilemez. Bu nedenle normal konveksiyonlu etüvlerde raflar arasındaki sıcaklık farkı $\pm 20^\circ\text{C}$ veya daha fazla olabilmektedir. Bu ise sterilizasyon sıcaklığına erişmek için gerekli süreyi uzatır³.

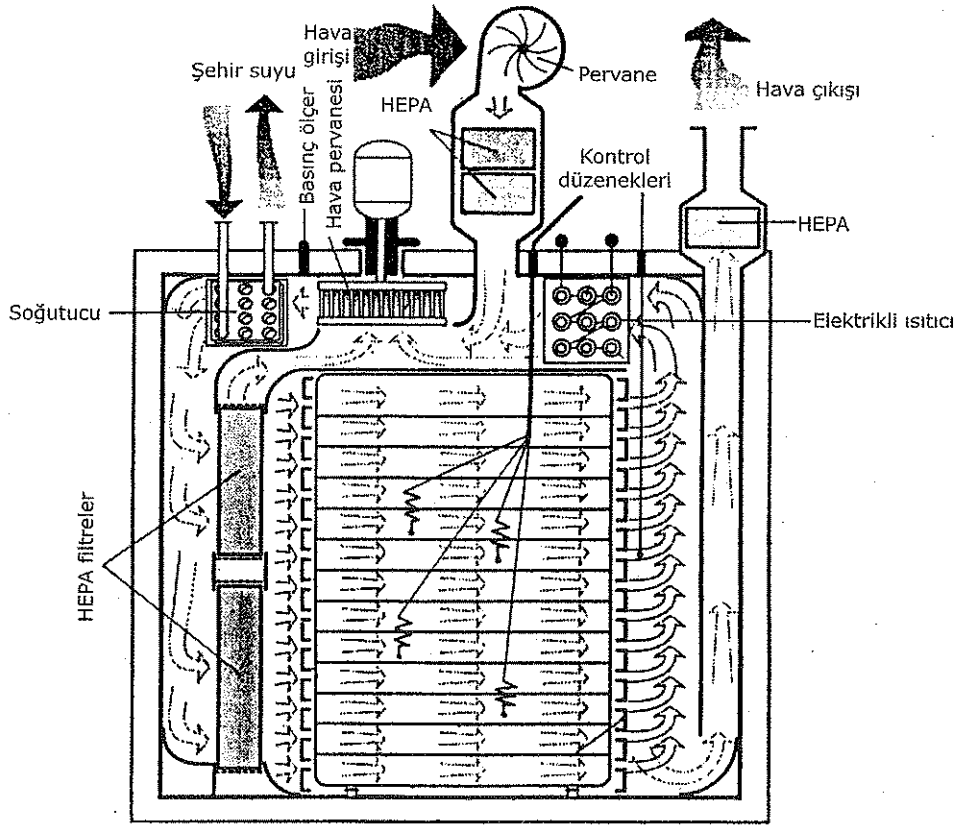
Zorlanmış konveksiyonlu etüvler (Şekil 5.6), ısınmış havanın malzemeler çevresinde döndürüldüğü etüvlerdir. Bu etüvlerde, etüv içine gönderilen hava HEPA (High Efficiency Particulate Air) filtrelerden geçirilir. Doğal olarak bu etüvlerin etkinliği diğerlerine göre daha iyidir. Öyle ki, raflar arasındaki sıcaklık farkı $\pm 1^\circ\text{C}$ 'ye kadar inebilmektedir. Sonuç olarak bu etüvler ile malzemelerin sterilizasyon sıcaklığına gelebilmesi için geçen süre çok azalmaktadır³. Bu etüvlerin iç basıncı sürekli olarak kontrol edilir. Basıncın steril olmayan dış ortama göre biraz fazla olması, steril sahaya göre daha az olması gerekir⁸.

Yukarıda açıklanan iki etüv dışında ilaç endüstrisinde sıcak hava tünelleri (Şekil 5.7) de sterilizasyon amacıyla

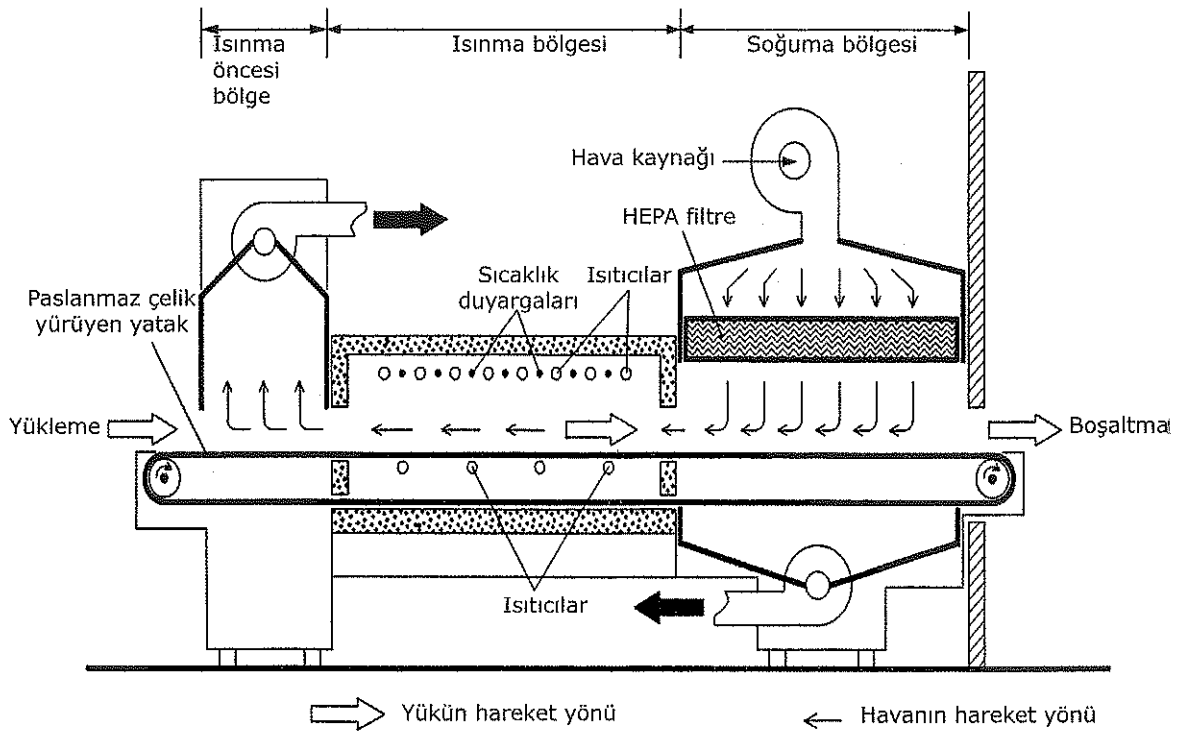
kullanılmaktadır. Bu yöntem cam malzemelerin, özellikle içine parenteral ürün doldurulacak şişelerin sterilizasyonu için uygundur. Yöntemde cam malzemeler sterilizasyonun gerçekleşeceği sıcaklığa kadar ısıtılmış bir tünel içinde hareket eden ve paslanmaz çelikten yapılmış elek şeklinde olan yatak üzerine yerleştirilmiştir. Malzemeler tünelden çıktıklarında sterilize edilmiş olmaktadır. Devamlı sterilizasyonun sağlandığı bu tünellerde hava HEPA filtrelerden süzülür ve havanın ısıtılması IR lambaları veya elektrikle yapılır. Sterilizasyon süresi sonunda ortama steril hava gönderilerek malzemelerin soğuması sağlanır. Bu yöntemin en önemli faydası, sterilizasyondan hemen sonra şişelerin doğrudan aseptik ortama gönderilerek doldurma makinalarında yerlerini almalarının sağlanabilmesidir. İşlem 280°C 'de 20 dakikadan 300°C 'de 3-4 dakikaya kadar indirilmiştir. Isıtmanın IR ile sağlandığı tünellerde, ısı hem yukarıdan hem de yürüyen yatağın altından uygulanır. Bu tür tünellerde HEPA filtreden gönderilen hava yatağın hareket yönünün tersine hareket ederek ısıtılmanın gerçekleştiği bölgeden geçerken ısınır ve malzemenin yüklendiği kısımda malzemelerin hem kurummasını, hem de ısınmasını sağlar. Sıcak havanın HEPA filtrelerden süzülerek tünel içine gönderildiği teknikte, hareketli yatağın hızının azaltılmasına gerek olmamakta ve malzemenin ısınma süresi çok kısalmaktadır^{3,8}.

Kuru ısı sterilizasyonunun bir önemli özelliği, işlem sonucunda özellikle cam malzemenin kuru olarak kullanıma hazır duruma gelmesidir. Bu, bekleme sırasında sterilitenin daha kolay muhafaza edilmesini sağlar. Ayrıca şişeler için, içlerine doldurulacak parenteral formülasyonun seyrelmesi de engellenmiş olur. Sterilizasyon işleminden sonra kullanım için bir süre beklenecek ise, malzemelerin çevresel mikrobik bulaşmadan korunması amacıyla açık yerlerinin alüminyum varak gibi bir malzeme ile iyice kapatılması gerekir. Malzemelerin paslanmaz çelik bir kutu içinde sterilize edilmesi, kullanılıncaya kadar sterilitenin korunabilmesi için uygun bir yöntemdir³.

Doğgun su buharı (saturated steam) ile sterilizasyon: 121°C 'de doğgun su buharıyla yapılan sterilizasyon, düşük maliyetli, güvenilir ve değişikliklere izin verebilen bir sterilizasyon yöntemidir. Bu sterilizasyon işlemi otoklav adı verilen ve genellikle ceketli olarak imal

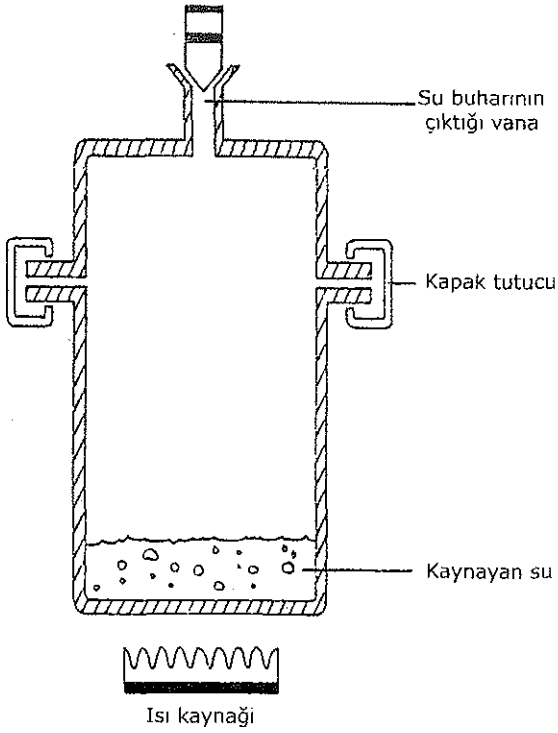


Şekil 5.6 Zorlanmış konveksiyonlu etüvlere bir örnek⁸



Şekil 5.7 Sterilizasyon amacıyla kullanılan sıcak hava tüneline bir örnek⁸

edilmiş basınca dayanıklı sterilizasyon odalarında yapılır. Otoklavın buhar ile temasta olan kısımları yüksek kaliteli (316 kalite) paslanmaz çelikten imal edilir⁸. Şekil 5.8'de otoklav şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.8 Ceketli otoklavın şematik gösterimi²

Otoklav sterilizasyonu ile, hermetik olarak kapatılmış parenteral ürünler, cam malzemeler, kauçuk kapaklar, değişik filtreler, ayrıca cerrahide kullanılan aletler ve kumaş benzeri malzemeler sterilize edilebilir. Sterilizasyon sonrası malzemeler ıslak olur. İşlem sonrasında kurutma amacıyla vakum uygulanması malzemenin tümüyle kurummasını sağlayamamaktadır. Eğer tümüyle kuru malzeme gerekiyor ise, vakumlu etüvler bu amaç için kullanılabilir. Sterilize edilecek malzeme koruyucu bir ambalaj malzemesi ile sarılmış ise, bu malzemenin ıslanmaya karşı dayanıklı olması, buharın kolayca içeriye girmesine ve havanın rahatlıkla dışarıya çıkmasına izin vermesi, sterilizasyondan sonra sterilize edilmiş malzemenin bu özelliğinin devamını sağlayabilmesi gerekir. Otoklav sterilizasyonunda malzemelerin ambalajı için özel bir parşömen kağıdı olan Kraft kağıdı ve Tyvek kullanılır. Dakron ise, otoklav sterilizasyonundan sonra tekrar kullanılabilen bir ambalaj malzemesidir³. Otoklavda en yüksek verimi elde edebilmek için, hiç su damlacığı içermeyen kuru buharın kullanılması ge-

reker. Bu buhara *doygun buhar* denir. Eğer buhar az da olsa su damlacığı içeriyor ise, sterilizasyonun etkinliği azalır¹⁰.

121°C'de doygun su buharı bazı önemli özelliklere sahiptir. Bunlardan birincisi, su buharının yoğunlaşmasıyla sahip olduğu enerjinin açığa çıkmasıdır. Mesela 1 kg 121°C'deki buhar soğumadan yoğunlaştığında yaklaşık 525 kcal (kilokalori) enerji açığa çıkar. İkinci önemli özellik ise basıncın ve sıcaklığın birbirine bağlı değerler olmasıdır. Belli sıcaklıktaki doygun buharın basıncı sabittir. Basınç artarsa, buharın yoğunlaşmaması için sıcaklığının da artırılması gerekir. Bu, buharın sıcaklığının değişmesiyle basıncının da değişeceğini gösterir. Mesela, sıcaklığı 121°C olan su buharının basıncı 2.05 bardır (atm). Bu, otoklav sterilizasyonu sırasında işlem odasının sadece sıcaklığının veya sadece basıncının kontrol edilmesinin yeterli olacağı anlamına gelmektedir⁸.

121°C'de veya 2.05 bar basınçtaki su buharının bir diğer özelliği de, bir molünün (sıvı halde 18 g veya 18 mL) hacminin 15 L olmasıdır. Kısaca belirtmek gerekirse, bir mol su buharı yoğunlaştığında, hacmi yaklaşık 1000 kez küçülecek ve yoğunlaşmanın olduğu bölgede kısmi vakum oluşacaktır⁸. Vakumun oluştuğu bölgeye ise, hemen taze sıcak buhar dolduracaktır. Bu olay, yüzeyin buharla aynı sıcaklığa gelmesine kadar devam eder^{3,7,8}.

121°C'de su buharı ile sterilizasyon yapılırken, su buharının MO ile temas etmesi şarttır. Buharın MO'lar üzerinde öldürücü etkisinin oluşması, ya dolaylı yoldan, ya da doğrudan gerçekleşir. Cerrahi malzemelerin otoklav sterilizasyonunda ikinci durum geçerli olurken, sulu çözelti taşıyan ampul gibi ağzı kapalı birimlerin sterilizasyonunda birinci durum geçerli olmaktadır. *Ağzı kapalı, içi boş veya su içermeyen yağlı bir karışımla dolu olan bir ampulun iç kısmı bu koşullarda otoklav sterilizasyonu ile sterilize edilemez.*

Cam şişedeki sulu çözeltinin sterilizasyonu sırasında, şişe içindeki basınç otoklav odasındaki basınçtan biraz daha fazla olur. Bunun nedeni, otoklav içindeki havanın çekilmiş olması; buna karşılık şişe içindeki havanın uzaklaştırılmamasıdır. Şişedeki çözeltinin üst tarafındaki havanın basıncı yaklaşık 1 bar kadardır.

Sterilizasyon koşullarında ise, bu boşluktaki kısmi buhar basıncı 2.05 bar olur. Ayrıca sıcaklığın etkisi ile sıvı içinde çözülmüş olan gazların sıvıyı terkederek sıvının üstündeki gaz fazına geçmesiyle de basınç yaklaşık 0.3 bar kadar daha artmaktadır. Bu durumda şişenin içinde çözeltilenin üstündeki basınç yaklaşık 3.35 bara kadar çıkar. Otoklav sterilizasyonunda kullanılan cam malzemeler bu basınç artışına karşı dayanabilen yapılardır. Ancak sterilize edilecek sulu karışımın esnek ambalaj malzemeleri içinde olması, bu kapların şişmesine neden olabilir⁸.

Otoklav sterilizasyonunda, otoklav içinde var olan veya buharla beraber oda içine giren havayı oluşturan gazların moleküler ağırlıkları dolayısıyla dansiteleri su buharından yaklaşık 1.5-2 kat fazladır (aynı sıcaklık ve basınçta). Otoklav odasına gönderilen buhar bu nedenle oda içindeki havayı odanın alt kısmına iter ve hava buhar ile karışmadan bu bölgede tabakalaşmaya neden olur. Buradaki hava en fazla buharın sıcaklığına kadar ısınabilir. Buhar bu bölgedeki yüzeylerle temas edemediği için sterilizasyon gerçekleşemez. Otoklav sterilizasyonu süresi içinde buharla temas etmeyen yüzeylerin sterilizasyonu, 121°C'de yeterince uzun süre kalamadıkları için sağlanamaz. Bu sorunu ortadan kaldırmak için sterilizasyon öncesi otoklav odasının havası vakum uygulanarak çekilir. Ayrıca malzemeler, aralarındaki havanın kolayca çıkabilmesine ve buharın

bu bölgeleri doldurabilmesine olanak verecek şekilde yerleştirilir. Uygulanan vakumla oda içindeki havanın % 90 kadarı boşaltılabilmektedir^{3,8}.

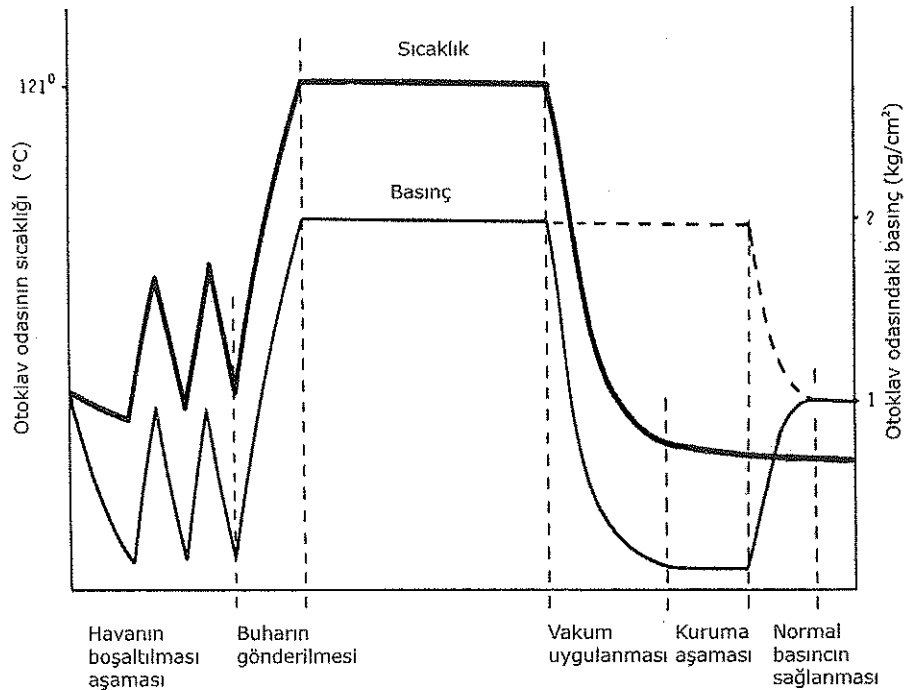
Otoklavla sterilizasyonda, işlemde temel olarak üç aşama bulunmaktadır. Bunlar:

- sterilizasyon odasından havanın çekilmesi,
- ısıtma ve sterilizasyon aşaması
- sterilizasyon sonrası aşama

olarak incelenmektedir (Şekil 5.9)⁵.

Isıtma aşamasında önemli miktarda buhar yoğunlaşır. Oda içindeki basınç veya sıcaklık değerinde azalmaya neden olmaması için, yoğunlaşan su dışarıya alınır. Otoklav sterilizasyonunda malzemelerin sterilizasyon sıcaklığına gelmesi için geçen sürenin, kuru ısı sterilizasyonunun aksine, toplam sterilizasyon döngüsü süresi içindeki yeri çok önemli değildir. Bunun nedeni, malzemelerin çok daha yüksek enerji ile karşı karşıya kalarak daha kısa sürede ısınmalarındır^{3,8}.

Sterilizasyon sonrası aşama temel olarak sterilizasyon odasının basıncının normal basınca indirilmesi, yani sıcaklığın normale düşürülmesi aşamasıdır. Sterilizasyon işleminin toplam süresinin azaltılması için, soğuma aşamasının mümkün olan en kısa sürede tamamlanması gerekir. Ayrıca sterilizasyon işlemi sonrası mal-



Şekil 5.9 Havanın vakumla alındığı otoklav sterilizasyonunda sıcaklık/basınç grafiği⁵

zemelerin sıcak ortamda bekletilmemesi istenir. Bu amaçla sterilize edilmiş malzemenin cinsine bağlı olarak değişik uygulamalar yapılmaktadır.

Oldukça uzun bir zaman almasına rağmen, otoklav sterilizasyonu sonucunda sterilizasyon odasındaki sıcaklığın kendi kendine azalması beklenebilir. Sıcaklık azaldıkça oda içindeki su buharı yoğunlaşacak ve yüksek olan basınç da azalacaktır. Sıcaklık sürekli olarak azalacağından, yoğunlaşma işlemi de devam edecektir. Oda içindeki basınç 1 bar'a indiğinde otoklav kapagi açılarak malzeme dışarı alınabilir.

Otoklavda sterilize edilmiş malzeme sulu çözelti içeren bir malzeme değil ise, oda içindeki su buharının vakum uygulanarak dışarı alınması ve yerine normal sıcaklıkta steril hava verilmesi malzemeye bir zarar vermez. Böylece malzeme hem daha hızlı kurumuş hem de soğumuş olur. Ancak içinde sulu çözelti bulduran kaplara bu şekilde hızlı bir soğutma yapılamaz. Bunun nedeni, sterilizasyon sonucunda vakumla oda içindeki buharın alınması ve yerine normal sıcaklıkta steril hava verilmesi sonucu kaplar/şişeler bir anda daha serin bir ortamla karşılaşır. Ancak kap içindeki sıvı, sterilizasyon odasının soğuma hızıyla aynı hızda soğuyamaz. Ayrıca şişenin içindeki boşluğu dolduran su buharı bir anda yoğunlaşarak şişe içinde vakum oluşmasına neden olur. Bu vakumun etkisi ile, şişedeki sıcak sulu çözeltinin yapısındaki su düşük basınçta buharlaşarak (kaynama) şişenin üstündeki boşlukta yüksek bir buhar basıncı oluşmasına neden olur. Sonuçta kap camdan imal edilmiş ise patlayabilir; plastik bir malzemeden yapılmış ise şişebilir.

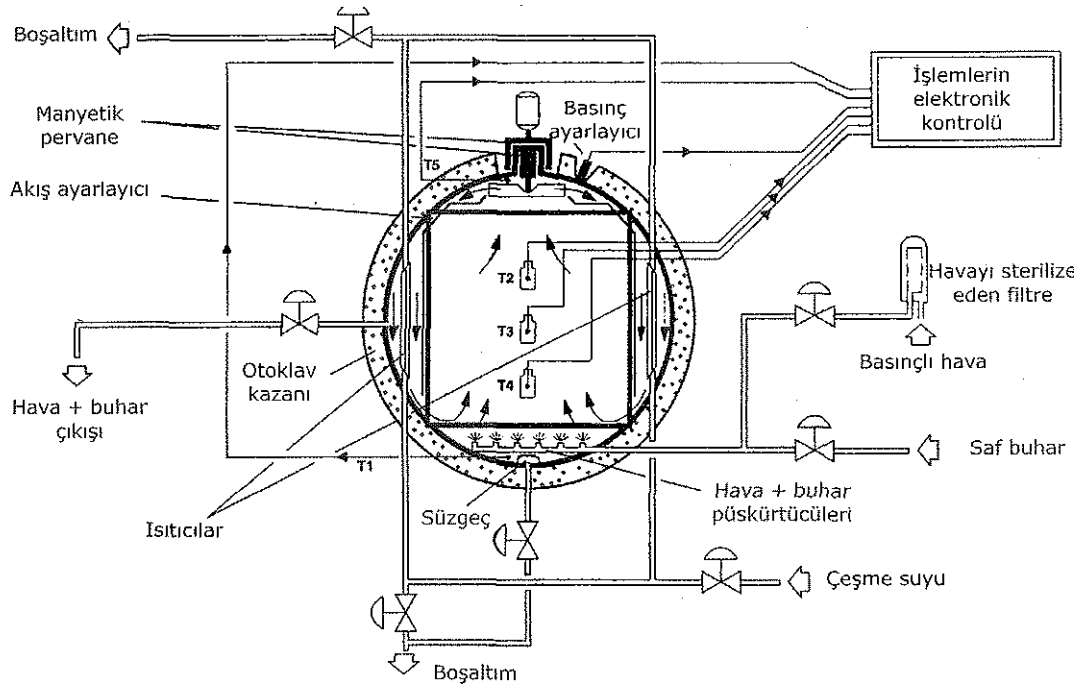
Otoklav sterilizasyonu sonucunda çözelti içeren cam kapların mümkün olan en yüksek hızda soğutulması için güvenli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi malzemelerin üstüne bulut şeklinde distile suyun püskürtülmesidir^{3,8,11}. Distile suyun kullanılmasının nedeni, cam malzemenin dışına bulaşmış suyun kurumamasından sonra yerinde tuz yapısındaki maddelerden kaynaklanan lekelerin oluşmaması içindir. Bu uygulama ile sterilizasyon odasının basıncı kademeli olarak azalır, buna karşılık kapların içindeki basınç aynı hızda düşmez. Ancak kullanılan cam malzeme bu basınç farkına dayanacak güçtedir. Cam kapların içindeki sıvı sıcaklığının 70-80°C'ye inmesi ile soğutma işlemine son verilerek malzemeler dışarı çıkartılır. Malzemenin

sahip olduğu bu ısı enerjisi, dışındaki su damlalarının buharlaşmasını da sağlar.

Diğer bir hızlı soğutma yöntemi, yüksek basınçlı su buharının oda içine gönderilmesidir. Bu uygulamada, yüksek basınçlı buhar oda içine girince bir anda genişlerken sıcak malzemeden ısı enerjisini çeker. Daha sonra buhar dışarı çekilerek hem basınç, hem de sıcaklık azaltılmış olur. Aynı işlem birkaç defa tekrarlanır. Sonuçta kademeli olarak malzemelerin sıcaklığı azaltılmış olur. Açıklanan bu yöntemler sırasında, şişelerin içindeki basınç ile odanın basıncı arasındaki farkı çok artırmamak için odaya kademeli olarak hava verilebilir.

Otoklav sterilizasyonunda her zaman sadece sıcak doymuş su buharı kullanılmaz. Bazı durumlarda hava/buhar karışımının kullanılması gerekir. Doğal olarak bu karışımın ısı kapasitesi saf buhardan daha azdır. Buhar içinde havanın olması, sterilizasyon odasının basıncını kontrol etmeyi kolaylaştırır. Bu durum özellikle plastik torbalara konmuş parenteral ürünlerin veya sıkılabılır tüpte ambalajlanmış sulu jellerin otoklav sterilizasyonunda önem kazanmaktadır. Saf buhar ile yapılan otoklav sterilizasyonunun soğuma aşamasında bu ambalajların şişip patlama olasılığı vardır. Hava/buhar karışımı kullanılıp havanın basıncı bağımsız olarak denetlendiğinde, ambalajın içindeki basınca eş bir basınç ayarlanabilir. Ancak bu uygulamada buhar ve havanın tabakalar halinde ayrılma eğilimi olması nedeniyle karışımın sürekli olarak karıştırılması gerekir^{3,5}. Bu uygulama için hava+buhar karışımının kullanıldığı otoklavlar geliştirilmiştir (Şekil 5.10)⁸. Bu otoklavlar doymuş buharla çalışan otokavlardan daha yüksek basınçta çalışırlar. İçlerindeki hava boşaltılmaz. Hava+buhar karışımı otoklav odasının alt kısmından verilir. Karışımın kısmi hava basıncı odaya girmeden önce ayarlanır. Odanın tavan kısmında hava/buhar karışımının sürekli karışmasını sağlayan bir pervane bulunur. Oda içine gönderilen hava/buhar karışımı içeride ısıtılır ve 121°C'ye gelmesi sağlanır. Soğuma aşamasında ise, gönderilen hava basıncı ayarlanarak, hem buharın yoğunlaşması sağlanır, hem de zamanla hava buharın yerini alır⁸.

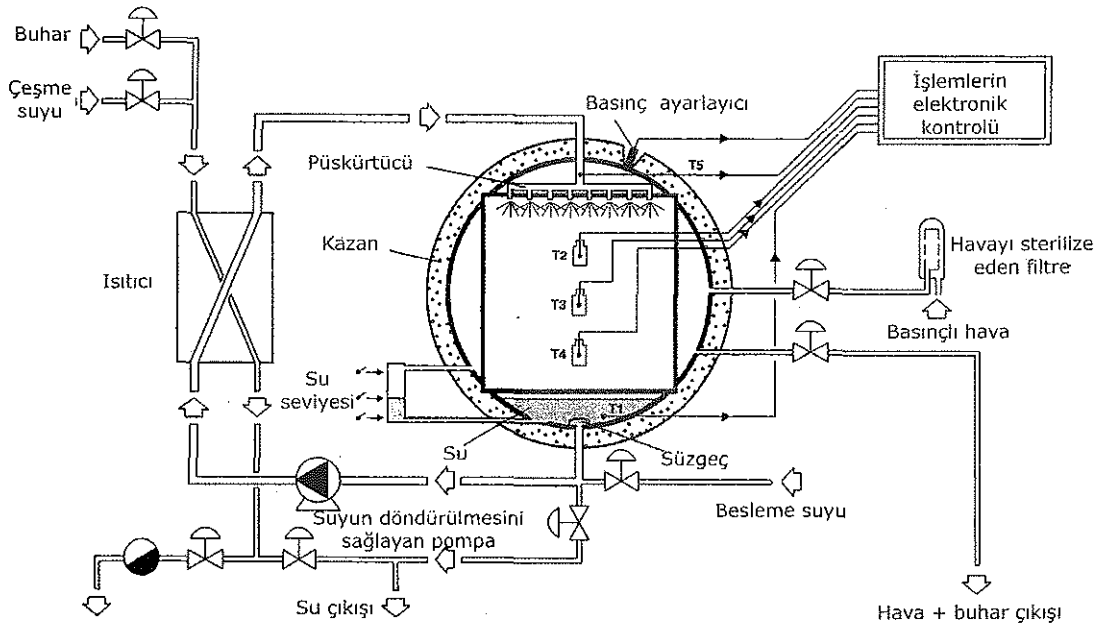
Hava/buhar karışımının kullanıldığı otoklavların yanı sıra, aşırı ısıtılmış suyun kullanıldığı otoklavlar da geliştirilmiştir (Şekil 5.11). Bu otoklavlara malzeme yüklen-



Şekil 5.10 Hava+buhar karışımının kullanıldığı otoklav^B

dikten sonra, alt kısımda bulunan depo su ile doldurulur. Otoklav odası içindeki hava boşaltılmaz. Depodaki su ısıtıcıdan geçerek ısınır ve odanın tavanındaki bir düzenden oda içine püskürtülür. Otoklav içine gönderilen basınçlı hava, suyun buharlaşmasını engelleyerek suyun ısıtıcılarda 121°C'ye kadar aşırı ısınmasını sağlar. Bu su kademeli olarak malzemeleri kısa sürede ısıtır. Soğuma, steril suyun oda içine püskürtülmesi ile sağlanır. Bu arada hava verilerek oda içinin basıncı es-

nek ambalaj malzemesinin şişmesini engelleyecek düzeyde tutulur. Sonuçta 15 dakikadan daha kısa sürede malzemelerin sıcaklıkları 70°C'nin altına iner. Bu otoklavlar ile plastik torba veya plastik/aluminyum ambalaj içindeki sulu karışımlar, içleri önceden doldurulmuş enjektörler, ambalaj içi ile oda arasındaki basınç farkı ortadan kaldırılarak veya belli bir değerde sabit tutularak hiçbir sorun yaşanmadan sterilize edilebilmektedir.^B



Şekil 5.11 Aşırı ısıtılmış suyun kullanıldığı otoklav^B

Sıcakta özellikleri değişen veya bozulan gözenekli malzemeler için, formaldehit varlığında düşük sıcaklıktaki doymuş buharla sterilizasyon yapmak mümkündür. Otoklav kullanılarak yapılan bu sterilizasyonda formaldehit gazı ve su buharı birarada kullanılır. İşlem sıcaklığı 65°C ile 80°C arasında, gaz derişimi ise 3.3 mg/L ile 100 mg/L arasında değişmektedir. Sterilizasyon süresi genellikle 2 saat olarak alınmaktadır. Bu sterilizasyon için yüksek derecede vakum uygulanabilen otoklavın kullanılması gerekir. İşlem sırasında formaldehitin polimerize olmaması için sıcaklık denetiminin çok dikkatli yapılması gerekir. Sterilizasyon işlemine başlamadan önce odadan ve malzemelerden hava, vakum uygulanarak uzaklaştırılır. Daha sonra buhar verilerek malzeme nem ile doyurulur. Son olarak formaldehit gazı odaya gönderilir. Sterilizasyon süresinin sonunda odadaki gaz/buhar karışımı vakumla çekilerek yerine doymuş buhar gönderilir. Bu işleme, formaldehit malzemeyi terk edinceye kadar devam edilir. Daha sonra oda içine steril hava gönderilerek işlem sonlandırılır^{9,11}.

Sıcaklığın uygulanmadığı fiziksel sterilizasyon yöntemleri

UV ışığı ile sterilizasyon: UV ışığı, dalga boyu 328 ile 210 nm arasında olan ışıklardan oluşmaktadır. MO'lar üzerinde en öldürücü etki, 240 ile 280 nm dalga boyları arasındaki UV ışını ile elde edilir. Dalga boyu 253.7 nm olan ışın, öldürücü etkinin en fazla görüldüğü UV ışınıdır. Cıva buharlı lambaların verdiği UV ışığının % 90'dan fazlası, dalga boyu 253.7 nm olan ışından oluşmaktadır¹². Bu nedenle sterilizasyon amacıyla bu lambalar kullanılmaktadır.

UV ışığının MO'lar üzerindeki öldürücü etkisi veya UV ışığına karşı MO'ların gösterdikleri direnç, MO tipi (Tablo 5.2), MO sayısı, MO'nun durumu, ortamda organik yapıların bulunup bulunmaması, sıcaklık, hangi dalga boyundaki UV ışınının kullanıldığı ve MO'nun kendini tedavi etme özelliği gibi değişik nedenlere bağlıdır. Bakteri sporlarının UV ışınına karşı çok daha dayanıklı oldukları bilinmektedir (yaklaşık 3-10 kez). Virüsler de UV ışığında ölürler ve gösterdikleri direnç bakteri sporlarından daha azdır. MO sayısının çok olması, bunların yok edilmesi için gerekli olan UV ışını dozunun daha fazla olmasını gerektirir. Ayrıca MO'nun kendi yaşam döngüsünün hangi aşamasında bulunduğu, UV ışınına karşı gösterdiği direnci etkilemektedir. Bunun yanı sıra

ortamda nemin bulunması, öldürücü etkinin oluşması için gereken UV ışını şiddetinin/dozunun daha az olmasına neden olmaktadır. MO'nun bulunduğu ortamda kan ve serum gibi organik bir yapı varsa, öldürücü etkinin oluşması için gerekli UV ışını dozunun artırılması gerekmektedir. Düşük sıcaklıklarda çoğu MO, UV ışınına karşı aşırı bir hassasiyet gösterir ve düşük dozlarda öldürülmeleri kolaylaşır. MO'ların bazıları, UV ışınının neden olduğu hasarı tamir edebilme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle bu MO'ların UV ışınına karşı dirençleri daha fazladır¹².

Tablo 5.2 UV ışığına karşı MO'ların bağıl direnci¹²

Direnç	Örnek mikroorganizma
Yüksek	<i>Micrococcus radiodurans</i> <i>B. subtilis</i> / <i>B.globigii</i> sporları <i>Sarcina lutea</i>
Orta	<i>M. Sphaeroides</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Saccharomyces türleri</i> <i>Sreptococcus lactis</i>
Düşük	<i>Grip virüsü</i> <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus vulgaris</i>

MO'lar üzerinde en fazla öldürücü etki oluşturan UV ışını, cıva buharı lambalarının 253.7 nm dalga boyunda oluşturduğu ışındır. UV ışığını oluşturan ışınlar düz bir çizgi üzerinde hareket ederler. Işının şiddeti, katettiği mesafenin kare köküyle ters orantılıdır. UV ışınları giriş yapabilme özelliklerinin zayıf olmasından dolayı her yapıya nüfuz edemezler. Mesela temiz hava ve temiz suya rahatlıkla girebilmelerine rağmen, tanecik içermeleri durumunda (kirli hava veya çözelti) bu yapılara giriş yetenekleri çok azalır. Diğer katı yapılara girişleri ise, hemen hemen imkansızdır, bu nedenle temel olarak yüzeylerde ve havada bulunan MO'ların öldürülmesi amacıyla kullanılırlar³.

UV ışığı bir yapının içine girdiği zaman, sahip olduğu enerjini bu yapıyı oluşturan atomların çevresindeki elektronlara aktarır. Atomlar bu şekilde yüksek enerjili bir konuma gelince kimyasal reaksiyona girme özellikleri tümüyle değişir. Bu olayın MO'daki temel molekül-

leri (nükleik asitler gibi) oluşturan atomlarda meydana gelmesi, MO'nun yaşamsal faaliyetlerinin değişmesine neden olur. Bu durumda MO ya ölür, ya da kendini yenileyemeyecek duruma gelir.³

UV ışını karşısında spor oluşturmayan bakterilerin DNA'sında bulunan timinin diğer bir timin ile dimer bir yapı oluşturduğu saptanmıştır. Bu olay, özellikle 253.7 nm dalga boyundaki UV ışını ile maksimum seviyede görülmektedir. Bakteri sporlarında da buna benzer bir reaksiyonla daha değişik bir dimer yapısının oluştuğu, ancak bu yapının açıklanamayan bir mekanizma ile bakteri hücresi içinde yokedildiği saptanmıştır. Bakteri sporlarının daha dayanıklı olmasının nedeninin de bu olduğu belirtilmiştir¹².

Her MO'nun UV ışınına karşı direncinin farklı olması nedeniyle, sterilizasyonun sağlanabilmesi için yeterli şiddetteki UV ışınının yeterli süre verilmesi gerekir³. Tablo 5.3'de bazı MO'ların 253.7 nm dalga boyundaki UV ışını etkisi ile ölmesi için gerekli olan enerji değerleri ($\mu\text{W}/\text{saniye}/\text{cm}^2$) verilmiştir. Buna göre $20 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ şiddetindeki UV ışını ile *B. Subtilis*'in ölmesi için 550 saniye, bu bakterinin sporlarının ölmesi için ise 1100 saniye yetecektir.

Tablo 5.3 Dalga Boyu 253.7 nm olan UV ışını ile bazı MO'ların ölmesi için gerekli enerji miktarları³

Mikroorganizma	Enerji miktarı ($\mu\text{W}/\text{saniye}/\text{cm}^2$)
<i>Aspergillus niger</i>	330 000
<i>Rhizopus nigricans</i>	220 000
<i>Sarcina lutea</i>	26 400
<i>Penicillium roqueforti</i>	26 400
<i>B. subtilis</i> sporları	22 000
<i>S. cerevisiae</i>	13 200
<i>P. aeruginosa</i>	10 500
<i>E.coli</i>	6 600
<i>S. aureus</i>	6 600
<i>St. Hemolyticus</i>	5 500
<i>Ebethella typosa</i>	4 100

UV lambalarının etkilerinin en üst düzeyde devam etmesi ve verdikleri UV ışınının şiddetinin azalmaması için, toz, yağ ve yüzeylerinde herhangi bir çizik oluşu-

mundan korunmaları gerekir. MO üzerindeki öldürücü etkileri lambanın eskimesi ile azalır. Bu nedenle ışın yayma güçleri % 30-50 oranında azaldığında değiştirilmelidirler. UV lambalarının bulunduğu ortamlarda çalışan kişilerin ciltlerini ve gözlerini UV ışınından korumaları için özel önlem almaları şarttır. Bu kişiler bir saat içinde $2.4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ den daha fazla UV ışınına maruz kalmamalıdır.

İyonize radyasyon ile sterilizasyon: İyonize radyasyon, elektromanyetik radyasyon ve taneciklerden kaynaklanan radyasyon olmak üzere iki grupta incelenir.

Elektromanyetik radyasyon gama ışınları ve X ışınlarından kaynaklanmaktadır.

Taneciklerden oluşan radyasyon ise, alfa tanecikler, beta tanecikler, pozitronlar, nötronlar ve hızlandırılmış yüksek enerjili elektronlardan oluşur. Sterilizasyon amaçlı olarak sadece iki radyasyon kaynağı kullanılmaktadır. Bunlar, gama ışınları ve hızlandırılmış yüksek enerjili elektronlardır^{10,11}.

İyonize radyasyonla yapılan sterilizasyonun en önemli özelliği, ısı enerjisine gerek duyulmadan malzemelerin ambalajları içinde sterilize edilebilmesidir³. Bu nedenle başta etilen oksit sterilizasyonu olmak üzere, sıcakta gerçekleştirilen diğer sterilizasyon yöntemlerine alternatif bir yöntemdir^{13,11}. Ayrıca iyonize radyasyonla, hiç kesintisiz olarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilebilir.

Hızlandırılmış yüksek enerjili elektronlar ya doğrusal hızlandırıcılardan (linear accelerator) ya da Van de Graaff hızlandırıcılardan elde edilir. Doğrusal hızlandırıcılarda çok yüksek frekanslı mikrodalgalar, katotdan elektronları toplar ve elektronlar bir vakum tüpü içinde ilerlerken bunları hızlandırır. Elektronların hızı neredeyse ışık hızına yaklaşır. Sonuçta aletten çıkan elektronların enerji düzeyleri 3-15 milyon elektron volt (meV) kadar olur. Sterilizasyon için enerji düzeyi 9 meV'dan fazla olan elektronlar, radyoaktif madde oluşumuna neden olabilecekleri için kullanılmaz. Ayrıca enerji düzeyi 5 meV'dan az olan elektronlar da yapıya giriş yeteneklerinin yetersiz olması nedeniyle sterilizasyon amacıyla kullanılmaz. Van de Graaff hızlandırıcılar ise, enerji seviyesi 3 meV olan elektronları oluşturma gücüne sahiptir^{3,13}. Hızlandırılmış elektronların enerji

seviyesinin gama ışınından daha fazla olması, sterilizasyon süresinin daha az olmasına neden olmaktadır¹¹.

Gama ışını kaynağı olarak radyoaktif bir izotop olan kobalt-60 (⁶⁰Co) kullanılmaktadır. ⁶⁰Co'dan iki proton ve bir elektron yayılır. Bu toplam olarak 2.81 meV/luk enerjiye karşılık gelmektedir. Genellikle kan ve kan ürünlerinin sterilizasyonunda kullanılan sezyum-137 (¹³⁷Cs) de gama ışını kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ancak yaydığı ışının enerji düzeyi (0.66 meV) düşük olduğu için, bazı durumlarda tercih edilmektedir^{8,11}.

İyonize edici radyasyonla yapılan sterilizasyonda radyasyonun dozu malzemenin emdiği gama ışınından veya malzemenin 1 cm²'sine çarpan elektron sayısından saptanır. Malzeme tarafından emilen radyasyonun dozu "rad" ile gösterilir. Bir rad, 1 gram maddenin emdiği 100 erg'lik enerji miktarıdır. 2-2.5 megarad (Mrad) (=20-25 kiloGray) dozundaki gama ışınının steriliteyi sağlamak için yeterli olduğu bildirilmektedir^{3,13}. İşlemin validasyonunun yapılması şartıyla, mikrobiyolojik yükü az olan madde veya malzemeler için daha düşük doz kullanılabilir²².

Gama radyasyonda kullanılan radyoizotopun zor bulunması ve ışımasının istendiği zaman bitirilememesi, hızlandırılmış elektronlarda ise, hızın ayarlanabilmesi veya ışımanın durdurulmasının mümkün olması, iyonize radyasyon kaynağı olarak yüksek enerjili elektronların daha fazla tercih edilmesine neden olmaktadır¹⁴.

İyonize radyasyonla;

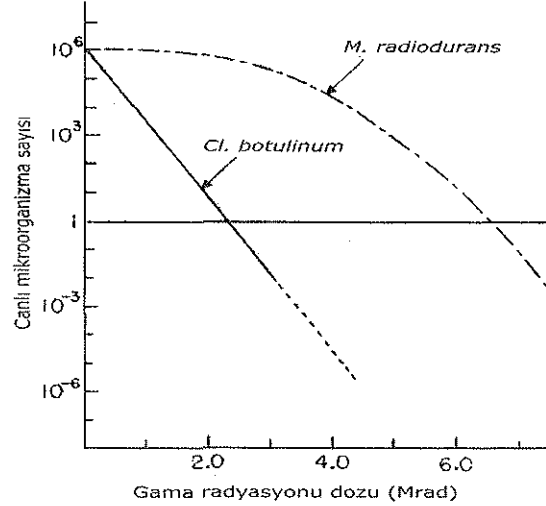
hastanede kullanılacak aletler, kontakt lens çözeltileri, bebek emzikleri, her türlü tıbbi malzeme, bazı vitaminler, bazı antibiyotikler, bazı steroidler, bazı hormonlar, bazı kanser ilaçları, kemik ve dokular

sterilize edilebilir. İçinde su bulunan ilaç şekilleri, iyonize radyasyonla sterilize edilmezler. Bunun nedeni, su molekülünden oluşan peroksitin ve serbest radikalın formülasyonu oluşturan yapılarla reaksiyona girme tehlikesinin olmasıdır^{3,6,8}.

Spor oluşturmamış bakteriler iyonize radyasyona en hassas MO'lardır. Bunları küf, mantar, spor şeklindeki bakteriler ve virüsler takip eder⁶. Sporların ve virüsle-

rin iyonize radyasyona karşı gösterdikleri direnç, spor oluşturmamış bakterilerden dört beş kat fazladır³.

Çoğu bakteri sporunun D değeri 0.2-0.3 Mrad, çoğu virüsün D değeri ise, 0.5 Mrad olarak bulunmuştur. Şekil 5.12'de, radyasyona büyük direnç gösteren bazı MO'ların iyonize radyasyonun etkisi ile ölüm eğrileri görülmektedir¹³.



Şekil 5.12 Kuru durumda olan bazı MO'ların gama radyasyonunun etkisi ile etkisiz duruma getirilmeleri (gama radyasyon kaynağı: ⁶⁰Co)¹³

İyonize radyasyonun MO'lar üzerindeki öldürücü etkisi değişik yollarla oluşmaktadır. Bunlardan birincisi, hücredeki DNA üzerinde mutasyona neden olarak hücrenin çoğalmasını engellemesidir. Bir diğer etki, hücredeki temel moleküllerden serbest radikallerin oluşumunu sağlamasıdır. Bu radikaller hücredeki diğer moleküllerle reaksiyona girerek önemli moleküllerin işlevini bozar. Bunların yanısıra su molekülünü iyonlaştırarak serbest radikal ve peroksitlerin oluşumunu sağlar ve bu yapılar hücre içindeki önemli moleküllerde enerji değişimine neden olarak metabolizma faaliyetlerini durdurur^{3,10,14}.

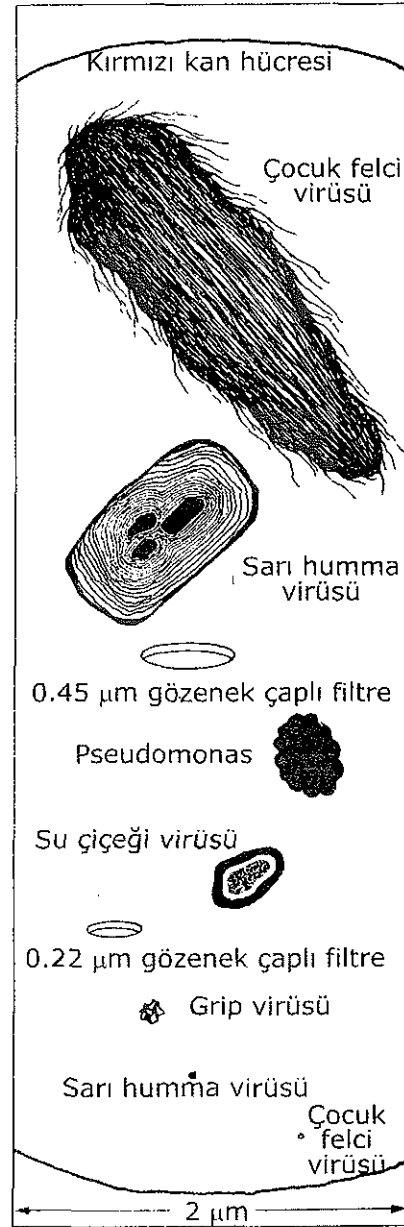
Süzme ile sterilizasyon: Sterilizasyon amacıyla yapılan süzme, herhangi bir sıvıdan veya gazdan MO'ların uzaklaştırılması işlemidir. Steril süzme tüm MO'ları tutacak özellikte olmalıdır. Bu nedenle kullanılan filtrenin gözenek çapının MO'yı geçirmeyecek boyutta olması gerekir. Steril süzmede temel olarak membran filtreler

kullanılır (Bkz. Bölüm: 4, Süzme). Ancak az da olsa, porselen veya cam filtrelerin de bu amaçla kullanılabilirliği bildirilmiştir^{2,3,6}.

Sıvıların sterilizasyonu amacıyla kullanılan cam veya porselen filtreler esas olarak derinlemesine süzme yaparlar. Sterilizasyon işleminden sonra yıkanıp temizlenerek tekrar kullanılabilir duruma gelirler. Temizlenmeleri için kuvvetli asitle yıkanılır veya yüksek sıcaklıkta bırakılırlar. Temizleme işlemi sonrasında gözeneklerinde büyüme ihtimali olması nedeniyle, her temizlemeden sonra steril süzme yapıp yapamayacakları kontrol edilmelidir^{3,6}.

Sterilizasyon amacıyla kullanılan membran filtreler tek kullanımlıdır. Çok ince olmaları nedeniyle kolaylıkla yırtılabilirler. Süzme işlemi sırasında da basınç farkı nedeniyle aynı olay gerçekleşebilir. İşlem sırasında filtreyi taşıyan, yıkanıp sterilize edilerek tekrar kullanılabilen tutucu/taşıyıcı olmadan süzme işlemi yapılamaz. Bazı durumlarda, membran filtrenin tutucu içine sıkıştırılarak üretildiği tümüyle kapalı süzme takımı kullanılır. Sızma tehlikesinin en az görüldüğü bu süzme sistemleri, işlem bitiminde atılır.

Sterilizasyon amacıyla 0.2 μm gözenek çapına sahip membran filtreler kullanılır. En küçük bakteri ve en büyük virüs yaklaşık 0.3 μm çapında¹⁵ olduğuna göre, bu gözenek çapına sahip bir filtre bütün bakterileri tutacak özelliktedir. 0.2 μm ortalama bir değerdir. Filtre bunun altında ve üstündeki büyüklükte gözenekleri de içerebilir. Bu koşullarda, boyutu 0.2 μm den daha küçük olan yapıların filtreden geçme tehlikesi vardır. Bu nedenle süzme ile geçerli bir sterilizasyonun sağlanabilmesi için, bazı araştırmacılar gözenek çapı 0.2 μm olan iki membran filtrenin seri olarak kullanılması gerektiğini, bazı araştırmacılar ise, gözenek çapı 0.1 μm olan membran filtrelerin kullanılmasını gerektiğini bildirmişlerdir. Ancak 0.2 μm gözenek çapına sahip membran filtrenin steril süzme yaptığı kabul edilmektedir^{2,3}. Sterilizasyon amacıyla kullanılan bu filtreler, 1 cm^2 'sinde, 10^7 adet P.diminuta (ATCC 19146)'nın hepsini 30 psi (=2 bar) basınç altında tutabilen filtrelerdir²². Kabaca fikir vermesi açısından bazı yapılar ve kullanılan membran filtrelerin gözenek çapları Şekil 5.13'te gösterilmiştir.



Şekil 5.13 Bazı mikroorganizmaların boyutu ve membran filtre gözenek çapları¹⁴

Membran filtrelerin süzme hızı, gözenek çapına, boşluk oranına, yüzey alanına, üst ve alt yüz arasındaki basınç farkına ve süzülecek karışımın viskozitesine bağlıdır (Bkz. Bölüm: 4, Süzme). Bu değişkenler içinde süzme hızını artırmak amacıyla ayarlama yapılabilecek sadece iki değişken vardır. Bunlar, basınç farkı ve viskozitedir. Filtrenin alt ve üst yüzü arasında basınç farkı oluşturmak amacıyla genellikle pozitif basınç, bazı durumlarda ise vakum uygulanmaktadır. Basınç uygulamasında gönderilen havanın steril olması gerekir.

Üretici firmalar imal ettikleri membran filtrelerin geçerli bir sterilizasyon işlemi yapacağına garantisini

verirler. Ancak filtrenin gözenek çapı ve bütünlüğünün istenen durumda olduğu, kullanıcı tarafından gerekli kontroller yapılarak tekrar gösterilmelidir.

Çözeltilerin süzülerek sterilize edilmesinde esas sorun, çözeltinin steril duruma getirilmesinden sonra bu çözeltinin sterilitesini bozmadan ambalajlara aktarılmasıdır. Bu işlem için aseptik bir ortamın sağlanması gerekir. Aseptik teknik, bir sterilizasyon yöntemi değildir. Ancak üretim sırasında steril durumun korunması amacıyla gerekli olduğu için sterilizasyon tekniği olarak kabul edilebilir^{3,6}.

Kimyasal sterilizasyon yöntemleri

Gaz sterilizasyonu: Gaz kullanılarak yapılan sterilizasyon eskiden beri kullanılan bir sterilizasyon yöntemidir. Formaldehit ve kükürt dioksit buharı, sterilizasyon amaçlı olarak uzun bir süre kullanılmıştır. Bu yapılar, kolayca reaksiyona girebilen, ancak zor uzaklaştırılan gazlardır. Bu nedenle kullanımları sınırlı kalmıştır. Daha az sorunlu olan (EtO) ve beta-propiyolaktan bu gazların yerini almıştır.³

Formaldehit ile yapılan sterilizasyon Amerika'da yaygın olarak kullanılmamasına rağmen, bazı Avrupa ülkelerinde, EtO gazı yerine tercih edilmektedir. Bazı avantajları nedeniyle hidrojen peroksit ve klor dioksit gazları da sterilizasyon amacıyla kullanılmaktadır⁸.

Etilen oksit gazı ile sterilizasyon: Etilen oksit (EtO, $[CH_2]_2O$) oda sıcaklığında gaz durumunda olan kokulu ve rensiz bir maddedir. Düşük sıcaklıklarda sıvıdır. Atmosfer basıncında kaynama noktası 10.8°C'dir. Tek başına yanıcı olup hava ile % 3'ün üstündeki oranlarda karışınca, patlayıcı bir özellik kazanır. Bu nedenle CO₂ veya florlu hidrokarbonların (Freonlar) bir veya birkaçı ile karıştırılarak kullanılır (Tablo 5.4). Karışım gazlar hava ile hangi oranda karışırlarsa karışırlar, patlama tehlikesi oluşturmazlar.

Son zamanlarda saf EtO'nin basınç altında sıvılaştırılmış şekli kullanılmaya başlanmıştır. Sıvı EtO, daha önce 28 inç Hg (=720 mm Hg) düzeyinde vakum uygulanmış sterilizasyon odasına gönderildiğinde derhal buharlaşır. Bu uygulamada vakum nedeniyle ortamda oksijen olmadığı için, herhangi bir patlama tehlikesi de yoktur.

EtO plastik, kağıt veya toz kütlesine kolayca girebilir. Gaz durumunda, çoğu katı madde için kimyasal olarak zararsızdır. Basınç uygulanarak sıvı duruma getirildiğinde ise, bazı plastik yapıları ve kauçuğu çözmesi nedeniyle dikkatli kullanılmalıdır. Sterilizasyon süresinin uzun olmasına ve uygulamada değişik zorluklarla karşılaşılmasına rağmen diğer bilinen yöntemlerle sterilize edilemeyen madde ve malzemeler EtO ile sterilize edilebilmektedir.

Tablo 5.4 Etilen oksit sterilizasyonunda kullanılan gaz karışımları ve kullanım koşulları (% 60 bağıl nemde 60 dakika bekletilen malzemeler için)³

Ticari isim	Karışımdaki % oranlar	Gaz derişimi (mg/L)	Basınç (Psig) ^f	En az temas süresi(saat)
Carboxide ^a	EtO:10 CO ₂ :90	450	28	6
Oxyfume-20 ^a	EtO:20	670	18	4
	CO ₂ :80	920	30	3
Cry-Oxide ^b	EtO:20	450	5	5
	TCFM ^d :54	850	18	3
	DCFM ^e :35			
Pennoxide ^c	EtO:12	650	7	4
	DCFM:88			

^aUnion Carbide chem.Co., ^bThe Matheson Comp., ^cPennsylvania Eng.Comp., ^dTrikloroflorometan, ^eDikloroflorometan, ^finch kare başına pound

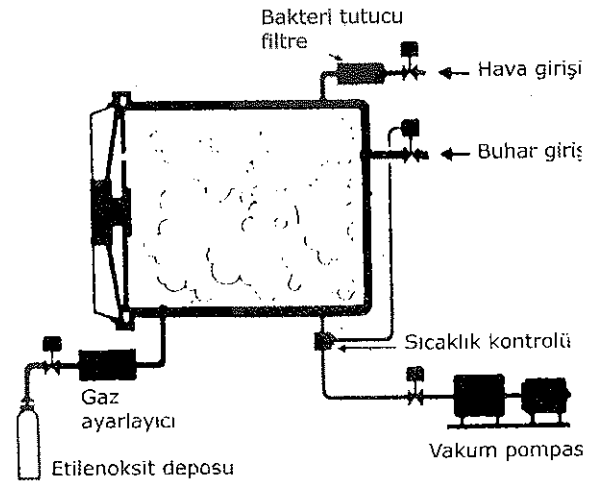
Etilen oksit, sporlar da dahil olmak üzere tüm MO'ları öldürür. Bu öldürücü etki, molekülün bakteri proteini alkilleyici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Alkilleme, amino, karboksil, hidroksil gruplarının ve sülfidril üzerindeki hidrojenin, hidroksi etil radikali ile yer değiştirmesi şeklinde olmaktadır. Böylece MO'nın temel metabolik reaksiyonları için gerekli olan gruplar engellenmiş olur. EtO molekülünün MO hücresi içindeki hayati öneme sahip moleküllere rahatlıkla ulaşabilmesi, ortamda yeterli düzeyde suyun bulunmasına bağlıdır¹⁶.

Alkilleyici reaksiyon aynı zamanda çözelti içinde bulunan ilaç molekülleriyle de oluşabilir. Bu nedenle farmasötik formülasyon açısından sadece toz halinde, su içermeyen ürünlere EtO sterilizasyonu uygulanabilir. Buna karşılık her çeşit plastik ve kauçuk malzeme, hassas optik aletler bu yolla sterilize edilebilir. Ayrıca paslanmaz çelik malzemelerin bu yolla sterilizasyonu, buhar sterilizasyonuna göre ömürlerinin uzaması nedeniyle tercih edilmektedir.

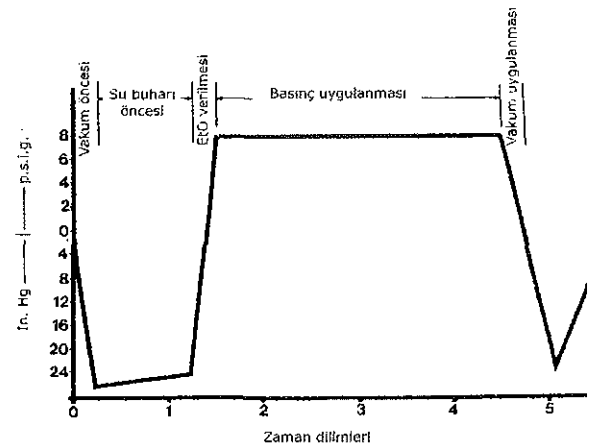
Plastik veya kağıt ile ambalajlanmış parenteral ürün uygulama setleri, iğneler, plastik şırıngalar ve benzeri malzemeler ambalajları içinde bu şekilde sterilize edilebilir. Ancak kullanılan ambalajın hava, gaz ve nemin girişine/çıkışına izin verip MO'ların dışardan girişini engelleyecek özellikte olması gerekir. Ayrıca ambalajın geçirgenliği veya gözenekliliği basınç ve vakum uygulamaları ile değişmemelidir. Polietilen, polipropilen, naylon, polivinil klorür ve kağıttan imal edilmiş ambalajlar bu koşulları yerine getirmektedir. Bunlar içinde naylon, diğer plastiklere göre geçirgenliğinin daha düşük olması nedeniyle daha uzun sterilizasyon süresi gerektiren bir maddedir. Ambalaj maddesi olarak sıklıkla kullanılan alüminyumun, geçirgen olmaması nedeniyle EtO sterilizasyonu uygulanacak bir malzemenin ambalajında kullanılmaması gerekmektedir¹⁷.

EtO sterilizasyonunda işlemin yapılmasına olanak veren etüvler kullanılır (Şekil 5.14). Önce sterilize edilecek malzemenin su buharı ile doyurulması önerilmektedir. Malzemelerin sterilizasyonun gerçekleşeceği odaya yerleştirilmesinden sonra oda 55°C'ye kadar ısıtılarak 0,902 atm (=27 inç Hg) düzeyinde vakum uygulanır ve hava dışarıya çekilir. Bundan sonra EtO gaz karışımı ile beraber % 50-60 bağıl nem sağlayacak kadar su buha-

rı odaya gönderilir. Oda içinde gerekli EtO derişimini sağlayabilmek için Tablo 5.4'de verilen basınçlardan biri seçilir. MO yüküne (bioburden) bağlı olarak bu koşullarda 6 ile 24 saat arasında beklenir. Sıcaklığın daha düşük olması gereken durumlarda bu süre 36 saate kadar çıkabilmektedir¹¹. Bu sürenin sonunda oda içindeki gaz karışımı 0.836 atm (=25 inç Hg) değerinde vakum uygulanarak geri çekilir ve yerine süzülerek sterilize edilmiş hava gönderilerek oda basıncının atmosfer basıncına çıkması sağlanır³. Sterilizasyon döngüsü ve vakum ile basıncın uygulandığı aşamalar Şekil 5.15'de gösterilmiştir¹⁷.



Şekil 5.14 EtO ile yapılan sterilizasyon işleminde kullanılan sterilizatör⁶



Şekil 5.15 Etilen oksitin kullanıldığı sterilizasyon döngüsü¹⁷

Etilen oksit ile MO'ların öldürülmesi, ortamdaki bağıl nem oranına, EtO derişimine, sıcaklığa ve sterilizasyon koşullarında malzemelerin bekleme süresine bağlıdır¹⁷. EtO'e karşı bakteri sporlarının beş kat daha dirençli olduğu gösterilmiştir¹⁶.

EtO sterilizasyonu için nemin varlığı çok önemlidir. Mesela bakteri sporlarının kuru durumda olması, EtO'nin etkisinin çok azalmasına neden olmaktadır. Sporların EtO'e karşı gösterdiği direnci kırmak için ortamda yüksek oranda nem bulunmalıdır. % 40-70 (ortalama % 50) oranında bağıl nem, kuru spor oluşumunu en alt düzeyde tutacak koşuldur. Yapılan bir çalışmada, bağıl nemin % 97 olması ile EtO'nin öldürücü etkisinin, bağıl nemin % 28 olmasına göre 10 kat arttığı bulunmuştur¹⁷. Nemini kaybetmiş MO'ların nem içeriklerini normal duruma getirmek zaman alır ve EtO ile beraber su buharının sterilizasyon odasına gönderilmesi, MO'ların kaybettikleri nemi yerine koymaya yetmeyebilir. Bu nedenle sterilizasyon işlemine başlamadan önce, oda içine yerleştirilen malzemenin nem ile doyurulması önerilir ve odaya % 98 relatif nem sağlayacak kadar su buharı gönderilerek en az 60 dakika beklenir.

EtO sterilizasyonunda, sterilizasyonu gerçekleştirecek gaz karışımının, odacığın her tarafına eşit olarak yayılabilmesi için vakum pompası ile odacık içindeki hava çekilir. Uygulanan vakum, sterilize edilecek malzemeden ve MO'lardan da bir miktar suyu uzaklaştıracaktır. İşlem sırasında sıcaklığın 55°C'ye kadar çıkarılması su kaybını daha da artırır. Bu nedenle kaybolan suyun yerine konabilmesi için sterilizasyon odasına gaz ile birlikte su buharı da gönderilir¹⁶.

Sıcaklığın yüksek olması, EtO'nin bakteri hücrelerine girişini kolaylaştırmakta ve sterilizasyon için gerekli zamanı azaltmaktadır. Bu nedenle sterilizasyon odası yaklaşık 55°C'ye kadar ısıtılır. Sıcaklık artışının, EtO sterilizasyonu üzerine etkisi Şekil 5.2'de bir örnekle gösterilmiştir. EtO miktarının fazla olması da sterilizasyonu olumlu yönde etkiler ve sterilizasyon süresi kısalmır. EtO'nin etkili olduğu en düşük derişim, 450 mg/L'dir. Bu derişim 1500 mg/L'ye kadar çıkarılabilmektedir¹¹.

EtO sterilizasyonunda malzemeler sterilizasyon odasının içine, hem odanın çeperleri ile hem de kendileri arasında nem ve gazın rahatlıkla dolaşabileceği şekilde boşluk bırakarak yerleştirilmelidir. Bu, sterilizasyon işleminden sonra gazın kolaylıkla uzaklaştırılması için gerekli bir durumdur. İşlem sonrası ürünün gazdan tümüyle kurtarılması için sıcaklık ayarlanıp kontrollü hava akımı sağlanır. Böylece EtO ve artıkları kolayca havaya karışarak sterilizasyon odasından uzaklaştırıl-

mış olur. Ancak kauçuk veya bazı plastiklerden EtO'nin uzaklaştırılması zaman alır. Bu nedenle havalandırma işlemi 24 saate kadar çıkabilmektedir. Bu süreç içinde üründen alınan örneklerde EtO kalıntı testi yapılarak, EtO'nin farmakopelerde bildirilen üst sınırın altına inip inmediği takip edilir.

Plastik malzemede EtO ve artıklarının kalması insan sağlığı açısından bazı sakıncalar oluşturmaktadır^{3,17}. Sterilizasyon sonucunda üründe, EtO'nin yanısıra toksik özellikli iki reaksiyon ürününün (etilen klorohidrin ve etilen glikol) kalma olasılığı vardır. Bu maddelerin çalışma koşullarında karşı karşıya kalınan derişimlerinin mutasyona ve kansere neden olup olmadığı araştırılmaktadır¹⁷. EtO'nin tümüyle uzaklaştırılmadığı malzemelerin deri ile uzun süre temas etmesi, iritasyona neden olmaktadır. Ancak sterilizasyon işlemi ile ürünün kullanımı arasında geçen sürede ürün içinde kalan EtO'nin malzemeyi terkedeceği belirtilerek, esas sorunun sterilizasyon işlemi gerçekleştiren kişilerin başta solunum yolu ile olmak üzere bu molekülle temas etmeleri olduğu bildirilmiştir¹⁶.

Hidrojen peroksit (HP) gazı ile sterilizasyon: Oda sıcaklığında sıvı olan HP buharlaştırıldığında, değişik aletler ve ambalaj malzemeleri için etkili bir yüzey sterilizasyon maddesi olarak kullanılır. Dondurarak kurutma ve değişik doldurma sistemleri gibi çok karmaşık aletlerin sterilizasyonunun yanı sıra temiz oda oluşturmak için de kullanılmaktadır. Bu sterilizasyon işleminde gazın, sterilize edilecek yüzeyin her tarafına temas etmesi sağlanmalıdır⁸.

HP gazı ile yapılan bazı sterilizasyon işlemlerinde, HP sıcak ve nemli ortamda kullanılır. Bu şekilde işlem süresi kısalmakta ve HP'nin ortamdaki uzaklaştırılması kolaylaşmaktadır. Bu uygulamada önce 80°C'ye kadar ısıtılmış kuru hava HEPA filtreden geçirilerek sterilize edilecek alana gönderilir. Daha sonra ortama buhar verilerek yüzeylerin sıcaklığının 100°C'ye çıkması sağlanır. Bu esnada HP de verilir ve sterilizasyon başlamış olur. Sterilizasyon süresi sonunda nem ve peroksit verilmemesi için kuru sıcak hava gönderilmeye başlanır. Bu, HP'nin büyük bir kısmının dışarı atılmasını, kalanının ise su ve oksijene dönmesini sağlar. En son olarak steril hava gönderilerek işlem bitirilir.

Su buharı ve HP, sterilizasyon işlemi sırasında sinerjik bir etki oluşturmaktadır. Öyle ki, *B. stearothermophilus*'un 121°C'de yapılan otoklav sterilizasyonu 27 dakika sürerken, 100°C'de normal atmosfer basıncında HP ile yapılan sterilizasyonu için 12 dakika yeterli olmaktadır.

Klor dioksit (KD) gazı ile sterilizasyon: Klor dioksit (eu-chlorine) yeşil-sarı renkli bir gazdır. Bakterisit, virüsit ve sporisit etkilidir. Ozon tabakasına da zarar vermez. Vakumda ve düşük derişimde kullanılması nedeniyle, EtO'in yerine kullanılabilir bir gaz olarak kabul edilmektedir⁸.

Klor dioksit gazı yüksek basınçta depolanamaz ve saklanamaz, kimyasal reaksiyon sonucunda elde edilir. Bu amaçla seyreltik klor gazı (% 2 Cl₂ +% 98 N₂) ve katı sodyum hipoklorür kullanılır. Seyreltik gaz ve NaClO₂ bir araya gelince KD gazı oluşur ve bu hemen sterilizasyon bölgesine gönderilir. Sterilizasyon işleminden sonra bu gaz bir dönüştürücüde sodyum tiyosülfatı, sodyum sülfata döndürür. Böylece havaya azot gazı ve ancak ppm düzeyinde KD karışmış olur.

Bu gazla sterilizasyon işlemi uygulanırken, önce sterilizasyon odasına vakum uygulanır. Daha sonra % 70 - 85 bağıl nem sağlayacak kadar buhar gönderilerek 30-60 dakika beklenir ve ortama 10-30 mg/L derişimde KD gönderilir. Bu arada basınç biraz yükselir ve N₂ gazı ile hava karışımı gönderilerek basıncın 80 kPa'a (kiloPascal) kadar çıkması sağlanır. Bu koşullarda yaklaşık bir saat beklendikten sonra vakum uygulanarak oda içindeki gaz karışımı alınıp yerine sterilize edilmiş hava gönderilir. Bu işlem birkaç kez tekrarlanır. Yaklaşık 15 dakikalık havalandırma işlemi sonunda sterilize edilmiş yüzey üzerinde en fazla 1 ppm KD kalmaktadır. Sterilizasyon sıcaklığı 30-32°C'dir. *B. subtilis* sporları ile yapılan bir çalışmada 10 mg/L derişimdeki gaz ile 45 saniyelik D süresi saptanmıştır. Derişim 30 mg/L'ye çıktığında bu değer 7 saniyeye kadar düşmüştür.

Bu gazla naylon, polietilen, polipropilen, polistiren ve teflon herhangi bir sorun olmadan sterilize edilebilmektedir. Polikarbonatın ve poliüretanın ise, renkleri kaybolabilmekte ve gerilme özellikleri azalabilmektedir. Paslanmaz çelik malzemeler KD'den etkilenmezken, bakır ve alüminyum malzemelerde değişiklikler oluşmaktadır.

Aseptik yöntem (Aseptik ortamın sağlanması)

Aseptik yöntem, MO'ların işlem sahasından uzak tutulması durumudur¹⁷. Aseptik teknikte havadaki olası MO'ları öldürmek için UV lambaları veya kimyasal aerosoller kullanılır. Çoğunlukla yapılan işlem MO'nun aseptik alana girişini engellemektir. Bu amaçla hava HEPA filitrelerden süzülerek çalışma ortamına verilir¹⁸. HEPA (High Efficiency Particulate Air) filtrelerin kullanıldığı çalışma alanı, tek yönde laminar hava akışının sağlandığı bir ortamdır. Bu ortamlarda hava önce bir ön filtreden, sonra HEPA filtreden geçirilir. HEPA filtrelerin yapısı, selüloz, cam pamuğu, cam iplikcikleri veya politetrafloro etilen (PTFE)'nin, reçine veya akrilik bağlayıcılarla birlikte kullanıldığı bir yapıdır. Bu maddelerin sıkıştırılması ile elde edilen tabakalar akordeon tarzında katlanarak plise oluşturulur. Daha sonra bu tabakalar üst üste konarak metal bir çerçeve içine sıkıştırılırlar.

Aseptik koşulun sağlandığı ortamlar İngiliz standartlarına göre Sınıf 1 (Class 1), Amerikan standartlarına göre ise Sınıf 100 (Class 100) olarak isimlendirilmişlerdir. Sınıf 1, bir metreküp havada 0.5 µm veya daha büyük boyutta en fazla 3000 adet MO olabileceğini gösterir. Sınıf 100 ise, bir metreküp havada 0.5 µm veya daha büyük boyutta en fazla 3500 adet MO olabileceğini gösterir. Sınıf 1 koşulunu sağlayacak HEPA filtrenin süzme veriminin % 99.997 olması gerekir. HEPA filtrelerden en yüksek verimi alabilmek için hava hızının 0.30-0.45 metre/saniye olması gerektiği belirtilmiştir. HEPA filtrenin Sınıf 1 koşulunu sağlayıp sağlayamadığı DOP (dioktil fitalat) testi yapılarak anlaşılır^{18,19}. Bu madde ısı ile buharlaştırıldığında, hepsi 0.3 µm boyutuna sahip damlacıklar oluşur. DOP buharı HEPA filtreye gönderilerek filtreden geçip geçemediği incelenir.

Sterilizasyonun Denetimi

Sterilizasyon işleminin denetimi, işlem-içi (in-process control) ve işlem sonrası (product control) olmak üzere iki aşamada yapılmaktadır¹¹.

İşlem içi denetimler

Sterilizasyonda işlem içi denetimler için temel olarak kullanılan yöntemlere ait bazı fiziksel ölçümler yapılır. Ayrıca kimyasal indikatör veya biyolojik indikatör (BI) kullanılarak olması gereken sterilizasyon koşullarının

sağlanıp sağlanmadığı, kısaca işlemin geçerli olup olmadığı saptanır^{11,20}.

Fiziksel ölçüm yapılarak işlemin incelenmesi

Kuru ısıda veya sıcak doygun buharla yapılan sterilizasyon yöntemlerinde sıcaklık kontrolü için çoğunlukla termometre kullanılmaktadır. Ancak duyarlılığı çok iyi olmadığı ve belli zamanlarda kalibre edilmesi gerektiği için termometre yerine, sıcaklık duyarlarının (thermocouple, termoçift) kullanımı tercih edilmektedir. Direnç (resistance) termometreleri ve termistorları da sıcaklık değişimine çok duyarlı olmalarına rağmen, otoklav koşullarının aşındırıcı etkisine yeterince direnç gösteremedikleri için bu amaçla pek kullanılmazlar. Sıcaklık ölçümü, sterilizasyon odasının veya malzemenin en soğuk ve en geç ısınan bölgesinin tespiti veya sterilizasyon sırasında ulaşılmaması gereken sıcaklığın sağlanıp sağlanmadığının tespiti için yapılan çok önemli bir ölçümdür. Sterilizasyon sırasında basıncın değişimi ise, uygun özellikteki bir basınç ölçerle saptanabilir. Sıcaklık ve basınç için uygun ölçme yöntemleri kullanılmasına rağmen, oda içindeki bağıl nemi veya buharın doygunluk derecesini ölçen başarılı bir yöntem yoktur. Bu amaçla kullanılacak çiy noktası (dew point) higrometreleri sterilizasyon koşullarından etkilenmekte, kalorimetre ölçümleri ise, çok yavaş sonuç vermektedir.

Sterilizasyonun filtre kullanılarak yapılması durumunda ise, işlem içi denetim olarak filtrenin kontrolü yapılmaktadır. Bu amaçla filtrenin gözenek çapı saptanmakta ve bütünlüğünün tam olduğunu gösteren kabarcık noktası deneyi yapılmaktadır (Bkz. Bölüm:4, Süzme). Steril süzme işleminin aseptik koşullarda yapılması gerektiği için bu koşulun sağlanmasında havanın süzülmesi amacıyla kullanılan HEPA filtrelerinin kontrolü DOP testi kullanılarak yapılır.

Radyasyonla sterilizasyon sırasında uygulanan radyasyonun dozunu tespit edecek dozimetreler, gaz ile sterilizasyon yapıldığında ise, gaz analiz aletleri sterilizasyon odasının içine yerleştirilerek ilgili yöntemlerin fiziksel denetimleri yapılabilir.

Kullanılan sterilizasyon aletinin denetimi ve kalibrasyonunun düzgün olarak zamanında yapılması, işlem içi fiziksel kontrol sonuçlarının tam olmasını sağlar.

Kimyasal indikatör kullanılarak işlemin incelenmesi

Kimyasal indikatörler^{11,20}, sterilizasyon işleminin bir veya iki değişkeninin kimyasal yöntemle takip edilmesini sağlayan madde veya madde karışımlarıdır. Büyük bir kısmı ilgili sterilizasyon koşulu sağlandığında renk değiştirir. Kimyasal indikatörler bir sterilizasyon işleminde sterilizasyonun gerçekleştiği aşamaya ait zaman, nem oranı, gazın veya nemin malzemelere giriş yapıp yapmadığı gibi, çok önemli bazı parametrelerin tümü hakkında yeterli bilgi veremez. Bu indikatörler diğer denetimlerle beraber değerlendirildiğinde anlamlı bir sonuç elde edilebilir.

Kuru ısı için kullanılan kimyasal indikatörler, ilgili sıcaklığa ulaşıldığında ya eriyen ya da renk değiştiren yapılar içermektedir. Otoklavda kullanılmak üzere geliştirilmiş indikatörler ise, ya ilgili sıcaklığa ulaşıldığında eriyen, ya da doygun buhar ortamında oluşan kimyasal bir reaksiyon sonucunda rengi değişen maddeleri içermektedir. Isı veya ısı+doygun buhar ortamında kullanılacak çok sayıda ticari kimyasal indikatör bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda örnek olarak anlatılmıştır:

Bowie-Dick testi özellikle ameliyathane giysi veya örtülerinin, sterilize edilmesi gereken her türlü kumaş benzeri malzemenin sterilizasyonu için kullanılan, yüksek vakum gücüne sahip otoklavlarda, hergün uygulanabilecek bir testtir. Bu amaçla üzerinde X şeklinde işaret bulunan özel bir kağıt kullanılır. İşaret, ısıya hassas maddeler içerir. Bu kağıt, malzemelerin ortasına su buharının zor girebileceği bölgeye yerleştirilir. Sterilizasyon işlemi sonunda rengin tümüyle değişmesi, havanın tümüyle çekildiğini ve su buharının bu bölgeye kadar girebildiğini gösterir.

Browne tüpleri, ısı ile sterilizasyon yöntemlerinde çok kullanılan ucuz ve ticari kimyasal indikatörlerdir. Tümüyle kapalı olan ve kırmızı renkli bir sıvı (etilen klorhidrin) içeren bu tüpler ilgili sıcaklığa gelindiğinde renk değiştirirler ve yeşile dönerler. Renk değiştirdikleri sıcaklığa göre dört farklı çeşit tüp bulunmaktadır:

- 1.tüp (siyah noktalı): 126°C'nin altındaki sıcaklıkta,
- 2.tüp (sarı noktalı): yüksek vakumun uygulandığı otoklavlarda (130°C ve yukarısı),
- 3. tüp (yeşil noktalı): kuru ısı ile yapılan etüv sterilizasyonunda (160°C)

- 4. tüp (mavi noktalı): IR ile ısıtılan sıcak hava tünellerinde yapılan sterilizasyon için (180°C)

Mor renkli *Klintex kağıtları* buhar ortamında renklerini kaybeden ticari kimyasal indikatörlerden biridir. Öyle ki, sterilizasyon işleminden sonra "**autoclaved**" (otoklavlanmış) kelimesi siyah renkte belirirken, kağıdın zeminini beyaz renge dönmektedir.

EtO sterilizasyonu için kullanılan indikatörler, EtO ile kimyasal reaksiyona girip, zaman ve sıcaklığa bağlı olarak renk değiştiren maddelerdir. Bazıları ortamın nemine karşı da duyarlıdır. "Royce sachet" olarak bilinen bu indikatör, magnezyum klorür, HCl asit ve bromofenol mavisi içeren polietilen bir torbadır. EtO derişimi ve temas süresine bağlı olarak torba içine giren EtO, etilen klorohidrin oluşumuna neden olur ve renk sarıdan pembeye döner.

İyonize edici radyasyonun kullanıldığı sterilizasyon için kullanılan indikatörlerin bir kısmı radyasyon varlığında renk değiştiren maddeleri içerir. Kalitatif dozimetre olarak bilinen bu yapılar için radyasyon dozunun az veya çok olması önemli değildir. Bazıları ise, aldıkları radyasyon dozunun değişik yöntemlerle saptanmasına olanak veren kimyasal yapılar içermektedir. Kuantitatif dozimetreler olarak bilinen bu indikatörler kırmızı polimetil metakrilat veya naylon-polivinil klorürden imal edilmiş ince şeritlerdir. Bunlardaki optik yoğunluk sterilizasyon işleminden sonra görünür dalga boyunda spektrofotometrede doğrudan okunur ve sterilizasyon öncesi ile kıyaslanır.

Biyolojik indikatör kullanılarak işlemin incelenmesi

Biyolojik indikatörler (Bİ) sterilizasyon işleminin denetlenmesi için kimyasal indikatörlerden çok daha güvenilir sonuçlar vermektedir^{11,20}. Bunlar doğrudan malzemenin içine yerleştirilebilir. Bİ'ler sterilizasyon işlemi sonunda uygun besi ortamlarına ekilir ve MO üremesinin olup olmadığı incelenir. Alınan sonuç, sterilizasyonun tümü içindir ve tüm değişkenlerin birlikte değerlendirilmesini sağlarlar. Sterilizasyon yöntemi için kullanılması gereken Bİ'ün ilgili yöntem en dayanıklı MO olması gerekir. Bu amaçla genellikle dirençli bakteri sporları kullanılır. Ancak doğru sonucu alabilmek için seçilen MO'nun sterilizasyon işleminden sonra kendi kendini yenileme özelliğinin olup olmadığına bakıl-

malıdır. Ayrıca Bİ'ün saklama koşullarının çok dikkatle belirlenmesi gerekir. Belli bir sterilizasyon yöntemi için kullanılan biyolojik indikatörün ilgili sterilizasyon koşullarına uygun olarak hazırlanmış olması tercih edilir. Mesela, otoklavda kullanılacak Bİ, MO'nun sulu süspansiyonu şeklinde, kuru ısı için kullanılacak Bİ ise MO'nun kum içinde hazırlanmış şekli olabilir.

En fazla kullanılan Bİ'ler aşağıda verilmiştir¹¹:

- I. Sıcak doygun su buharının kullanıldığı sterilizasyon tekniği için:

◊ *B. stearothermophilus* ve

◊ *B. Coagulans*

- Filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş şekilde
- PVC şeritler üzerinde kurutulmuş şekilde
- Sulu süspansiyon şeklinde

- II. Kuru ısı sterilizasyonu için:

◊ *B. subtilis var. niger* ve

◊ *Cl. sporogenes*

- Alüminyum yaprak üzerinde kurutulmuş şekilde
- Cam üzerinde kurutulmuş şekilde
- Paslanmaz çelik ince şerit üzerinde kurutulmuş şekilde
- Steril yıkanmış kum içinde kurutulmuş şekilde

- III. İyonize radyasyonun kullanıldığı sterilizasyon tekniği için:

◊ *B. pumilus* ve

◊ *B. sphaericus*

- Filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş şekilde
- Alüminyum yaprak üzerinde kurutulmuş şekilde

- IV. EtO gazının kullanıldığı sterilizasyon tekniği için:

◊ *B. subtilis var. niger*

- Alüminyum yaprak üzerinde kurutulmuş şekilde
- PVC şeritler üzerinde kurutulmuş şekilde

Yukarıda bildirilen ve ticari olarak satılan indikatörlerin içerdiği spor sayısı genellikle 10^5 ile 10^7 arasında veya daha fazla olabilmektedir. Sterilizasyon odası içine veya malzemelerin arasına ilgili Bİ biriminden en az 10 adet yerleştirilir.

Sterilizasyon amaçlı süzme işleminde de bazı durumlarda B1 kullanılması gerekebilir. Bu durumda belli sayıda MO içeren belli hacimdeki çözelti filtreden süzülerek, süzüntüye MO geçip geçmediği saptanır. Bu amaçla *Serratia marcescens*, *Pseudomonas diminuta* veya *B. subtilis var. niger* sporları kullanılır.

Düşük sıcaklıkta formaldehit varlığında yapılan sterilizasyon için ise, *B. stearothermophilus* sporları kullanılmaktadır.

İşlem sonrası denetimler

İşlem sonrası yapılan denetimlerde sterilizasyonu tamamlanan ve steril olduğu varsayılan malzemenin steril olup olmadığı mikrobiyolojik yöntemle saptanır. Bu amaçla steril olduğu düşünülen malzemeden uygun koşullarda ve şekilde örnekler alınıp, uygun kültür ortamı ile inkübasyona bırakılır. Deney sonucunda MO üreyip üremediği incelenir. Bu denetimde dikkat edilmesi gereken bazı konular vardır⁷. Bunlar:

1. Bu kontrol, sterilizasyon odasından çıkan bütün birimlere tek tek uygulanamaz. Bunlar içinden uygun sayıda örnek alınarak yapılan denetim sonucunda, tüm birimler için steril olma olasılığından veya mikrobiyolojik bulaşma seviyesinden bahsedilebilir. Bu konu daha sonra açıklanmıştır.
2. Seçilen üreme ortamı (besi yeri), sayısı çok az bile olsa MO'nun rahatça büyüyeceği ve üreyebileceği özellikte olmalıdır. Bu özellikle patojen MO'lar için çok önemlidir. Ancak malzemede olma olasılığı olan değişik MO'ların hepsi için uygun bir besi yeri ayarlamak çok zordur.
3. Malzemede antimikrobik özellikli bir yapı var ise, bunun etkisinin yok edilmesi sağlanmalıdır.
4. Deney sırasında dışarıdan herhangi bir bulaşma olmaması için, çalışmanın aseptik koşullarda ve bu konuda uzmanlaşmış kişiler tarafından yapılması gerekir.

Mikrobiyolojik bulaşma seviyesi/oranı:

Aseptik ortamda yapılan işlemler için sterilite güven düzeyinin (sterility assurance level, SAL), diğer bir ifadeyle, ürünün kontamine olma olasılığının, 10^{-3} olmasının yeterli olacağı bildirilmiştir. Bu değer diğer sterilizasyon teknikleri için 10^{-6} olması gerekmektedir. 10^{-6} 'nın anlamı şudur: Sterilizasyon sonunda ürünün

steril olmama olasılığı milyonda birden ($1/10^6$) fazla olamaz. Bir milyon birim içeren bir üretimde sterilizasyon sonucunda birimlerden en fazla bir tanesi steril olamaz, geriye kalan bütün birimlerin steril olması gerekir.

Benzer şekilde 10^{-3} , aseptik ortamda yapılan işlem sonucunda ürünün steril olmama olasılığı binde birden ($1/10^3$) fazla olamaz şeklinde açıklanmaktadır. Kısaca aseptik ortamda yapılan işlemlerde işlemin geçerli olabilmesi için mikrobiyolojik bulaşma oranının en fazla % 0.1 olması gerekmektedir.

Aseptik ortamda üretilmiş ve N birimden oluşan bir üretimin içinden R adet örnek alındığını varsayalım. Seçilen R adet birimin hepsinde MO üreme olasılığı R/N kadardır. "p" ile gösterilen bu oran, seçilen R birimin steril olmama olasılığını (MO bulaşma olasılığını) verir. "q=1-p" ise, üretimde MO üremeyen kesri, yani geriye kalan birimlerin steril olma olasılığını gösterir. Binomiyal bir dağılım söz konusu olduğuna göre N birimden oluşan üretime ait standart sapma (SS) değeri $SS = \left(\frac{pq}{N}\right)^{1/2}$ ile hesaplanır. Ayrıca 200'den fazla birim söz konusu olduğunda, % 95 olasılıkla *student t* değeri 1.96 olarak kabul edilir ve üretime MO bulaşma olasılığının alt ve üst limitleri $p \pm 1.96 SS = p \pm 1.96 \left(\frac{pq}{N}\right)^{1/2}$ işlemi ile hesaplanabilir².

Örnek: Aseptik bir ortamda 3000 birimden oluşan bir üretimin yapıldığı ve bu işlem sırasında 5 birime MO bulaştığı bildirilmiştir. Bu durumda tüm üretimin aseptik koşullarda yapıp yapılmadığına (steril olup olmadığına) karar verebilmek için mikrobiyolojik bulaşma oranı aşağıdaki gibi hesaplanır.

Çözüm:

$$p = 5 / 3000$$

$$q = 1 - p = 1 - \frac{5}{3000}$$

$$\text{Standart sapma (SS)} = \left[\frac{p \cdot q}{N} \right]^{1/2}$$

$$SS = \left[\frac{(5/3000) \left[1 - (5/3000) \right]}{3000} \right]^{1/2}$$

Ürünün steril olmama olasılığının üst sınırı:

$$p + (1.96 \cdot SS) = 0.003 = \%0.3$$

ürünün steril olmama olasılığının alt sınırı:

$$p - (1.96 \text{ SS}) = 0.0002 = \%0.02$$

Sonuçta ürünün steril olmama olasılığının en fazla % 0.1 olması gerekirken, % 0.3 olarak bulunmuştur. Bu durumda aseptik üretimin geçerli olmadığı sonucuna varılır:

Ürünün steril olarak kabul edilme olasılığı (P^*):

Bu değer üretilen seriden rasgele seçilen örnek sayısına (n) ve sterilite güven düzeyine (=MO bulaşma olasılığı, p) bağlıdır. 5.13 eşitliği kullanılarak hesaplanan P^* değerleri Tablo 5.5'de gösterilmiştir.

$$P^* = (1 - p)^n \quad (5.22)$$

Değişik kaynaklar ve farmakopelerde de olan bu tablodan anlaşılacağı gibi, kontaminasyon oranı azaldıkça ürünün steril olarak kabul edilme olasılığı artmaktadır. Ayrıca seriden alınan örnek sayısı arttıkça, kontamine olma olasılığı olan serinin steril olarak kabul edilme olasılığı azalmaktadır. Sterilite kontrol deneyleri sırasında alınan numunelerden birinde bile MO üremesi saptanırsa, üretilen bu serinin steril olmadığı sonucuna varılır^{7,20}.

Diyelim ki, üretilen seriden 20 birim alındı. Çalışma koşullarının MO organizma bulaşma düzeyi 10^{-3} (= % 0.1) ise, üretilen serinin steril olarak kabul edilme olasılığı,

$$P^* = 1 - \frac{0.1}{100} = 0.980$$

olarak bulunur.

Sterilizasyonun validasyonu

Bu başlık altında farmasötik teknolojide daha geniş bir alanda kullanılan buhar sterilizasyonu ve aseptik ortamda yapılan süzme işleminin validasyonundan bahsedilecektir^{3,21}.

Buharla yapılan sterilizasyon işleminin validasyonu, uygulanması gereken bir dizi adımdan oluşur. Bunlar aşağıda verilmiştir:

- Sterilizasyonda kullanılacak alet (sterilizatör) denetlenmeli, işlemi tam ve doğru yapacağı saptanmalı ve bu işlemlerin hepsi belgelendirilmelidir.
- Buhar sterilizasyonuna dayanıklı uygun bir biyolojik indikatör seçilmeli; bu MO için D ve Z değerleri deneysel olarak saptanmalıdır.
- Sterilizasyon odası boşken sıcaklık dağılımı saptanmalı ve en serin bölge saptanmalıdır.
- Sterilizasyon odası, sterilize edilecek malzeme ile doldurulduktan sonra ısı dağılımı ve en serin bölge tekrar saptanmalıdır.
- Sterilizasyon odasının en serin bölgesinde bulunan malzemeye ve ısı penetrasyonunun en yavaş olduğu bölgeye ısı girişi (penetrasyonu) saptanmalıdır.
- Zaman, sıcaklık ve sterilize edilecek malzemenin yerleştiriliş şeklinin biyolojik indikatörün yok edilmesi üzerine ve F_0 değeri üzerine etkisi değerlendirilmelidir.
- İstenen F_0 değerine ve/veya biyolojik indikatörün yok edilmesinde istenen olasılığa ulaşabilmek için sterilizasyon işlem süresi saptanmalıdır.
- İstenen hedeflere ulaşıncaya kadar sterilizasyon işlemi tekrar edilmelidir.

Tablo 5.5 Farklı MO bulaşma seviyelerinde, üretilen serinin steril olarak kabul edilme olasılığı (P^*)

Seriden alınan örnek sayısı (n)	Mikroorganizma bulaşma seviyesi (% veya p olarak)				
	% 0.0001 (=10 ⁻⁶)	% 0.01 (=10 ⁻⁴)	% 0.1 (=10 ⁻³)	%1 (=10 ⁻²)	% 10 (=10 ⁻¹)
5	0.999995	0.9995	0.995	0.951	0.591
10	0.99999	0.999	0.990	0.904	0.348
20	0.99998	0.998	0.980	0.818	0.122
50	0.99995	0.995	0.951	0.605	0.00515
100	0.9999	0.990	0.904	0.366	~ 0
300	0.9997	0.970	0.740	0.049	~ 0
500	0.9995	0.951	0.606	0.00657	~ 0

- Sterilizasyon döngüsünün niteliğini gösteren ve kontrol edilmesini sağlayan bir program kurulmalıdır.
- Gelecekte yapılabilecek değişiklikler veya ortaya çıkacak sorunlar da düşünülerek standart sterilizasyon işlemi çikartılmalıdır.

Aseptik ortamdaki süzme işleminin validasyonu için ise aşağıdaki işlemler yapılmaktadır:

- Aseptik süzme yapılacak ortam veya alan, kullanılacak aletler, hava kalitesi ve diğer mühendislik ölçütleri uygun şekilde değerlendirilmelidir.
- Aseptik süzme alanındaki yüzeylerde ve havada, normal koşullarda varolan mikrobiyolojik bulaşma seviyesini saptamak için mikrobiyolojik kontrol yapılmalıdır.
- Mikrobiyolojik kontrolde kullanılacak MO'ların üretmesi için hassas bir besi ortamı ve aseptik süzme validasyonu için en uygun MO seçilmelidir.
- Daha önce valide edilmiş bir sterilizasyon yöntemi ile süzmede kullanılacak tüm alet veya malzemeler ile besi yeri sterilize edilmelidir.
- Yukarıdaki işlemler tamamlandıktan sonra yapılacak aseptik süzme işlemi önceden denenmelidir. Bunun için daha önce sterilize edilmiş kapların içine, aseptik ortamda steril süzme için kullanılacak filtre ile bilinen derişimde bilinen bir MO'yu içeren besi yeri süzülür. Bu işlem MO içermeyen besi yeri ile de yapılır (kontrol grubu). Daha sonra kontrollerle birlikte süzülen ürün inkübasyona bırakılır ve yüzde mikrobiyolojik bulaşma seviyesi saptanır. Bu işlem istatistik değerlendirme yapılabilmesi için yeter sayıda tekrar edilmelidir.
- Mikrobiyolojik bulaşma seviyesi % 0.1'den fazla bulundu ise, bütün deneysel test sonuçları, sterilizasyon kayıtları, diğer veriler ve test koşulları tekrar gözden geçirilerek mikrobiyolojik bulaşma seviyesinin % 0.1'in altına düşmesi sağlanmalıdır.

Kaynaklar

1. Parker MS, "Microbiological contamination and preservation of pharmaceutical preparations", *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, (Ed: ME Aulton), Churchill Livingstone, New York, 1988, s.479-490.
2. Groves MJ, "Sterilization and depyrogenation", *Parenteral Technology Manual*, (Ed: MJ Groves), Interpharm Press Inc., USA, 1989, s. 119-144.
3. Avis KE, Aker MJ, "Sterilization", *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, (Ed: L Lachman, HA Lieberman, JL Kanig), Lea & Febiger, USA, 1986, s.619-638.
4. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, "The growth, survival and death of microorganisms", *Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology*, (Ed: GF Brooks, JS Butel, SA Morse), Appleton Lange, Stamford-Connecticut, 1998, s.47-55.
5. Swarbrick J, Boylan JC, "Autoclaves and autoclaving", *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, (Ed: J Swarbrick, JC Boylan), Marcel Dekker Inc., New York, 1988, s.393-413.
6. Philips GB, Miller MS, "Sterilization", *Remington's Pharmaceutical Sciences*, (Ed: A Osol, GD Chase, AR Gennaro, MR Gibson, CB Granberg, SC Harvey, RE King, AN Martin, EA Swingyard, GL Zink), Mack Pub. Co., Easton Pennsylvania, 1980, s.1390-1402.
7. Soper CJ, "Principles of sterilization", *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, (Ed: ME Aulton), Churchill Livingstone, New York, 1988, s.472-478.
8. Garfinkle BD, Henley MW, "Sterilization", *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, (Ed: AR Gennaro), Lippincott Williams-Wilkins, USA, 2000, s.753-779.
9. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, "Heat sterilization", *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, (Ed: AD Russell, WB Hugo, GAJ Ayliffe), Blackwell Scientific Pub., London, 1982, s.433-453.
10. Hanlon GM, Hodges NA, Parker MS, "The action of physical and chemical agents on microorganism", *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, (Ed: ME Aulton), Churchill Livingstone, New York, 1988, s.472-471.
11. Soper CJ, "Sterilization Practice", *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, (Ed: ME Aulton), Churchill Livingstone, New York, 1988, s.700-711.
12. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, "Ultraviolet radiation", *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, (Ed: AD Russell, WB Hugo, GAJ Ayliffe), Blackwell Scientific Pub., London, 1982, s.534-547.
13. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, "Radiation sterilization", *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, (Ed: AD Russell, WB Hugo, GAJ Ayliffe), Blackwell Scientific Pub., London, 1982, s.511-533.

14. De Luca PP, "Sterile products", Sprowls' American Pharmacy, (Ed: LW Dittert), Lippincott Co., Toronto, 1974, s.451-491.
15. Prescott LM, Harley JP, Klein DA, "Prokaryotic cell structure and function", Microbiology, Ed: LM Prescott, JP Harley, DA Klein, McGraw Hill, Boston s.39 (1999).
16. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, "Gaseous sterilization", Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, (Ed: AD Russell, WB Hugo, GAJ Ayliffe), Blackwell Scientific Pub., London, 1982, s.548-568.
17. Marino FJ, Benjamin F, "Industrial sterilisation: A Review of current principles and practices", Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, 8th Ed: KE Avis, L Lachman, Lieberman HA), Marcel Dekker Inc., New York, 1986, s.1-54.
18. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, "Gaseous sterilization", Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, (Ed:AD Russell, WB Hugo, GAJ Ayliffe), Blackwell Scientific Pub., London, 1982, s.569-609.
19. Soper CJ, "Design and operation of clean rooms", Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, (Ed: ME Aulton), Churchill Livingstone, New York, 1988, s.686-699.
20. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, "Filtration sterilization", Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, (Ed:AD Russell, WB Hugo, GAJ Ayliffe), Blackwell Scientific Pub., London, 1982, s.610-630.
21. Akers MJ, Anderson NR, "Sterilization validation of sterile products: Fundamentals", Pharmaceutical Process Validation, (Ed: IR Berry, RA Nash), Marcel Dekker Inc, New York, 1998, s. 25-87.
22. USP 17, NF 20, United States Pharmacopeial Convention, Inc. MD, USA, 2002, s: 2250-2255.