

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE'DE ÜRETİLEN VETERİNER ENJEKTABL  
VİTAMİN PREPARATLARININ MİKROBİYOLOJİK  
KALİTE KONTROLLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

**Şükran ÖZTÜRK**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ**

**2007-ANKARA**

## ÖNSÖZ

Veteriner enjektabl preparatların üretiminde gerekli özenin gösterilmemesi, hayvanlar için büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye' de üretilen veteriner enjektabl preparatların, mikrobiyolojik açıdan incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, vitamin preparatlarda oluşan kontaminasyonlar, bir sterilite test yöntemi olan membran filtrasyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu projenin gerçekleşmesinde bilimsel katkıları ve desteklerinden dolayı A.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ' a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Öğrenimim boyunca destek ve katkılarından dolayı A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ahmet AKIN' a, öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Nurten ALTANLAR' a, sayın Dilek KINIK BİNGÖL' e, Araştırma Görevlisi ve dostum sayın Banu KAŞKATEPE' ye ve tüm bölüm personeline teşekkür ederim.

Sartorius ekibine, sayın Kıvanç Gürsu ve hiçbir desteğini benden esirgemeyen sayın Ömer ERDEM' e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmakta olduğum Arma İlaç' ta mesai arkadaşım sayın Serkan ALAN' a, sayın Ecz. Serdar ÜNEL' e ve diğer çalışanlara teşekkür ederim.

Konuşmalarıyla beni yüreklendiren, en büyük desteklerimden biri olan kardeşim Emre ÇOBAN' a, aileme, sayın Dr. Serkan DURDU' ya ve hiçbir zaman bana olan inancını yitirmeyerek her türlü desteği sağlamış olan sevgili eşim Barış ÖZTÜRK' e, teşekkür ederim.

Bio. Şükran ÖZTÜRK

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa no</b>
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Tablolar ve Şekiller	viii
<b>1. GİRİŞ</b>	
GENEL BİLGİ	1
1.1. VETERİNER İLAÇLARININ ÜRETİMİ	4
1.1.1. FARMASÖTİK ÜRÜNLER İÇİN KALİTE GÜVENCE VE KALİTE YÖNETİMİ	5
1.1.2. FARMASÖTİK ÜRÜNLER İÇİN İYİ İMALAT UYGULAMALARI (GMP) VE KALİTE KONTROL	6
1.1.3. PARENTERAL PREPARATLARIN MİKROBİYOLOJİK STANDARTLARI	7
1.1.4. ENDOTOKSİN VE PİROJENİTE TESTİ	14
1.1.5. STERİLİTE TESTİ	15
I.Direkt İnokülasyon Metodu	18
II.Membran Filtrasyon Metodu	19
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	
2.1. GEREÇ	20
2.1.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER	20
2.1.2. KULLANILAN BESİYERLERİ	21
Fluid Thioglycollate Medium (FTM)	21
Tryptic Soy (CASO) Broth, (TSB)	22
Tryptic Soy Agar (TSA)	22

Mueller Hinton Agar (MHA)	23
Mueller Hinton Broth (MHB)	23
Mannitol Salt Agar (MSA)	24
Kanlı Agar	24
Nutrient Agar	25
<i>Nişasta ilaveli Nutrient Agar</i>	25
Nutrient Broth	26
<i>Jelatinli Nutrient Broth</i>	26
Clark-Lubs Besiyeri (MR/VP)	26
Triple Sugar Iron Agar (TSI agar)	26
Trypton Besiyeri	27
Simmon Sitrat Agar	27
2.1.3. KULLANILAN AYIRAÇLAR VE BOYALAR	28
Kovaks Ayıracı	28
Metil Red Ayıracı	28
Voges-Proskauer Ayıraçları	28
Hidrojen Peroksit (% 3' lük) Eriyiği	29
2.1.4. NUMUNELERİN HAZIRLANMASI	29
2.1.5. ALETLERİN HAZIRLANIŞI VE STERİLİZASYONU	29
2.2. YÖNTEM	30
2.2.1. STERİLİTE TESTİ	30
2.2.1.1. Membran Filtrasyon Metodu	31
2.2.1.2. Değerlendirme	32
2.2.2. BİYOKİMYASAL TESTLER	33
1. İndol Deneyi	33
2. MR Deneyi	33
3. Voges-Proskauer	34
4. Sitrat Deneyi	35
5. TSI	35
6. Nişasta Hidrolizi	36
7. Mannitol Salt Agar Deneyi	37
8. Jelatin Hidrolizasyon Deneyi	37
9. % 6,5 NaCl' de Üreme Deneyi	38
10. Katalaz Deneyi	38
11. Oksidaz Deneyi	39

12.	Koagülaz Deneyi	39
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	40
3.1.	MİKROBİYOLOJİK KALİTE KONTROLLERİ	40
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	45
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	60
	<b>ÖZET</b>	62
	<b>SUMMARY</b>	63
	<b>KAYNAKLAR</b>	64
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	74

**SİMGE VE KISALTMALAR**

BP	: British Pharmacopoeia
CBER	: Center for Biologics Evaluation and Research
CDER	: Center for Drug Evaluation and Research
CFR	: Code of Federal Regulation
CVM	: Center for Veterinary Medicine
EP	: European Pharmacopoeia
FDA	: Food and Drug Administration
GI	: Gastrointestinal
GMP	: Good Manufacture Produce
GLP	: Good Laboratory Produce
IgG	: İmmun Globilin G
IgM	: İmmun Globilin M
i.m	: İntramusculer
i.v	: İntravenöz
TPN	: Total Parenteral Nutrisyon
USP	: United States Pharmakopiae

## Tablolar

<b>Tablo 1</b> : Başlıca kontaminasyon kaynakları	9
<b>Tablo 2</b> : Steril ürünlerin imalatı için hava sınıflandırma sistemi	12
<b>Tablo 3</b> : Mikrobiyolojik analizler sonucu elde edilen veriler	43
<b>Tablo 4</b> : İzole edilen mikroorganizmaların tiplendirme için yararlanılan biyokimyasal reaksiyonların sonuçları	43
<b>Tablo 4-a:</b> Gram (+) koklar için uygulanan ayırıcı testler	43
<b>Tablo 4-b:</b> Gram (+) koklar için uygulanan ayırıcı testler	43
<b>Tablo 5</b> : Pall Lipipor membran sistemi tarafından uzaklaştırılan Mikroorganizmalar	47
<b>Tablo 6:</b> Üretimden, üretim operatörlerinden, üretim alanlarından ve mikrobiyoloji laboratuvarlarından izole edilen bazı bakteriler	48
<b>Tablo 7:</b> Üretimde kullanılan sudan izole edilen bazı bakteriler.	49

## Şekiller

<b>Şekli 1:</b> Kapalı Filtrasyon Sistemi	31
<b>Şekil 2:</b> Pozitif ve negatif Voges- proskauer	34
<b>Şekil 3:</b> Pozitif ve negatif nişasta hidrolizi	36
<b>Şekil 4:</b> <i>S.aureus</i> ' un, Mannitol salt agardaki görünümü	37
<b>Şekil 5:</b> % 6,5 NaCl Besiyeri	38
<b>Şekil 6:</b> Sterilite testinde üremenin pozitif ve negatif olduğu örnekler.	40
<b>Şekil 7:</b> Bakterilerin mikroskopik görüntüsü	41

## 1.GİRİŞ

Veteriner ilaçları; hayvanları hastalıklardan korumak, tedavi etmek ve biyolojik fonksiyonları istenen yönde değiştirmek, bir hastalığı teşhis etmek amacıyla hayvana uygulanan etkin kimyasal ve biyolojik kökenli maddelerdir (Veteriner İspençiyarı ve Tıbbi Müstahzarlar Ruhsat Yönetmeliği, 2002).

Bir grup ilaç, hastalıkları tedavi etmek amacı ile kullanılırken, verimliliği artırmak amacı ile koruyucu ve geliştirici önlemler kapsamında da ilaç uygulamaları bulunmaktadır. Veteriner vitamin ilaçlarının, yukarıda tanımlanan her iki endikasyonda da kullanımı mevcuttur.

Günümüzde yüksek verimliliğe ulaşmak amacıyla; kalıtsal yönden daha üstün tür ve ırkların yetiştirilmesi gerekmektedir. Daha iyi bakım ve hijyen koşullarının sağlanması, parazitlere ve salgın hastalıklara karşı koruyucu ve sağaltıcı hekimlik hizmetlerinin yaygınlaştırılması ve evcil hayvanlarda bireysel verimliliğin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Büyümeyi hızlandırıcı, eşemsel etkinlikleri düzenleyici ve arttırıcı, süt ve yumurta verimini çoğaltıcı her çeşit yaşamsal etkinlikleri en uygun koşullarda düzenleyici çeşitli kimyasal maddelerin geliştirilmesi, üretilmesi ve hayvancılık sektöründe yaygın bir biçimde kullanılması seçeneklerine başvurulmaktadır (Ertürk, 2006).

Canlı organizmanın sağlıklı bir yaşamı devam ettirebilmesi için karbonhidrat, lipit, protein ve inorganik maddelerden başka, çok az miktarda diğer bazı organik besin maddelerine de ihtiyacı vardır. Bu maddeler vitaminler olarak bilinmektedir. Vitaminler, vücutta metabolik olayların normal bir şekilde meydana gelebilmesi, sağlıklı durumun sürdürülebilmesi ve yapısal ünitelerin metabolizma regülasyonları için gerekli olan, vücutta sentez edilemeyen veya yetersiz derecede sentez edilen, besinler içinde çevreden ufak miktarlarda alınması zorunlu maddelerdir (Akkan ve Eşkazan,1999; Lehninger, 1988).

Hayvan türlerinde günlük vitamin ihtiyacını arttıran faktörlerin süreklilik kazanmasıyla, günlük rasyonla alınan normal düzeylerdeki vitamin çeşitleri,

hayvanın ihtiyacını karşılayamaz hale gelebilir. Böyle durumlarda, uzun süre normal rasyonla beslenen hayvanlarda çok yönlü vitamin eksikliği sendromları baş göstermektedir.

Vitamin eksikliğinin en büyük nedenlerinden biri, günlük rasyonun hayvan türünün ihtiyacına yetecek kadar vitamin veya vitaminleri içermemesidir. Sindirim kanalında şekillenen bozukluklara bağlı olarak bazı vitaminlerden yeterince yararlanılmaması ya da besinlerin sindirim ve emilmesinin bozulması diğer önemli bir etkeni oluşturur. Hayvan türleri ve ırkları arasındaki genetik faktörler, hastalık ve stres halleri de vitamin ihtiyaçları üzerinde etkili olabilir. Bir tür içerisinde yaş farklılıkları ve fizyolojik durum, vitaminlere karşı olan nicel gereksinimi önemli derecede değiştirebilir. İstek dışı yollarla kirletici olarak hayvan yemlerine karışan ya da ortamda bulunması sonucu besinlere yansıyan bazı maddeler de hayvanların vitamin ihtiyaçlarını arttırmalar (Ertürk, 2006). Bu nedenle vücutta vitamin eksikliğine bağlı olarak birçok hastalık oluşabilir.

Vitaminlerin vücutta birçok fizyolojik süreçte görev aldıkları bilinmektedir. Bu bağlamda, vücutta süt üretim sürecinde önemli roller aldıklarından, rasyonlarda bulunması zorunlu maddelerdir. Süt yağının sentezi için biyotine (H Vitamini) duyulan gereksinimin yanı sıra, biyotin eksikliğinde hayvanlarda büyüme ve gelişimin durduğu da tespit edilmiştir (Kalkan, 2006). A vitamini vücutta depo edilebildiğinden sütteki düzeyini devam ettirebilir, fakat gebelik döneminde ve laktasyonun ilk aylarında hayvan A vitamini yönünden takviye edilmelidir. A vitamini eksikliğinde, sığırlarda kseroftalmi hastalığının ve damızlıklarda fertilitede azalma, yavru atma, ölü yavru doğumları gibi olayların olduğu bilinmektedir (Yazgünoğlu, 2002). D vitamini eksikliğinde ise, Rikets (raşizm)' in yanı sıra bazı hayvanlarda yumurta veriminin düştüğü gözlenmiştir. Karaciğer dışında hayvan vücudunda depo edilemeyen ve önemli bir vitamin çeşidi olarak kabul edilen K vitamini eksikliğinde ise, kanın pıhtılaşma süresinin uzadığı ve buna bağlı olarak da deri altında intramusküler hemorajilerin şekillendiği gözlenmiştir (Kalkan, 2006). Beriberi hastalığının sebepleri arasında B<sub>1</sub> vitamini eksikliği gösterilebilir. B<sub>2</sub> vitaminin eksikliğinde, yumurtacı ırklarda yumurta verimi düşerek civciv çıkma oranında azalma gözlenirken, B<sub>6</sub>

eksikliğinde, metabolizma bozuklukları ve anemilerin oluştuğu bildirilmiştir. B<sub>12</sub> ise hayvanlar için yaşamsal önemi olan bir vitamin olarak bilinmektedir. Eksikliğinde, büyümenin durduğu, ölüm oranının arttığı gözlenmiştir (Erata ve Güçlü 2003).

Mastitis, süt inekçiliğinde ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır. Ülkemiz süt sığırcılığı da tüm dünyada olduğu gibi mastitisten olumsuz olarak etkilenmektedir. Batra ve ark. (1991) mastitisli ineklerde E vitamininin plazma ve süt düzeyine etkisini önemli bulmuşlar, ayrıca sağlıklı ve mastitisli gruplarda E vitamini düzeyi farkının önemli olduğunu tespit etmişlerdir. E vitamininin, antioksidan sisteme olumlu etkide bulunmasına bağlı olarak, sığır yetiştiriciliğinde gerek rasyona ilave ve gerekse parenteral yolla E vitamininin verilmesi ile lipit peroksidasyon ve serbest radikallerin zararlı etkilerinin önlenmesinde olumlu bir rol oynayacağını görmüşlerdir. Bu durum, aynı zamanda mastitis enfeksiyonlarının önlenmesinde önemli bir etki meydana getireceği anlamı taşımaktadır. Bundan dolayı süt sığırcılığında mastitisin önlenmesinde E vitamini kullanılmasının faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır (Şimşek ve Aksakal, 2005).

Cummins ve Brunner (1990) yeni doğan buzağularla yaptıkları bir çalışmada kolostrum almanın ve günde 1,75 g askorbik asit verilmesinin IgG ve IgM düzeyleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Vitamin C' nin 56 gün uygulanmasıyla her iki parametre üzerinde de etkili olduğunu ve kolostrum almamanın sebep olduğu yetersiz bağışıklığı ortadan kaldırdığını gözlemişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise; E ve C vitaminlerinin yetersizliğinde, büyümede gerileme ve bağışıklık sisteminde değişimler olduğu gözlenirken, özellikle stres şartları altında C vitaminine olan ihtiyacın önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Koksidiyoz hastalığına yakalanan hayvanlarda C vitamininin bu enfeksiyona karşı direnci artırdığı ve mortaliteyi önemli derecede düşürdüğü görülmüştür (İmik ve ark., 2000).

Kaliteli ve etkin yem karışımlarıyla uygun kombinasyonlar halinde bir araya getirilerek kullanılan vitaminlerin, yüksek verimliliğin sağlanmasında önemli bir paya sahip olduğu bilinmektedir. Günlük hayvan ihtiyacını karşılayan birkaç miligram hatta mikrogram miktarındaki vitaminlerin varlığı günlük besinlerin optimum düzeyde değerlendirilmesine ve düzenlenmesine

olanak sağlamaktadır. Yeterli ölçülerde vitamin desteğinin sağlanması halinde, büyüme düzensizliklerinin, gelişme hatalarının, eşemsel yetersizliklerin, verim azlığının ve hastalık olasılıklarının en az düzeye ulaştığı görülmüştür. Diğer bir anlatımla, vitaminlerin modern yetiştiriciliğin başlıca garanti seçeneğini oluşturdukları söylenebilir (Ertürk, 2006).

Veteriner vitamin preparatları, gerek verimliliği artırma anlamında, gerekse patolojik durumların tedavisinde önemli görevler üstlenmektedir. Öte yandan bu ilaçların uluslararası standartlara uygun hazırlanmaları da kuşkusuz önem taşımaktadır. Üretim standartlarındaki hatalardan kaynaklanan ve belirtilen standartlara uygun yapılmayan üretimler sonrasında ortaya çıkabilecek sorunlar, yarardan çok zarar oluşturma potansiyeli taşımaktadır. Bu nedenle, hammadde eldesinde, işleme sürecinde ve üretim sonrasındaki kalite kontrollerinin validasyonu üzerinde önemle durulması gerekmektedir.

Veteriner vitamin preparatlarının, hayvan sağlığı için önemli bir yer teşkil ettiği göz önüne alındığında, üretim aşamalarının ve mikrobiyolojik açıdan incelenmelerinin beşeri preparatlarla aynı koşullarda yürütülmesi ve düzenli bir şekilde yapılması gerektiği açıktır. Bu amaca yönelik yapılan çalışmamız veteriner ilaç sektörü ve hayvancılık sektörü için önem taşımaktadır.

### **1.1. Veteriner İlaçlarının Üretimi**

Günümüzde veteriner ilaçları ilaç fabrikalarında üretilmektedir. Ancak bu üretim için bazı koşulların gerçekleşmesi gerekmektedir. Veteriner İspençiyari ve Tıbbi Müstahzarlar Yönetmeliğinde (2002); hiçbir veteriner müstahzarın, Tarım Bakanlığınca izin verilmeden hayvanlara uygulanamayacağı, her veteriner müstahzarın Tarım Bakanlığından ruhsat almış yerlerde üretilebileceği bildirilmektedir.

1 Kasım 1984 tarihinde yayınlanan İspençiyari ve Tıbbi Müstahzar İmalathaneleri Yönetmeliği hükümlerine göre; farmasötik müstahzar üreticilerinin, ürettikleri ürünün istenen etki, emniyet ve kalitede olmasını

garanti etmeleri gerekmektedir. Üretimde uyulması gereken kurallar, o günün şartları ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tavsiyeleri bu yönetmelikte kısa, öz ancak kesin bir ifade ile yer almaktadır. Türkiye, geçen zaman içinde teknolojik gelişmeler ve yenilikler ile farmasötik müstahzarlarda görülen çeşitliliği de dikkate alarak GMP (Good Manufacturing Practise) olarak tanımlanan bu kuralları yasal bir yükümlülük olarak uygulamaya koyan ilk ülkeler arasındadır (Sağlık Bakanlığı, 1994).

Standartlara uygun kaliteli bir ürün elde etmek için, GMP, Kalite Kontrol, Kalite Yönetimi ve Kalite Güvence unsurlarının bir bütün olarak değerlendirmeye alınması ve uyum içinde uygulamaya geçirilmesi gerekmektedir.

### **1.1.1. Farmasötik Ürünler İçin Kalite Güvencesi ve Kalite Yönetimi**

Bir ürünün, tek tek veya toplu olarak kalitesini etkileyen tüm unsurları kapsayan, geniş çerçeveli bir kavram olan "Kalite Güvencesi", farmasötik ürünlerin amaçlanan kullanımları için gereken kalitede olduklarını güvence altına almak hedefi ile yapılan organize düzenlemelerin bütünü olarak tanımlanmıştır. Kalite Yönetimi ise; tüm bunların yanı sıra, farmasötik ürünlerin, kalite ve etkinlikteki bir yetersizlikten kaynaklanabilecek problemler sonucunda hastayı riske sokacak durumların ortadan kaldırılarak üretilmesi gerektiğini ifade etmektedir (FDA, 2004; CBER, 2004). Kalite Yönetiminde belirtilen hususların eksiksiz bir şekilde uygulamaya geçmesi çok önemlidir.

Bu kalite hedefine erişmek için, GMP ve GLP (Good Laboratory Practice)' yi özümsemiş ve kalite kontrolünü de kapsayan, geniş çerçevede tasarılanmış ve doğru olarak uygulanan bir Kalite Güvence sisteminin oluşturulmasının gerekli olduğu bilinmektedir (Sağlık Bakanlığı, 1994; GLP, 1999).

### 1.1.2. Farmasötik Ürünler İçin İyi İmalat Uygulamaları (GMP) ve Kalite Kontrol

Kalite güvencesinin bir parçası olarak bilinen iyi imalat uygulamaları (GMP); farmasötik ürünlerin amaçlanan kullanım şekline ve kalite standartlarına göre, ürün spesifikasyonunun gerekli gördüğü şekilde üretilmesini ve kontrol edilmesini güvence altına almaktadır (ENTR, 2001; FDA, 2004; CBER, 2004).

Kalite Kontrol ise; GMP' nin bir parçası olup, gerekli ve ilgili testlerin yapılması, son ürün kontrolleri, üretim koşulları, üretim sürecindeki kontroller, üretim dökümanlarının değerlendirilmesi ve ambalaj da dahil ürünün spesifikasyonlarına uygunluğu gibi önemli bilgileri kapsamaktadır. İlaç fabrikalarındaki Kalite Kontrol Bölümü, ürünlerin satış veya dağıtımdan önce kalitelerinin yeterli olduğuna karar verilmesini sağlayan ve ürünü serbest bırakma prosedürlerini de dikkate alarak çalışmalarını sürdüren bir birimdir (Sağlık Bakanlığı, 1994; İçin, 2006).

GMP' nin ve modern kalite sisteminin birlikte savunduğu kurallar, kalite güvencesinin ve kalite standartlarının, ürünün imalat aşamasından itibaren dikkat edilmesi gereken unsurlar olduğu yönündedir (FDA, 2004; CBER, 2004)

Farmasötik ürünlerin üretilmesinde dikkate alınması gereken GMP ve Kalite Kontrol kurallarında;

- Farmasötik ürünlerin, GMP ve GLP dikkate alınarak tasarlanması ve geliştirilmesi,
- Üretim ve kontrol işlemlerinin açıkça spesifiye edilmesi ve GMP' ye adapte edilmesi,
- Farmasötik ürünlerin, her bir üretim serisinin, ruhsatına esas bilgilere, üretim, kontrol ve farmasötik ürünün serbest bırakılışına ilişkin yasa ve kurallara uygun olarak üretildiğinin ve kontrol edildiğinin gösterilmesi,
- Farmasötik ürünlerin, Kalite Güvence onay vermedikçe, yani seriyi serbest bırakmadıkça, satılamayacağını ve temin edilemeyeceğinin bilinmesi,

- Tüm üretim proseslerinin açıkça belirlenmesi, deneyimlerin ışığı altında sistematik olarak yeniden gözden geçirilerek, bu prosesler ile farmasötik ürünlerin istenen kalitede ve spesifikasyonlarına uygun olarak üretilebildiklerinin gösterilmesi gereklilikleri bulunmaktadır (Sağlık Bakanlığı,1994; ENTR, 2001).
- GMP için ayrıca;
  - Uygun, kalifiye ve eğitimli personelin;
  - Uygun tesisler ve alanın;
  - Uygun ekipman ve hizmetlerin;
  - Doğru materyal, kaplar ve etiketlerin;
  - Onaylanmış prosedürler ve talimatların;
  - Uygun depolama ve taşımanın sağlanması gerekmektedir (Sağlık Bakanlığı,1994).

Veteriner ilaçların çeşitli uygulama yolu farklılıkları vardır. Bu uygulama yolları arasında birtakım farmakodinamik farklılıklar olduğu gibi ilaçların preparasyonunda da farklılıklar bulunmaktadır. Kaba bir tanımlama ile, oral preparatlarda steril koşulların gerekliliği bulunmazken, parantral ilaçlarda sterilite koşulu olmazsa olmaz kurallardandır.

### **1.1.3. Parenteral Preparatların Mikrobiyolojik Standartları**

Steril preparatların imalatında mikrobiyolojik, partiküler ve pirojenik bulaşma risklerini en aza indirebilmeyi amaçlayan özel gereklilikler mevcuttur. Bu gerekliliklerin çoğu, konuyla ilgili personelin yeteneklerine, eğitimine ve davranışlarına bağlıdır. Çapraz kontaminasyon ve karışıklıkları önlemek için gerekli teknik ve organizasyon tedbirlerinin alınması gerekmektedir (İçin,2006). Steril imalat işlemleri “kalite güvencesi” dikkate alınarak, önceden oluşturulmuş prosedür ve talimatlarla GMP prensiplerine göre gerçekleştirilmelidir. Bu imalat şeklinin dikkatle hazırlanmış ve valide edilmiş üretim metotlarına ve prosedürlere göre yürütülmek zorunda olduğu

bildirilmiştir (CVM, 1993; CDER, 1993; WHO, 2006). Üretim aşamasında önemli olan unsurlardan biri; üretimin yapıldığı ortamdan kaynaklanabilecek kirlenmelerdir. Personelin çalıştığı temiz odalarda üretilen ürünler, üretimin yapıldığı ortamdan dolayı mikrobiyal kirlenmeye maruz kalabilmektedir. Kirlenmenin, üretimden, materyallerden, ekipmandan, operatörlerden ya da üretim ortamından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Bununla beraber, sterilite testine alınmış bir üründe ortaya çıkacak kirliliğin üründen gelen veya sterilite testi sırasında, ortamdan, ekipmandan ve testi yapan kişiden kaynaklanan bir kirlilik olup olmadığına anlaşılabilmesi zordur. Ancak sterilite test koşullarının güvenilir olduğu durumlarda üründe tespit edilmiş olan kirlenmenin, üretim alanından kaynaklandığı varsayılabilir.

Aseptik uygulama ortamındaki kirlenmenin kaynağını saptamak için ise, hiçbir direkt metot bulunmamaktadır (Agalloco, 2005). Üretimden kaynaklanabilecek başlıca kontaminasyon kaynakları tablo 1' de gösterilmiştir.

Her üretim işlemine başlamadan önce işlemde kullanılacak bütün alet ve teçhizatın temizlenmiş ve sterilize edilmiş olması gerekmektedir (İspençiyari ve Tıbbi Müstahzarlar İmalathanaları Yönetmeliği, 1984).

FDA (Food and Drug Administration), insan ve hayvan ilaçları için yapılacak olan ilaç başvurularındaki sterilizasyon süreçlerinin aynı olması gerektiğini ve sterillik garantisini doğrulamak için olan bilgi ve verilerin hayvansal ilaç başvurularında da gerekli olduğunu bildirmiştir (AVMA, 2006; Marnane, 2007).

Spesifik ilaç ürünleri için uygulanan sterilizasyon yöntemlerinin etkinliği belirli protokoller temelinde ve bilimsel deneylere dayanarak geliştirilmiştir (Burgess ve ark., 2002).

**Tablo 1:** Başlıca Kontaminasyon Kaynakları

Hammadde	Maddeye sentez aşamasında yan maddeler karışabilir veya kristalizasyon aşamasında kirlilik bulaştığı için saf olmayabilir.
Atmosfer	Havanın kendi florası yoktur, ancak havadaki partiküller mikroorganizma taşır. Yakıt yanmasından doğan artıklar, egzoz artıkları, taşıt lastik sürtünmesinden doğan artıklar, toprak parçacıkları bulunur. Ayrıca öksürme, hapşırma yolu ile yayılan damlacıklardaki su buharlaşır ve damlacık çekirdeği denen protein parçacıkları halinde havada asılı kalırlar ve kişinin sağlık durumuna göre değişik bakteriler taşır. Havada serbest mikroorganizmalara rastlanmaz, ancak maya ve küf sporları bol miktarda bulunur.
Nefes	Normal nefes alma sırasında atmosfere az miktarda mikroorganizma geçer, ancak öksürme, hapşırma, tükürme ile mikroorganizma taşıyan damlacıklar yayılır.
Eller	Normal deride en az 10000/ cm <sup>2</sup> mikroorganizma olduğu tahmin edilmektedir. Deride yaşayabilen ve çoğalabilen ve patojen olmayan normal floranın yanı sıra çevreden veya vücudun başka yerlerinden bulaşan geçici bir flora bulunur.
Giyim	Partikül ve mikroorganizmalar giysinin iplikleri arasına girer ve vücut hareketi ile açığa çıkarak ortamın kontaminasyonunu artırabilir.
Saç	Saç aralarına giren partikül ve mikroorganizmalar bu alana iner.
Aletler	Aletler kirlili olabilir. Ayrıca daha önce hazırlanan ilacın artıkları iyi temizlenmeden alet bir başka ilaç için kullanılırsa, bir ilacın diğerine bulaşması tehlikesi doğar.
Çalışma Süresi	Süre önemlidir, örneğin cerrahi çalışma öncesi alınan duştan 1 saat sonra saptanan mikroorganizma sayısı, başlangıçtaki 5 katıdır.
Çözücü	Temiz olmayan su ve diğer çözücülerin kullanılması ilacı kontamine eder.
Ambalaj	Ambalajlar kullanılmadan önce temizlenmelidir. Ayrıca bazı plastik ambalajlardaki boya, yumuşatıcı gibi yardımcı maddeler zamanla içindeki çözeltiye geçebilir.

Bir maddenin üzerinde veya içinde bulunan tüm mikroorganizmalardan arındırılma işlemine sterilizasyon denir. Sonrasında hastalık yapan ve yapmayan tüm mikroorganizmalar öldürülmekte, inaktive edilmekte veya ortamdaki uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemi, hafif, orta, ileri derecede sterilizasyon gibi ayırma imkanı yoktur. Sonuçta amaç, sporlu ve sporsuz bakteriler, viruslar ve mantarlar gibi tüm mikroorganizmaları ortadan kaldırmaktır (Töreci, 1990). Herhangi bir sterilizasyon prosesi uygulanmadan önce, ürün için uygunluğu ve tüm noktalarda istenen sterilizasyon şartlarına ulaşabilme etkinliği tespit edilmelidir. Sterilizasyon öncesi safhalar da dahil olmak üzere, tüm işlem basamaklarında bulaşmayı en aza indirecek önlemler alınmalıdır (Yenipazar, 2007).

Parenteral preparatların imalat işlemleri iki kategoriye ayrılır. Birincisi son kabında sterilize edilen preparatlar, ikincisi tüm üretim safhalarının aseptik olarak yürütülmek zorunda olduğu ürünlerdir. Steril olması gereken, ancak nihai ambalaj içinde sterilizasyonları mümkün olmayan ilaçların imali gibi özel maksatlar için amaca uygun olarak düzenlenmiş ayrı kapalı alanlar bulundurulmalıdır. Ambalajı içinde sterilize edilebilen ilaçların imali için steril hava iklim sistemi hariç diğer hususlar aynen aranır (Yenipazar, 2007).

Son kabında sterilize edilemeyen parenteral solüsyonların hazırlanmasında, filtrasyon metodunun kullanılmasının ürün kalitesi için daha uygun olabileceğine karar verilmiştir. Özellikle büyük hacimli infüzyon sıvıları başta olmak üzere tüm çözeltiler, mümkünse dolumun hemen öncesinde bir mikroorganizma tutucu filtreden süzülmalıdır. Eğer ürün son kabında sterilize edilemiyorsa, çözeltiler ve sıvılar, önceden sterilize edilmiş bir kaba, nominal por büyüklüğü 0.22 mikron olan bir steril filtreden süzülebilir. Membran filtre seçimi yapılırken, ürünün vizkozitesini dikkate almanın yanı sıra por çapı, ürünle uygunluğu, sıvı miktarını alma kapasitesi, partikül miktarı ve filtre tutucularının seçimi de önemlidir (Mckinnon ve Avis, 1993; Bhatti ve ark., 2006).

Son kabında sterilize edilen ürünler; filtrasyon ve sterilizasyon için uygun solüsyonların hazırlanması ve düşük mikrobiyal ve partikül sayım değerlerine sahip çözelti elde etmek amacıyla, C kalitesindeki ortamlarda yapılmalıdır. Kapalı kapların kullanılması gibi bulaşmayı en aza indirmeyi

amaçlayan ek önlemlerin alınması halinde, D sınıfındaki ortamlarda da çözelti hazırlanmasına izin verilebilir (Akers ve ark., 1992; TGA, 2006).

Steril preparatların üretimi, aseptik şartlarda yapılmalıdır. Aseptik üretim; ilaç üretiminde en çok dikkat edilmesi gereken ve yapılması en zor işlem olarak bilinmektedir. Bu işlem, personel ve materyallerin hava kilitleri içinden geçerek girebildiği özel alanlarda yürütülmelidir. Temiz alanlar, uygun temizlik standartlarında muhafaza edilmeli ve uygun etkinlikle filtreden geçirilmiş hava ile beslenmelidir. Komponentlerin hazırlanmasına ilişkin çeşitli işlemler, ürünün hazırlanması, dolum ve sterilizasyonu, temiz alan içerisinde yer alan ve birbirinden ayrılmış alanlarda yürütülmelidir. Temiz alanlarda, gereken en az sayıda personel bulunmalıdır. Kıyafetler, proses ve çalışma alanlarına uygun olmalı ve ürünü bulaşmadan koruyacak şekilde kullanılmalıdır. Temiz alanlarda tüm yüzeyler, partikül veya mikroorganizmaların birikmesini ve çevreye saçılmasını en az düzeye indirecek özellikte olmalıdır (Galson, 2003; Lambert, 2003; USP 27, 2004a).

Su işleme üniteleri, uygun kalitede suyun güvenilir bir biçimde üretilebilmesini sağlayacak şekilde tasarlanmalı, inşa edilmeli ve bakımı yapılmalıdır. Su, mikroorganizmaların üremesine engel olacak şekilde üretilmeli, saklanmalı ve dağıtılmalıdır (Yenipazar, 2007; Cooney, 2007).

İşleme tabi tutulan ürün ve materyallerin partiküller ve mikrobiyal bulaşma riskini en düşük düzeyde tutmak amacıyla yönelik olarak, her imalat işlemi uygun bir hava temizlik düzeyini gerektirir (Demirel,1999).

Steril ürünlerin üretilmesi için kullanılan temiz ve steril üretim alanları, öngörülen hava özelliklerine göre A, B, C ve D kalitesinde olmak üzere 4 sınıfa ayrılmıştır (tablo 2).

**Tablo 2:** Steril Ürünlerin İmalatı İçin Hava Sınıflandırma Sistemi

Kalite Sınıfı	1 m <sup>3</sup> havada izin verilen max. partikül sayısı		1 m <sup>3</sup> havada izin verilen max. canlı organizma sayısı
	0.5 µ ≥	5 µ ≥	
A	3500	Yok	1* den az
B	3500	Yok	5*
C	350.000	2000	100
D	3.500.000	20.000	500

-(\*) işaretli düşük değerler, ancak fazla sayıda hava örneği alınması halinde güvenilir olur.

*Klas A:* Sterilitenin en yüksek derecede olmasını gerektiren bölgeler ile açık olarak dolum yapılan aseptik bölgelerdir. Bu alanlarda, laminar hava akımı sistemlerinde dikey akımda 0.30 m/sn ve yatay akımda 0.45 m/sn'lik homojen bir hava akış hızı sağlanmalıdır.

*Klas B:* Klas A bölgesini çevreleyen steril alanlar

*Klas C ve D:* Daha az kritik olan temiz alanlar, örneğin ekipman yıkama, solüsyon hazırlama alanlarıdır (Kenter, 2003).

B,C ve D kalitesindeki ortam şartlarına ulaşılabilmesi için, uygun HEPA filtreler ve iyi bir hava akış modeli olan bir odada hava değişim sayısı genel olarak 20 değişim/saat'ten fazla olmalıdır.

Ürünün üretildiği kritik alan klas- 100 (A ve B sınıfı) hava şartları gerektirmektedir. Bu da genellikle konvansiyonel olarak havalandırılan bir oda içinde tek yönlü bir akış sisteminin (unidirectional flow) sağlanması ile başarılır. İlaç hammaddesi, yardımcı madde ve materyellerle ambalaj malzemeleri gibi ilaç üretiminde kullanılacak tüm maddelerin bu alana, gerekli kontrollerinin yapıp üretimde kullanılmaya uygun olduğu belirlendikten sonra girmesi gerekir. Dışarıdan temiz odalara girebilecek kirliliğin azaltılması için hammadde ve kapların, ilgili giriş hava kilitlerinden girmeleri gerekmektedir. Kaplar “temiz doldurma” odasındaki tek yön akışlı

temiz alanlarda doldurulmalı ve ağızları kapatılarak gerekli kontroller amacıyla ilgili bölümlere sevk edilmelidir (Demirel, 1999).

İnformasyon bölümü, steril ürünlerin paketlenmesinden, ürünün kullanım anına kadar geçen zamanda mikrobiyolojik bütünlüğün korunmasıyla ilişkilidir. Ürün kapları, uygun şekilde valide edilmiş metotlar ile kapatılmalıdır. Uygun prosedürlere göre alınan numunelerde kapama işleminin doğruluğu (integrity) kontrol edilmelidir. Vakum altında kapatılan kaplardan örnek alınmalı ve bu örneklerin, önceden belirlenmiş uygun bir süre sonunda vakumu koruyup korumadıkları kontrol edilmelidir. Steril ürün bütünlüğünün tertibatı için ürüne ait iki çok önemli durumun korunmasına ihtiyaç vardır. Bunlar; etikette iddia edilen özelliklerin ürünün içindeki niteliklere uygun olması ve kullanımından önce ürüne uygulanacak sterilite testi sonucunda ürünün steril olduğunun garanti edilmesidir (USP 27, 2004b).

Mutlak bariyer teknolojisinin ve otomasyon sistemlerinin, üretim sahalarına insan müdahalesini en aza indirmek amacıyla kullanılması, üretilen ürünlerin sterilite güvencesi açısından belirgin avantajlar sağlayabilir (TGA, 2006).

Üretilen her yeni ilaç için mikrobiyolojik kontroller yapılmalıdır. Sterilite testi yapılan bir ilaçta mikrobiyolojik kontaminasyon görülmediği takdirde alternatif bir metoda başvurulmasına gerek yoktur. Metotların ve kalite kontrollerin farmakopeler baz alınarak yapılması uygun bulunmaktadır (McGuire ve Kupiec, 2007, USP 27, 2004; BP, 2004).

Steril veteriner ilaçların pirojen düzeyleri belirlenmiş limitleri aşmamalıdır. Çünkü; patojenler dahil birçok canlı organizma ve cansız maddeler uygun ortamı bulduğunda probleme neden olabilir. Bu ilaçların steril üretiminin ekonomik olarak kullanılan teknolojiye uygunluk göstermesi gerekmektedir. CVM (Center for Veterinary Medicines) parenteral veteriner ilaçların non- steril olarak etiketlenmemiş olması gerektiğini bildirmiştir. Kalite kontrolleri yapılan ürünün steril olduğu, endotoksin içermediği, tüm mikroorganizmalardan uzaklaştırılmış olduğu garanti edilmelidir (Kupiec, 2005). Bakterilerin büyümesini destekleyen ve mikrobiyal kontaminasyona

uğramış parenteral sıvıların kullanımı engellenmeli ve kesinlikle saklanmamalıdır (Berry ve ark. ,1993).

#### **1.1.4. Endotoksin ve Pirojenite Testi**

Pirojenler, mikroorganizmaların metabolizmasıyla ortaya çıkan ya polisakkaritler ya da proteinlerdir. 0,05- 1 µm büyüklüğünde, suda çözünen ve ısıya dayanıklı moleküllerdir. Pirojenlerin insana ve hayvana enjekte edildikleri zaman vücut sıcaklığında artışa neden oldukları bilinmektedir. Lipopolisakkaritler; gram (-) bakterilerin hücre duvarının (endotoksin) büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar ve bunlar genelde en çok rastlanan pirojenler olarak bilinirler. Ama ateş yükselmesine sebep olan başka maddeler de bu sınıftan sayılabilir. Bakteri hücreleri ölü veya parçalanmış oldukları zaman da pirojenik etkili olabilirler (Akgün ve ark., 2000; USP 27, 2004c).

Pirojenite, mikrobiyolojinin parçası sayılmayan ancak pirojenler, mikrobiyal büyümenin sonucu olarak ilaçların mikrobiyal kirliliğine neden olan maddeler olarak bilinmektedir. Pirojenik kontaminasyondan kaçınmak için çok saf kimyasallar ve steril malzemeler kullanmak gerekmektedir (Akgün ve ark., 2000; Guidevet, 2005).

Pirojenleri tespit etmek için 2 metot bulunmaktadır. Bunlar; Pirojenite kontrol testi ve LAL (Limulus Amebocyte Lysate) testi olarak bilinmektedir. Geleneksel yöntem; laboratuvardaki tavşanlara uygulanır ve her saat başı vücut sıcaklıkları kontrol edilir. Alternatif yöntem ise halen kullanılmakta olan ve LAL testi olarak bilinen yöntemdir. Uygulamasında; at nalı yengecinin kanından elde edilen LAL çözeltisi pirojen ve endotoksinlerle katı bir jel oluşturmaktadır. Bu jelleşme pirojenite varlığını ispat eder (Akgün ve ark., 2000; Aulton, 2002; USP 27,2004c).

### 1.1.5. Sterilite Testi

Parenteral ilaçlar için uygulanan ve ilaçlardaki partikül ve mikroorganizma içeriğini ölçmek için yapılan bir testtir (FDA, 1987; BP,2004, USP 27, 2004d). Parenteral preparatlar; aseptik koşullarda üretilmiş, kalite kontrolleri yapılmış, mikroorganizmalardan arındırılmış, sterilite testleri tamamlanmış ürünlerdir (WAC, 1992; NMAC, 2005). Mide-barsak kanalından absorbe olmayan veya orada parçalanan, bu nedenle damar ya da doku içine steril enjektör ve iğne ile verilen çözelti, süspansiyon, emülsiyon formlara parenteral preparat denmektedir. Parenteral preparatların, deri, mukoza veya seromembran tabakaları arasına veya altına enjeksiyon yolu ile uygulamasına parenteral yol denir (Çingi ve ark., 1996). Parenteral preparatların, steril, vücut pH' ına eşit (7,4) veya buna yakın, tercihen izotonik ve mutlaka apirojen olmaları gerekmektedir (Süzer, 2006). Steril ürünlerin steril olduğuna dair kalite kontrolü için prensip, tabii ki ürünün kendisine yapılacak sterilite testidir (Aulton, 2002). Sterilite testi aseptik koşullar altında, temiz odalarda, temiz hava şartlarında ve temiz bir ekipman ile yapılmalıdır (Kastango ve Douglass, 2001; Venti, 2006). Veteriner parenteral preparatların da beklenen bir kalitesinin olması gerekmekte ve kesinlikle steril olma koşulu aranmaktadır (CVM, 2000; APVMA, 2006; USP 27, 2004d).

Sterilite testi için alınan numunelerin bitmiş ürünün çeşitli serilerinden alınarak, bütün seriyi temsil etmesine dikkat etmek gerekmektedir. Son kaplarında ısı ile sterilize edilen ürünler için, yükün en soğuk olması beklenen bölümünden numune alınmasına dikkat edilmelidir. Aseptik olarak dolumu yapılan ürünlerde, dolunun başlangıcında, sonunda ve dolun işleminin belirgin olarak kesintiye uğramasından sonra numune alınmalıdır. Ayrıca bazı özel durumlarda serinin kontaminasyon riskinin en fazla olduğu düşünülen bölümünden alınması da uygun bulunmaktadır (PDA, 2000; USP 27, 2004d). Ancak test edilecek materyallerin test esnasında, testi yapan kişi veya çevresel faktörlerden etkilenmemesinin garanti olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle sterilite testlerinin, yeterli laboratuvar teşkilatı olan yerlerde ve

yeterli deneyimi olan kişilerce yapılmasının uygun olduğu bildirilmiştir (Fry, 1996; Motise, 1999).

Sterilite testi sonucunda; mikroorganizma bulunması önemli bir durumdur ve sonraki kısım hem üretim bölümlerini hem de laboratuvar bölümünü ilgilendirmektedir. Eğer steril bir üründe herhangi mikrobik bir büyüme gözlenirse, sterilite testini geçememiş kabul edilmektedir (Motise, 1999; Zolner, 2006).

Yanlış kaydedilmiş bir sterilite testi, çok kötü sonuçlar doğurabilir. Eğer gerçekte steril olan bir materyal çalışma şartları, çalışma ortamı ve çalışan personelden kaynaklı non-steril çıkmış ise yeniden sterilize edilmesi gerekmektedir veya çok büyük mali kayıp göze alınarak ürünün imhası söz konusu olabilir. Bunun aksine kirlenmiş bir seri sterilite testini geçerek piyasaya sunulmuş ise, kullanılan her ilaç için ciddi sağlık problemleri söz konusu olabilir. Bu nedenle sterilite test prosedürleri son yıllarda önemli derecede geliştirilmiş olup, başarısızlıklar ruhsatlandırma otoriteleri tarafından ortaya çıkarılmaktadır. Eğer bir ürün testte başarısız çıkarsa, imalat prosedürlerinin ciddi şekilde yetersiz olduğu veya ürünün gerçekte steril olduğu ancak test yönteminin hatalı olduğu söylenebilir (Aulton, 2002).

Üretimi tamamlanmış bir veteriner parenteral preparat için, sterilite testi yapılmış ilaç serileri arasından ancak test uygunluğu onaylanan bitmiş ürün serilerine ait ürünlerin piyasaya sürülmesi uygun bulunmaktadır (EMA, 2006).

Sterilite testinde kullanılacak besiyerlerinin seçiminde, olabildiğince çok mikroorganizmanın (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Clostridium sporogenes*) üremesini desteklemesi için seçiciliği mümkün olduğunca az olan besiyerlerinin seçilmesine ve üreme oluşması durumunda, oluşan bulanıklığın daha kolay gözlenebilmesi için berrak olmasına dikkat edilmektedir (CFR, 1998; Şen, 2002). Sterilite testi sonucunda besiyerlerinde oluşmuş bir bulanıklık mikrobiyal kontaminasyon belirtisi olarak kabul edilmektedir. Böyle bir durum ile karşılaşıldığında test tekrar edilmelidir (Hoffman ve ark., 1982). İnokülasyondan sonra bakteri varlığı söz konusu ise 7 gün içinde hatta daha az sürede bulanıklığın oluşumu gözlenebildiği için Fluid Thioglycollate Medium (FTM) ve Tryptic Soy Borth

(TSB) besiyerlerinin kullanımı sterilite testi için uygun görülmüştür (USP 27 2004d; CFR, 2006). FTM 30- 35 °C' de, TSB ise 20- 25°C 'de inkübe edildiği takdirde çok yavaş büyüyen mikroorganizmalar ile çok küçük sayıdaki mikroorganizmaların bile büyümesi için uygun bir ortam sağlamaktadır (Olson ve Groves, 1990; Christianson ve Levings, 1999; Bugno ve Pinto, 2002a; Smith, 2005).

USP 27 (2004d)' ye göre, 14 günlük bir inkübasyon periyodu içerisinde farmasötik ürünlerde oluşabilecek tüm mikrobiyolojik kontaminasyonların ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Bugno ve Pinto, 2002b-c). Sterilite testi ile ilgili kontroller özellikle önemlidir. Çünkü tamamlanmamış bir kontrolün yanlış neticeler verebildiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, yanlış nötralize edilmiş bir koruyucunun, serilerin sterilite testlerinin sonradan teşhis edilemeyecek şekilde çıkmasına ve dolayısıyla da kullanılan vücutta enfeksiyon oluşumuna neden olabildiği görülmüştür (Wilson ve ark, 1995; Aulton, 2002).

Sterilite testi için önerilen 2 metot bulunmaktadır. Bunlar; membran filtrasyon metodu ve direkt transfer metodu olarak bilinmektedir. Membran filtrasyon metodu parenteral ilaçlarda sterilite testi için daha tercih edilen bir metot olarak belirlenmiştir. Bu sistem, kapalı bir sistem olduğu için, kontaminasyon riski ve hata yaparak pozitif sonuç alma oranının daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Akers ve ark.,1991; Gardner ve ark., 2003; USP 27, 2004d).

Sterilite testinde; ilacın içindeki antimikrobik maddeleri de inaktive etmek gerekmektedir. Bunlar, antibiyotikler, göz damlaları içindeki koruyucular olabilir. Likit test ortamına o antimikrobik maddeleri nötralize etmek için uygun maddelerin ilave edilmesi gerekmektedir. Ama özellikle bazı grup ilaçlar için bu şekilde özel inaktivatörlerin kullanımı mümkün değildir. Bu problemin; membran filtrasyon tekniği ile çözümlenmesi mümkündür. Bu alternatif metot; filtrasyon yapılacak membranların por genişlikleri bakterileri tutacak kadar küçük olacak şekilde seçilerek (0,2 µ veya 0,45 µ) sulu veya yağlı solüsyonlarda uygulanmasıdır. Membran üzerinde tutulan bakterilerin izotonik tuz solüsyonu ile (peptonlu su) yıkanmasının uygun olduğu bildirilmiştir (BP, 2004). Bu solüsyonun,

antimikrobik maddeleri ve bunların en ufak izlerini bile bu ortamdan temizleyecek nitelikte olması gerekmektedir. Bu işlemler bittikten sonra bakterilerin tutunacağı membranların uygun kültür ortamları ile birleşmesini sağlamak gerekmektedir. 14 günlük inkübasyon periyodundan sonra değerlendirmeler yapılmaktadır. Bu metot, antimikrobik maddeleri nötralize etmekte daha yüksek şansa sahip olduğu için direkt inokülasyona göre daha tercih edilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Aulton, 2002; USP 27, 2004d).

Çalışmamızda kullanılan "Vacuum filter Holders Sterility Testing System" bu sistemin daha gelişmiş ve tam kapalı bir sistem olarak dizayn edilmiş olan membran filtrasyon sistemidir. Kontaminasyon riskini en az düzeye indirdiği ve sterilite testinde daha sağlıklı sonuçlar verdiği için en gelişmiş ve kullanımı en uygun sistem olarak belirlenmiştir.

### **I. Direkt İnokülasyon Yöntemi (Direkt Metot)**

Bu metot; öncelikle katı ürünler için kullanılmaktadır. Bu prosedürün tüm basamakları aseptik olarak "Class 100 Laminair Flow" sisteminin içinde yerine getirilmektedir. Örnekler aseptik olarak TSB ve FTM besiyerlerini içeren tüplere ya da şişelere doğrudan inoküle edilerek 14 gün inkübasyona tabi tutulmaktadır. 3., 7. ve 14. günde üreme olup olmadığı incelenmektedir. İnkübasyonun bitiminde besiyerinde üreme gözlenmemesi sterilite testinin olumlu olduğunu göstermektedir (Clongen Laboratories, LLC,2003; USP 27, 2004d). Bu yöntemde, sterilite testine alınan numuneden alınacak ürün miktarı sınırlı olmakla birlikte, doğal bakteriostatik ve fungostatik bileşenler uzaklaştırılmaz ya da yeterli bir şekilde nötralize edilemez.

## II. Membran Filtrasyon Yöntemi

Membran filtrasyon tekniği, test koşullarında antimikrobiyal bir etkiye sahip olmayan yağlı çözücülerle suda çözünebilir ya da karışabilir preparatlar ve alkollü ya da yağlı preparatlar için kullanılmaktadır (USP 27, 2004d).

Bu metot özellikle sıvı ilaçlarda kullanılmaktadır. Membran filtrasyon ile yapılan sterilite testinin tüm adımları aseptik koşullarda Laminair Flow kabininde ve klas 5 hava kalitesine sahip ortamlarda gerçekleştirilmektedir (Galson, 2003; USP 27, 2004d).

Testin uygulanacağı ilaç örneği 15 dakika boyunca çalkalandıktan sonra çalışmaya başlanmalıdır. Öncelikle ilaç filtreden geçirilerek sonrasında besiyerleri TSB ve FTM' ye transfer edilerek 14 gün inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon periyodu süresince üremenin gözlenmemesi gerekmektedir (MO BIO, 2006; AppTec, 2006). Eğer test numunesi mikroorganizmaların üremesini engelleyecek bazı maddeler içeriyorsa uygun durulama ajanı kullanılarak, durulanan membran filtre üzerinden bu maddeler uzaklaştırılabilir.

Eğer inokülasyon sonrasında açıkça görülebilir üreme meydana gelmez ise, ürün test koşullarına uygundur şeklinde yorumlanmaktadır (EP, 2000).

Eğer test edilecek ürünün varlığında açıkça görülebilir üreme meydana gelir ise, ürünün test koşullarında tatmin edici bir biçimde ortadan kaldırılmamış kirlenmeye sahip olduğu düşünölmektedir. Kirlenmeyi ortadan kaldırmak için koşulların değiştirilmesi ve testin tekrarlanması gerekmektedir (EP, 2000).

Vitamin içeren paranteral preparatlar da diğer tüm parenteral preparatlar gibi steril olma koşulu taşımaktadır. İnsan sağlığı için kullanılan preparatlarda olduğu gibi veteriner preparatlar için de mikrobiyolojik kontroller önemlidir. Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan yönetmeliklerde de belirtildiği gibi, beşeri tıbbi ürünlerin imalat standartları ile veteriner tıbbi ürünlerin imalat standartlarının aynı olması gerekmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2004).

## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. GEREÇ

Çalışmamızda Türkiye' de veteriner ilaç üretimi yapan 14 değişik firmadan, 20 farklı markanın değişik seri numaralarına ait ilaçlar alınmıştır. 2006- 2007 tarihleri arasında üretilmiş ve son kullanma tarihleri 2008- 2009 arasında olan 50 adet veteriner parenteral vitamin preparatı incelenmiştir.

Ankara'da bulunan çeşitli ilaç depolarından temin edilmiş olan veteriner preparatlar, mikrobiyolojik kontrolleri yapıncaya kadar orijinal ambalajlarında ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çalışmamızda firma isimlerinin gizliliğine dikkat edilmiş ve örneklerin ticari isimleri yerine numaralar kullanılmıştır.

#### 2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- “Vacuum filter Holders Sterility Testing System” \*Sterilite kontrolü için kullanılacak Kapalı Filtrasyon Sistemi ;
- Sartorius GmbH D 3400 Göttingen Fed. Rep. Germany. ( Type = MC 1000, Fnr = 785659, Volt= 220, Watt= 160)
- Sartorius Motor MC 1000 FEC: 1,25 A/ 160 watt  
220 V - / 50 Hz.  
MC 2000 FEC : 2,5 A / 400 watt  
220 V - / 50 Hz
- GAST- Peristaltik Pompa; Little Giant Model : 13154 Pressure/ Vacuum Pump Gelman Instrument Company
- Çeşitli firmalara ait veteriner enjektabl vitamin preparatlar, piyasada bulunan ilaç depolarından temin edilmiştir.
- Etüv
- Otoklav

- Buzdolabı
- Cam Pipetler (5,10 ml)
- Petri kutuları ( cam, 100- 120 mm)
- Deney tüpleri
- Erlen mayer (500, 1000 ml)
- Mezürler (250,500 ml)
- Lam, pens,spatül
- Öze
- Mikroskop

### 2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

#### ***Fluid Thioglycollate Medium (FTM) (Merck)***

Fluid Thioglycollate Medium; anaerobik bakteri kültürü için kullanılmaktadır (BP, 2004).

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

* L-sistin.....	0,5 g
*Agar.....	0,75 g
*Sodyum Klorür.....	2,5 g
*Glikoz Monohidrat.....	5,5 g
*Mayaözütü (suda çözünebilen).....	5,0 g
*Pankreatik Kazein Özü.....	15.0 g
*Sodyum Tiyoglukolat .....	0.5 g
*Resazurin Sodyum Solüsyonu (1/1000)...1.0 ml	

Toz halindeki hazır besiyeri karışımından 30 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı ve pH' sı 7,1' e  $\pm$  0.2 ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 37°C

sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı (Bilgehan,2002).

### ***Tryptic Soy (CASO) Broth, (TSB) (Merck)***

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

*Kazein Pepton.....	17,0 g
*Soy Pepton.....	3,0 g
*Dekstroz.....	2,5 g
*Sodyum Klorür.....	5,0 g
*Potasyum Fosfat, dibazik.....	2,5 g

Toz halindeki hazır besiyeri karışımından 30 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı ve pH' sı 7,3' e ayarlanarak otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 37°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı (Bilgehan,2002; Quelab, 2001).

### ***Tryptic Soy Agar (TSA)***

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği;

*Pankreatik Kazein Özeti.....	15,0 g
*Enzimatik Soya Özeti.....	5,0 g
*Sodyum Klorür... ..	5,0 g
*Agar .....	15,0 g

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 40 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı ve pH' sı 7,3 ± 0.2' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 45- 50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm çapındaki petrilere 25- 30 ml (yaklaşık 4 mm kalınlığında) döküldü. Petrilere TSA donduktan sonra

37°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı (Bilgehan,2002).

### ***Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck)***

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

- \* Et Özeti.....2,0 g
- \*Kazein Asit Hidrolizat .....17,5 g
- \*Nişasta..... 1,5 g
- \*Agar.....17 g

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 38 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı ve pH' sı 7,3' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 45- 50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm çapındaki petrilere 25-30 ml (yaklaşık 4 mm kalınlığında) döküldü. Petrillerdeki MHA donduktan sonra 37°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı (Bilgehan,2002; Quelab, 2000).

### ***Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck)***

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

- \* Et Özeti.....2,0 g
- \*Kazein Asit Hidrolizat..... .....17,5 g
- \* Nişasta .....1,5 g

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 21 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı ve pH' sı 7,3' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 37°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı (Bilgehan,2002).

**% 6,5 NaCl ilaveli Muller Hinton Broth** :Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 21 g tartılıp, % 6,5 oranında (65 g) NaCl ilave edildikten sonra 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı. Bundan sonraki işlem sırası MHB ile aynı şekilde yapıldı.

### ***Mannitol Salt Agar (MSA) (Oxoid)***

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

*Et Özeti.....	1,0 g
*Pepton .....	10,0 g
*NaCl .....	75,0 g
*D- mannitol .....	10,0 g
*Fenol kırmızısı .....	25,0 mg
*Agar .....	15,0 g

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 111 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlanmış ve pH' sı 7,4' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri 90 mm çapındaki petrilere 25- 30 ml (yaklaşık 4 mm kalınlığında) dökülmüştür. Petrillerdeki besiyeri donduktan sonra 37°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilmiş ve sterilit kontrolü yapılmıştır (Bilgehan, 2002).

### ***Kanlı Agar***

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

* Kalp İnfüzyonu.....	10,0 g
* Et Suyu.....	8,5 g
*Sodyum Klorür.....	5,0 g

\*Agar .....15,0 g

\*Defibrine Koyun Kanı..... 50 ml

Toz haldeki hazır Blood-Agar Base (BBL) besiyerinden 4 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı. pH' sı 7,3' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 45- 50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra % 5 oranında kan ilave edilerek karıştırıldı. 90 mm çapındaki petrilere 25- 30 ml (yaklaşık 4 mm kalınlığında) döküldü. Petrilerdeki besiyeri donduktan sonra 37°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı (Bilgehan,2002).

### ***Nutrient Agar***

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

\*Et Özeti..... 3,0 g

\* Pepton.....5,0 g

\* Agar..... ..15,0 g

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 23 g tartıldı ve 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı.

**Nişasta ilaveli Nutrient Agar :** Ayrı bir yerde 10 g Nişasta 50 ml distile su içinde krem kıvamına gelinceye kadar karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Hazırlanan nişasta karışımı Nutrient Agar besiyerine eklendi ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri, 90 mm çapındaki petrilere 25- 30 ml (yaklaşık 4 mm kalınlığında) döküldü. Petrilerdeki besiyeri donduktan sonra 37°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı.

### **Nutrient Broth**

Besiyerinin bir litrede yaklaşık içeriği:

- \*Et Özeti..... 3,0 g
- \* Pepton.....5,0 g

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 8 g tartıldı ve 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı.

**Jelatinli Nutrient Broth** :12 g jelatin hazırlanmış nutrient broth besiyerine karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Tüplere 5' er ml paylaşılırak otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi.

### **Clark-Lubs Besiyeri (MR/VP)**

Besiyerinin 1 litrede yaklaşık içeriği;

- \*Polipepton ..... 7,0 g
- \*Glikoz ..... 5,0 g
- \*Dipotasyum hidrojen fosfat..... 5,0 g

Maddeler hafifçe ısıtılarak suda eritildi ve süzgeç kağıdından süzüldü. Soğuduktan sonra pH' sı 7,5' e ayarlandı ve 1000 ml' ye tamamlandı. 5 g glikoz ilave edildi. Tüplere 5' er ml taksim edilerek 121° C' de 15 dakika otoklavlandı.

### **Triple Sugar Iron Agar (TSI agar)**

Besiyerinin 1 litrede yaklaşık içeriği

- \*Polipepton... .....20,0 g

*Laktoz.. .....	10,0 g
*Sükroz .....	10,0 g
*Glikoz.....	1,0 g
*Sodyum Klorür.....	5,0 g
*Ferrik Ammonyum Sülfat.....	0,2 g
*Sodyum Tiyosülfat .....	0,2 g
*Agar .....	13,0 g
*Fenol Kırmızısı.....	0,025 g

Maddeler karıştırıldı, sıcak su banyosunda eritildi, 121° C' de 15 dakika steril edildi, pH 7,3' e ayarlanarak deney tüplerine 8-9'ar ml dağıtıldı, tüplerde dipte 2.5 -3 cm' lik bir dik kısım ve üstte bir yatık kısım kalacak şekilde tutularak soğutuldu.

### ***Tripton Besiyeri***

İndol testinde kullanılan bu besiyerinin bileşimi;

*Triptofan (L-triptofan).....	0,1 g
* NaCl .....	0,5 g
* Buyyon (Tryptic Soy Broth).....	0,8 g

Maddeler ısıtılarak eritildi, pH 7,2' ye ayarlandı ve tüplere 3-5'er ml dağıtılıp otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış besiyerinin berrak ve sarımsı olmasına dikkat edildi.

### ***Simmon Sitrat Agar***

*Magnezyum sülfat....	0,2 g/l
*Ammonyum Dihidrojen Fosfat.....	0,2 g
* Sodyum Ammonyum Fosfat .....	0,8 g

- \* Sodyum Sitrat, tribazik..... 2,0 g
- \* Sodyum Klorür..... 5,0 g
- \* Bromtimol Mavisi..... 0,08 g
- \* Agar .....15, 0 g

Besiyeri karışımından 23 g tartılıp 1000 ml distile suda ısıtılarak erimesi sağlanır ve pH 7,0'a ayarlandıktan sonra tüplere 3–5 ml taksim edilerek 121 °C' de otoklavda 15 dk. steril edilir.

### 2.1.3. Kullanılan Ayıraçlar ve Boyalar

#### Kovaks Ayıracı :

- \*p- Dimetilaminobenzaldehit..... 5,0 g
- \*İzo veya normal amil alkol..... 10,0 g
- \*HCl konsantre .....50,0 ml

#### Metil Red Ayıracı :

- \* Metil red ..... 0,04 g
- \* Etanol ..... 40,0 ml
- \* Distile su ..... 100,0 ml

Metil red etanolde çözüldü ve 100 ml' ye tamamlandı.

#### Voges-Proskauer Ayıraçları :

- 1.  $\alpha$  – naftol..... 5,0 g
  - Absolü etil alkol .....100,0 ml
- Ayıraç .  $\alpha$  – naftol' ün alkolde çözünlmesiyle hazırlandı.

2. Potasyum hidroksit .....10,0 g  
 Distile su .....100,0 ml  
 Potasyum hidroksit distile suda çözüldü.

### **Hidrojen Peroksit (% 3' lük) Eriyiği :**

1 ml, stok % 30' luk hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) üzerine 9 ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır (Randolp, 1997).

#### **2.1.4. Numunelerin Hazırlanması**

İncelemeye alınacak her bir numunenin ambalaj kontrolü yapıldı. Numunelerin kapakları steril eldiven giyilerek bek alevi yanında açıldı ve %70' lik alkol içine daldırılmak suretiyle sterilite testine hazır hale getirildi.

#### **2.1.5. Aletlerin Hazırlanışı ve Sterilizasyonu**

Kullanılacak filtrasyon sisteminin tüm parçaları, sıcak musluk suyu ve deterjanlı su ile fırçalanarak yıkandı. Birkaç defa distile sudan geçirilerek iyice durulandı. 60° C' lik etüvde kuruması sağlandı ve sarılarak otoklavda 121° C' de 15 dakika steril edildi (Bilgehan, 2004). Bu işlem her çalışma için aynı şekilde tekrarlandı.

Petriler yıkanıp distile sudan geçirildikten sonra pastör fırınında kuruması sağlandı. Paketlenerek otoklavda steril edildi.

Sıvı Besiyerleri TSB ve FTM hazırlandı, 200 ml' lik şişelere 100 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Otoklavda 121° C' de 15 dakika steril edilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi (Bilgehan, 2004).

Besiyerleri uygun koşullarda hazırlandıktan sonra otoklavda 121° C ' de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon işlemi besiyerlerinin kalitesi için önemli bir rol oynamaktadır. Besiyerleri, baloncuk, partikül içermemelidir.

Kristalize olmamalı ve soğuk ortamlarda muhafaza edilmelidir. Sterilizasyon işleminden sonra hazırlanmış her bir besiyerinden 2' şer adet alınarak kontrol amacıyla etüvde 37° ' de 2 gün veya oda sıcaklığında en az 3 gün kontaminasyondan kaynaklı bir büyüme olup olmadığını gözlemek için bekletildi (Basu ve ark., 2005 ).

Katı besiyerleri hazırlandı. Otoklavda 121° C' de 15 dakika steril edildikten sonra aseptik şartlarda petrilere bölündü ve bir gün süreyle etüve kaldırıldı. Daha sonra buzdolabında muhafaza edildi.

## **2.2. YÖNTEM**

Denemeye alınan numunelerin mikrobiyolojik kalite kontrolleri yapıldı. Bu amaçla, parenteral preparatların tümünün steril olma koşulu göz önünde bulundurularak sterilite test kontrolleri yapıldı. Bunun yanı sıra üreme gözlenen bazı numuneler için identifikasyon testleri yapılarak kontaminasyon kaynağı tespit edildi.

### **2.2.1. Sterilite Testi**

Sterilite testinin önerilen metodu uygun ürünler için membran filtrasyon yöntemidir. Eğer ürün bu yöntemeye uygun değil ise direkt inokülasyon metodu kullanılır (USP 27, 2004d).

Bizim çalışmamızda, parenteral vitamin preparatlar incelemeye alındığı için, bu ürünlerin membran filtrasyon yöntemine uygun olması sebebiyle sterilite testinde membran filtrasyon yöntemi kullanıldı.

Sterilite testi aseptik şartlar altında yapıldı. Bu amaçla öncelikle anaerobik bakterilerin üremesine uygun FTM ve aerob bakteri ve mantarların gelişimine uygun TSB besiyeri kullanıldı. Her iki besiyeri de 200 ml' lik şişelere 100 ml denk gelecek şekilde paylaştırılıp sterilize edilerek hazırlandı. TSB 22.5± 2.5° C ve FTM 32.5± 2.5° C inkübasyona

bırakıldı. Çalışılan numuneler 14 gün süresince etüvde bekletildi (EP, 2000; Wilson ve Varney, 1995; USP 27, 2004d).

### 2.2.1.1. Membran Filtrasyon Metodu

Çalışmamızda filtrasyon metodunu uygulayabileceğimiz sterilit kontrolü için Kapalı Filtrasyon Sistemi (Vacuum Filter Holders Sterility Testing System) kullanıldı. Vacuum Filter Holders Sterility Testing System; peristaltik bir pompa, bir T- distribütörü ile 0,45 µm zar ihtiva eden cam ve polipropilen filtre tutucu, doldurma kapağı ve T-dağıtım konektörüne iliştirilen silikon boru yoluyla bağlanmış doldurma kapağından ibaret olan bir sistemdir.



**Şekli 1:** Kapalı Filtrasyon Sistemi

Mikrobiyolojik analiz sırasında denemeye alınan numunenin dışardan kontaminasyonu önleni ve bu amaca yönelik uygun ortamda denemeler gerçekleştirildi. Çalışma ortamındaki U.V. lambaları ortam sterilizasyonu amacı ile çalışmaya başlamadan önce 45 dakika boyunca çalıştırıldı. (FDA, 2004).

Hazırlanan tutucular, polipropilen fişler ve metal kapaklar sarıldıktan sonra 121° C de 15 dakika süresince otoklavda sterilize edildi. Ultraviyole ışığı altında muhafaza edildi. Vakumlu dağıtım borusu ile peristaltik pompa aynı tezgah üzerinde monte edildi. Dağıtım borusu muslukları ve pompalar bir pedal aracılığı ile çalıştırıldı. Steril filtre tutucuları alt vidaları çıkarılarak monifolt üzerine yerleştirildi. Steril silikon hortum peristaltik pompanın döner başlığına takılarak tekli ucuna steril emici iğne takıldı. Hortumun çiftli ucu filtre tutucularına takıldı. Testin uygulanacağı ilaç örneği 15 dakika boyunca çalkalandıktan sonra çalışmaya başlandı. Öncelikle ilaç filtreden geçirilirken peristaltik pompa yardımıyla emdirilerek filtreden vakum yaptırılmak sureti ile alındı. Aynı hortum kullanılarak filtre tutucularının birisine FTM dolduruldu ve  $32.5 \pm 2.5$  ° C' de bakterileri tespit etmek için etüve kaldırıldı. Diğer filtre tutucusuna da TSB dolduruldu  $22.5 \pm 2.5$  ° C' de küf ve mayaların tespiti için etüve kaldırıldı. Her iki filtre tutucusu da 14 gün inkübasyona tabi tutuldu (Bugno ve Pinto, 2002a; BP, 2004; USP 27, 2004d).

İnkübasyon periyodu süresince üremenin var olup olmadığı gözlemlendi (MO BIO, 2006).

14 günlük inkübasyon periyodu boyunca besiyerleri kontrol edildi. Her besiyeri için aşağıda belirtilen işlemler gerçekleştirildi.

### **2.2.1.2. Değerlendirme**

İnkübasyon dönemi boyunca aralarda ve sonunda, mikrobiyal büyümenin makroskopik kanıtı için ortam incelendi. Test edilen materyalde, inkübasyon periyodu başladıktan sonra, 14 gün boyunca görsel incelemeyle mikrobiyal büyümenin varlığı ya da yokluğu tespit edilebildi. Ancak mikrobiyal üremenin daha sağlıklı anlaşılabilmesi için, üreme olan kaplardan, aynı içerikli yeni besiyerlerine aktarma yapıldı. Orijinal ve transfer edilmiş kapların inkübasyonuna aşılardan itibaren 14 gün süresince devam edildi (BP, 2004; USP 27, 2004d).

Sterilite testi ile uyumlu görülmeyen örnekler yukarıdaki işlemlerle eş zamanlı olarak kanlı agara pasajlandı ve Gram boyaması yapıldı. Burada incelenen sonuçlara göre yorumlar yapıldı.

Kanlı agarda oluşan koloniler, Mueller Hinton Agar' a yeniden pasajlandı. 24 saat etüvde bekletildikten sonra koloniler incelendi ve identifikasyon testlerine geçildi.

### **2.2.2. Biyokimyasal Testler**

Bakterilerin teşhisinde yararlanılan biyokimyasal testlere ait reaktifler ve testlerin yapılışı aşağıda belirtilmiştir.

#### **1. İndol Deneyi**

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasid olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır. Mikroorganizmalar tripton besiyerine ekildikten sonra 37° C de 1-5 gün inkübasyona bırakıldı.

Kültürlerin üzerine kovacs ayırıcından 0,5 ml ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyonu (indol formasyonunu) ifade eder. Sarımsı halka indolun oluşmadığını gösterir (negatif indol testi).

#### **2. MR Deneyi**

MR deneyi, bakterilerin karbonhidratları (glikozu) fermente etmeleri esnasında oluşan laktik, asetik ve formik asit gibi ürünlerin, besiyerinin pH' sını metil kırmızısı ile saptanabilecek derecede düşürmeleri temeline dayanır. Bu amaçla tamponlanmış glikoz besiyeri (Clark-Lubs) ve metil kırmızısı ayırıcı kullanılır (Bilgehan, 2002).

Metil kırmızısı alkolde çözüldükten sonra distile su ile 50 ml' ye tamamlandı. Saf kültürden ekim yapılan Clark-Lubs besiyerinde 48 saat üretilen bakteri kültürü üzerine 5-6 damla ayıraç ilave edildi. Turuncu ve sarı renkler negatif, kırmızı renk oluşumu pozitif kabul edildi.

### 3. Voges –Proskauer (VP) Deneyi

Glikozun fermentatif parçalanması esnasında oluşan pirüvik asit, bir kısım bakterilerde bulunan enzimatik sistemlerle daha ileriye doğru parçalanarak son ürün olarak asetoin' i meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılır. Özel ayıraçlarla ortaya çıkarılan bu ürünü oluşturan bakteriler VP olumlu kabul edilir. (Bilgehan, 2002).

Metil kırmızısı deneyi için, Clark-Lubs besiyerinde üretilen bakteri kültüründen 24 saat sonunda steril bir tüpe 1 ml aktarıldı ve üzerine önce 0,6 ml  $\alpha$  – naftol ayıracı ve hemen sonra 0,2 ml KOH ayıracı damlatıldı. Besiyerinin hava ile temas etmesi için çalkalandı ve dik olarak 10- 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda kırmızı rengin oluşumu, bakterilerin asetoin oluşturduklarının bir göstergesi olarak kabul edildi ve VP olumlu olarak yorumlandı.



**Şekil 2:** Pozitif ve negatif Voges-proskauer

#### **4. Sitrat Deneyi**

Bu test, mikroorganizmaların, besiyelerine katılan sitratı karbon kaynağı, amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada, bakteri cins ve türlerini identifikasyonda kullanılır. Bakteriler tarafından sitratın ayrışması (sitrat metabolizması) enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu enzime citritase (citrate oxalacetate-lyase) veya citrate demolase adı verilir.

Muayeneleri yapılacak saf kültürler steril fizyolojik su veya buffer ile biraz sulandırıldıktan sonra Simmon Sitrat besiyelerine ekimler yapıldı ve tüpler 2- 7 gün 37° C inkubasyonda tutuldu. Orijinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak %0,2 Bromtimol mavisi kullanılan besiyelerinde, besiyeleri renginin maviye dönüşmesi ve ekim hattı boyunca üreme gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Besiyeleri renginin değişmediği durumlarda sonuç negatif olarak yorumlandı.

#### **5. Glikoz, Sukroz ve Laktozun Kullanımı, H<sub>2</sub>S Oluşturma (TSI)**

TSI besiyelerinde glikozun 10 katı kadar laktoz ve sukroz bulunmaktadır. Glikozu fermente eden bakteriler oluşturdukları asit ile fenol kırmızısı ayracını etkileyerek sarı renk yaparlar. Bakteriler, dipteki zayıf oksijenlenen bölgede glikozu fermentasyonla parçaladıklarından respiratif yoldan parçaladıkları besiyeleri yüzeyine göre dipte daha fazla asit oluştururlar. Diğer yandan bakteriler besiyelerindeki peptonun oksidatif dekarboksilasyonundan alkali ürünler oluştururlar. Bu alkali ürünler besiyeleri yüzeyindeki glikozdan oluşan asitleri nötralize ederler. Bu nedenle; glikozu fermente edip laktoz ve sukrozu parçalamayan bakteriler dipte sarı yatıkta kırmızı renk oluştururlar. Laktoz ya da sukroz veya her ikisini de fermente eden bakteriler bol miktarda asit oluşturduklarından oluşan alkali ürünler ne dipteki ne de yatık bölgedeki asidi nötralize etmeye yetmezler. Bu nedenle laktozu, sukrozu ya da her ikisini fermente edebilen bakteriler hem dipte hem de yatıkta sarı renk

oluştururlar. Besiyerinde hava kabarcıklarının oluşması, gaz oluşturan bakterilerin etkisiyle tiyosulfatın, ferrik amonyum sulfata etki ederek siyah renkli ferröz sülfid yaptığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Üç şekerli demirli besiyeri TSI agar kullanılarak bakterilerin glikoz, laktoz, sukroz üzerindeki etkileri ve H<sub>2</sub>S oluşturup oluşturmadıkları gözlemlendi.

Saf kültürlerden önce dip kısma batırılarak sonra eğik kısmın yüzeyine ekim yapılarak 37° C' de 24 saat inkübe edildi.

## 6. Nişasta hidrolizi

Bu test, bir homopolisakkarid olan nişastanın, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen ekstrasellüler amilaz enzimi tarafından hidrolizasyonunu ortaya koymak amacı ile yapılır. Petri kutularında hazırlanmış nişastalı agar besiyerleri, denenecek mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri, Lugol solüsyonu veya % 95 etanol kullanıldı.

Nişasta hidrolizasyon aktivitesi ölçülecek mikroorganizmadan nişastalı agar üzerine çizgi tarzında ekimler yapıldı ve 37° C de 2-5 gün inkübe edildi.

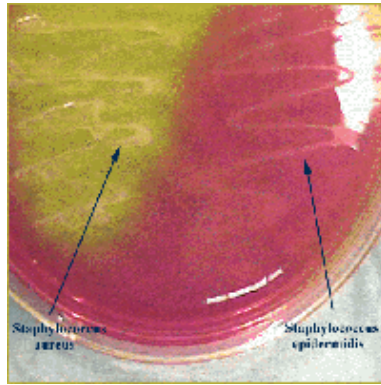
İnkübasyon süresinin sonunda taze hazırlanmış Lugol solüsyonu agar yüzeyini kaplayacak şekilde döküldü. 5 dakika içinde koloniler etrafında berrak veya renksiz bir bölge oluşumu olumlu, mavi renk oluşumu ise olumsuz olarak değerlendirildi.



**Şekil 3:** Pozitif ve negatif nişasta hidrolizi

## 7. Mannitol Salt Agar Deneyi

Besiyeri yüksek tuz konsantrasyonuyla stafilokoklar dışındaki diğer bakterilerin üremesini inhibe eder. Ayrıca besiyerindeki mannitolün fermentasyonu sonucunda besiyerinin pH' ı değişir ve fenol kırmızısı ayracının rengi kırmızıdan sarıya döner. İncelenecek bakteriler MSA besiyerine 2- 2,5 cm' lik çizgi ekim şeklinde ekildi ve 37° C' de, 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Rengi sarı olanlar pozitif olarak değerlendirildi.



**Şekil 4:** Mannitol salt agar besiyeri. *S.aureus* suşları, mannitolü fermente ederek fenol kırmızısının rengini kırmızıdan sarıya çeviriyor.

## 8. Jelatin Hidrolizasyon Testi

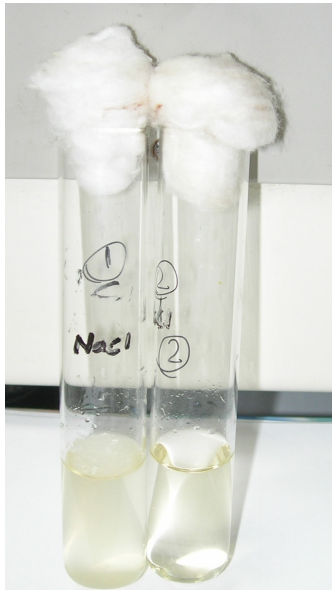
Bu test, mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzimini sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. Jelatin protein karakterinde bir madde olup kollagenin hidrolizasyonundan elde edilir.

Mikroorganizma kültürlerine değdirilmiş olan iğne, dik olarak jelatinli besi yerlerine daldırıldı (yeterince ekim yapılmalıdır). Tüpler 37° C de 15 gün kadar inkübe edildi. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buzdolabı sıcaklığında 1- 2 saat bırakıldı. Erimenin olup olmadığına dikkat edildi. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür (pozitif jelatin hidrolizasyonu). Negatif durumlarda tüpteki sıvı jelatinli besi yeri katılaşır.

## 9. % 6,5 NaCl Besiyerinde Üreme

MHB besiyerine ilave edilen NaCl ile birlikte ortamda % 6,5 oranında NaCl olması ve şüpheli kolonilerin bu ortamda üreme özelliklerinin tespit edilmesi amaçlandı.

İncelenen bakteri kolonilerinden NaCl ilave edilmiş ve ilave edilmemiş MHB tüplerine ekim yapılarak 35° C' de 48 saat inkübasyon sonrasında üreme durumları gözlemlendi (Bilgehan, 2002).



Şekil 5: % 6,5 NaCl Besiyeri

## 10. Katalaz Deneyi

Katalaz enzimi yapan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırırlar. Bu nedenle bu enzimin varlığı hidrojen peroksit ile araştırılır ve serbest oksijenin çıkışı gaz kabarcıkları halinde gözlenir (Bilgehan, 2002).

Serumsuz ve kansız besiyerinde 37°C' de 24 saatlik inkübasyona bırakılan mikroorganizmalardan, temiz bir lam üzerine öze yardımıyla bir miktar alındı. Üzerine taze hazırlanmış % 3' lük hidrojen peroksit solüsyonu ilave edilerek gaz kabarcıklarının çıkışı gözlemlendi.

## 11. Oksidaz Deneyi

Solunumla oksidatif fosforilasyon yapan bakterilerin bu reaksiyonlarda kullandıkları enzim sitokrom oksidazdır. Oksidaz deneyi bu enzimatik etkinliğin saptanması için yapılır (Bilgehan,2002).

Kovaks ayırıcı 2-3 damla Whatman No: 1 filtre kağıdına emdirildi. İnce ucu kapalı bir pastör pipeti ile besiyerine temas etmeden alınan koloniden filtre kağıdına sürüldü. 10-15 saniye sonra koyu mor rengin oluşup oluşmadığına bakılarak değerlendirme yapıldı.

## 12. Koagülaz Deneyi

Bu test, özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştırıcı koagülaz enzimini ortaya koyma, patojenik olanlarla nonpatojenik olanları ayırmak amacı ile yapılır. Patojenik olan *S. aureus* pozitif reaksiyon vermesine karşın *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir.

*S.aureus*' un serbest, ekstrasellüler koagülaz ve hücre yüzeyine bağlı (kümeleştirici faktör) olmak üzere iki tip koagülazı vardır. Deney; insan plazması kullanılarak kümeleştirici faktör yöntemiyle yapılmıştır.

### ***Lamda Koagülaz ( Kümeleştirme Faktörü) Deneyi***

Temiz bir lamın iki ucuna birer damla steril serum fizyolojik damlatıldı. Bakterinin TSA' daki taze kültüründen 2-3 koloni alınarak, lamın her iki ucundaki damla ile homojen hale getirildi. Lamın bir ucundaki karışımın üzerine bir damla insan plazması damlatıldı. 30 saniye içinde oluşan kümeleşme pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 2002).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Mikrobiyolojik Kalite Kontrolleri

Bu araştırmada, Türkiye’de değişik firmalar tarafından veteriner hekimlikte kullanılmak üzere üretilen ve değişik bölgelerdeki ecza depolarından temin edilen 27’ si suda eriyen, 23’  yağda eriyen toplam 50 adet parenteral vitamin preparatı, mikrobiyolojik kalite kontrolü açısından incelenmiştir.

Mikrobiyolojik analizler sonucu elde edilen veriler tablo 3’ de görülmektedir. İncelenen 50 numunenin 5 ‘inde üreme gözlenmiştir (şekil 6). Pasajlarında saf kültür olarak üreyen kontamine preparatlardaki mikroorganizmalar, 1 nolu numunede *Bacillus polymyxa*, 2 ve 6 nolu numunelerde *Bacillus brevis*; 23 ve 24 nolu numunelerde *Staphylococcus aureus*, olarak tiplendirilmiştir (şekil 7).



pozitif örnek

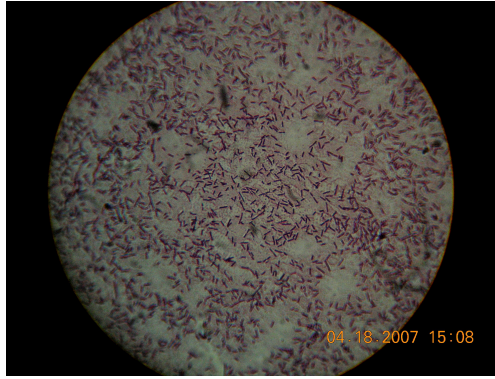


negatif örnek

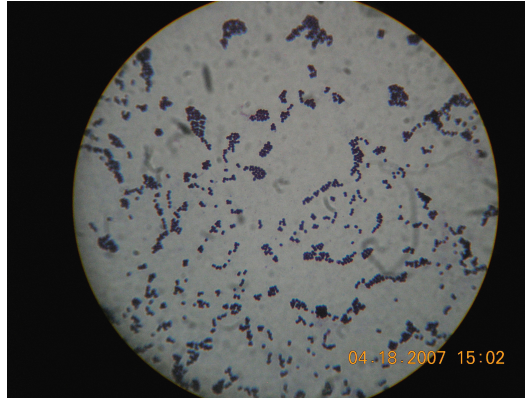
**şekil 6:** Sterilite testinde üremenin pozitif ve negatif olduğu rnekler.



*Bacillus polymyxa* (1 nolu preparat)



*Bacillus brevis* (2 nolu preparat)



*Staphylococcus aureus* (23 nolu preparat)

**Şekil 7:** Bakterilerin mikroskobik görüntüsü

<b>Tablo 3: Mikrobiyolojik analizler sonucu elde edilen veriler</b>					
Numune No	Sterilite testi	TSB (tüp)	Kanlı agar	Gram boyama	MHA
1	+	+	+	*	+
2	+	+	+	*	+
6	+	+	+	*	+
23	+	+	+	&	+
24	+	+	+	&	+

\* : Gram (+) Basil      &: Gram (+) Kok.

İzole edilen mikroorganizmaların identifikasyonu için yararlanılan biyokimyasal reaksiyonlar tablo 4' de gösterilmiştir.

**Tablo 4:** İzole edilen Mikroorganizmaların tiplendirme için yararlanılan biyokimyasal reaksiyonların sonuçları

**Tablo 4-a:** Gram (+) basiller için uygulanan testler

Numune no	1 <i>Bacillus polymyxa</i>	2 <i>Bacillus brevis</i>	6 <i>Bacillus brevis</i>	23 <i>Staphylococcus aureus</i>	24 <i>Staphylococcus aureus</i>
İndol	-	-	-	-	-
Metil-Red	-	-	-	-	-
Voges- Proskauer	+	-	-	+	+
Sitrat	-	d	d	-	-
Nişasta Hidrolizi	+	-	-	-	-
Jelatin Hidrolizi	+	-	-	+	+
Laktoz	-	-	-	+	+
Glikoz	+	d	d	+	+

**Tablo 4-b:** Gram (+) koklar için uygulanan ayırıcı testler

% 6,5 NaCl	+	-	-	+	+
Mannitol Salt Agar				+	+
Katalaz				+	+
Oksidaz				-	-
Koagülaz				+	+

Yapılan deneyler sonucunda; içerikleri aynı olan ancak farklı firmalara ait 2 ve 6 nolu numunelerde görülen mikroorganizmalar *Bacillus brevis* olarak tiplendirilmiştir. *Bacillus brevis*' in üremiş olduğu numunelerin vitamin E ve sodyum selenit içeren yağlı preparatlar olduğu görülmüştür.

Aynı ürünün farklı seri numaralarına ait olan 23 ve 24 nolu numunelerde yapılan kontroller sonucunda ise; *Staphylococcus aureus* tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus*' un üremiş olduğu 23 ve 24 nolu preparatların vitamin A, vitamin D<sub>3</sub> ve vitamin E içerdikleri görülmüştür.

*Bacillus polymyxa*' nın ürettiği 1 nolu numunenin ise B kompleks vitaminlerinden oluştuğu saptanmıştır.

Mikroorganizmaların üremiş olduğu ürünlerin aynı seri numaralarına ait açılmamış örnekleri üzerinde tekrarlanan testlerle sterilit testi kontrol edilmiştir. Bunun sonucunda, tiplendirmeler yeniden yapılmış ve aynı mikroorganizmalar tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre, kontaminasyonun üretim aşamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### 4. TARTIŞMA

Tüm farmasötik preparatlarda gerekli ve önemli olan mikrobiyolojik kalite için, öncelikli olarak parenteral ilaç üretimleri sırasında oluşabilecek mikrobiyolojik kontaminasyon etkenlerinin tespit edilmesi ve bu konuyla ilgili gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Özellikle steril ürün imalatında çevre, personel, hava ve kullanılan ekipmanlardan kaynaklı kontaminasyon büyük önem taşımaktadır (Seyfarth, 1985).

İlaç üretimi ve ilaç yan sanayinde, ürünü mikroorganizmalardan ve partiküllerden korumak ve insan sağlığını temel alan riskleri en az seviyeye indirebilmek için belirli şartların yerine getirilmesi gerekmektedir. Bu şartlar ürünün iyi tanınmasına, üretim alanının yapılandırılması ve iklimlendirilmesine, bu alanlarda çalışacak olan personelin eğitim ve disiplinine bağlıdır (Kenter, 2003).

Parenteral preparatların üretiminde uyulması gereken bazı gerekliliklerin mevcut olduğu bilinmektedir. FDA, kullanıma hazır hale gelmiş parenteral preparatlar için değerlendirme yaparken, gelişmiş kalite kontrol sistemlerini ve GMP kurallarını dikkate almaktadır. Üretim sırasında kullanılacak malzemelerden başlayarak, üretimin yapıldığı alan, hava kalitesi, dolum yapılan şişeler ve personel temizliğinin çok önemli olduğu yapılan araştırma sonuçlarında alınan değerlerle açığa çıkmıştır (Boylan, 1983).

Mikrobiyal kontaminasyona uğramış parenteral ilaçların kullanılması ciddi problemlere neden olabilir. Hastaya verilecek bir ilaçtan formüle uygunluk, stabilite gibi özellikler kadar kontamine olmaması da istenmektedir (USP 27, 2004a; Dortunç ve Gürsoy, 2004; ASHP, 2005). Piyasaya sürülecek ürünlerin kalitesinin arttırılması, sterilite garantilerinin verilmesi hastalar için çok büyük bir önem taşımaktadır (Verjans, 2006).

İki tip kontaminasyon söz konusudur.

- 1.Partikül kontaminasyonu
- 2.Mikroorganizma kontaminasyonu

Partikül kontaminasyonu, üretim aşamasında engellenirken, mikroorganizma kontaminasyonunu engellemek için sterilizasyon teknikleri veya aseptik üretim tekniklerinin kullanılması gerekmektedir.

İlacın her iki şekilde de kontaminasyonunun önemli tehlikeleri vardır. Partikül kontaminasyonunda; yabancı madde, başka bir ilaç veya metal partiküller, asbest, cam, kauçuk, kağıt, kül vb. herhangi bir partikül etken olabilir. Partikül kontaminasyonu; enjeksiyonluk preparatlar ve göz preparatları için önem taşımaktadır. Bu nedenle bu preparatlarda partikül kontaminasyonu sınırı getirilmiştir (BP, 2004).

Mikroorganizma taşıyan farmasötik preparatlar ise, hastalıklara neden oldukları gibi, mikroorganizmalar ve metabolizma ürünleri preparatların fiziksel, kimyasal ve estetik açıdan bozulmasına da neden olabilirler. Çünkü uygun koşullar oluştuğunda mikroorganizmalar buldukları preparatta çoğalabilirler (Dortunç ve Gürsoy, 2004).

Emülsiyon preparatlarda üretim sırasında filtrasyon tekniğinin kullanılması, mikrobiyolojik kontaminasyonu engelleyen faktörlerden biri olarak bilinmektedir. Yakın zamanlara kadar, emülsiyonların mikrobiyolojik filtreden geçmesi mümkün değildi. Yeni filtre teknolojisinde, yüksek etkili filtreler emülsiyon preparatlarda kullanılabilir. Emülsiyonların filtrasyonunda kullanılan Pall Lipipor membran filtrelerinin, klinik öneme sahip kontaminantların tutunmasında, stabilitelerinde ve ilacın vücuda dağılmasında etkili olduğu görülmüştür. Filtrasyona tabi tutulmuş emülsiyon preparatlar hastalar için ilave bir güvenlik sağlamaktadır. Propofol 'den ya da emülsiyon preparatlarından Pall Lipipor membran sistem tarafından uzaklaştırılan mikroorganizma sayıları tablo 5' de gösterildiği gibidir. Bu filtrasyon yöntemi ilacı partiküler kontaminasyondan da korumaktadır (Hunter,1996).

**Tablo 5:** Pall Lipipor membran sistemi tarafından uzaklaştırılan mikroorganizmalar.

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Total mikroorganizma sayısı</b>	<b>Uzaklaştırma etkisi</b>
<i>Candida albicans</i>	$2.5 \times 10^4$	tamamen süzölmüş
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$1.7 \times 10^4$	tamamen süzölmüş
<i>Moraxella osloensis</i>	$1.7 \times 10^4$	tamamen süzölmüş
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4.5 \times 10^4$	> 99.8 %

Japonya'da bulunan 10 hastanede yapılan bir çalışmada; toplam 199 standart parenteral nutrisyon solüsyonu üretimlerinden sonra partiküler ve mikrobiyal kontaminasyon açısından değerlendirilmeye alınmıştır. Mikrobiyal kontaminasyon oranı % 8,2 olarak bulunan bu çalışmanın sonuçları CDC tarafından ana noktalarda değerlendirilmiş ve desteklenmiştir. Oluşan kontaminasyonların sebepleri araştırıldığında ise, ürünlerin üretim aşamasında filtrasyon tekniğinin kullanılmadığı ortaya çıkmıştır. Japonya gibi Asya ülkelerinde parenteral çözeltilerdeki partiküler ve mikrobiyal kontaminasyona gerekli önem verilmemektedir. Partiküler ve mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi için yapılması gereken en önemli işlem olan filtrasyon sistemi ile süzme işleminin gerektiği şekilde yapılmadığına dikkat çekilmiştir. Bu konuda yeterli hassasiyetin gösterilmemesi ve gerekenlerin yapılmamasının sebeplerinden biri de konu hakkında çok az sayıda çalışmanın olmasından kaynaklanan yetersiz bilgi olabileceği düşünülmektedir (Oie ve Kamayi, 2005).

İlaç üretimi sırasında meydana gelebilecek mikrobiyal kontaminasyonun kaynaklarını araştırmak üzere 2001 yılında yapılan bir çalışmada, ülkemizdeki bir ilaç fabrikasının üretimde çalışan personeli, soyunma odaları, üretim alanları, makine ve ekipmanları, suyu, mikrobiyoloji laboratuvarı ve bitmiş ürünlerinden, açık petri, swab ve membran filtrasyon yöntemleri ile örnekler alınmıştır. Alınan 112 örnekten 255 adet bakteri suşu izole edilmiştir. İzole edilen suşların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre tanıları yapılmış ve bu bakterilerden 154' ünün koagülaz negatif

*Staphylococcus*, 40' ının *Micrococcus*, 44'ünün *Bacillus*, ikisinin *Corynebacterium* cinsindeki türlere ait saprofit bakteriler olduğu saptanmıştır. Üretim sahasının havasından, su örneklerinden, kullanılan ekipmandan, üretim alanlarından ve mikrobiyoloji laboratuvarından izole edilen bakterilerin bir kısmı tablo 6' da gösterilmiştir (Uçarlar ve ark., 2001).

**Tablo 6:** Üretimden, üretim operatörlerinden, üretim alanlarından ve mikrobiyoloji laboratuvarlarından izole edilen bazı bakteriler.

Kontaminasyon kaynakları	Bakteri türü
Eller	<i>Staphylococcus simulans</i>
	<i>Micrococcus roseus</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
Hava	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Bacillus polymyxa</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Su	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
	<i>Aeromonas sabria</i>
	<i>Agrobacter radiobacter</i>
Yer	<i>Micrococcus varians</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
Çalışma alanı	<i>Bacillus polymyxa</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Bacillus brevis</i>
	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Makine alanları	<i>Staphylococcus intermedius</i>
	<i>Bacillus polymyxa</i>
	<i>Bacillus brevis</i>
	<i>Bacillus firmus</i>
Mikrobiyoloji lab. çalışma alanı	<i>Staphylococcus intermedius</i>
	<i>Micrococcus varians</i>
	<i>Bacillus polymyxa</i>
Laminair flow	<i>Staphylococcus intermedius</i>
	<i>Staphylococcus caseolyticus</i>

1998 yılında yapılan bir çalışmada ise; üretimde kullanılacak suyun belirli kriterlerde olması gerektiğine dikkat çekilmiştir. Bu suyun, ürünlerde bir kontaminasyon kaynağı oluşturmaması için saflaştırma sistemlerinin

kullanım gerekliliği vurgulanmaktadır. Üretimde kullanılan suyun mikrobiyolojik kalite kontrolü, membran filtrasyon tekniği kullanılarak yapılmış olup tespit edilen bakteriler tiplendirilmiştir. Bu koşullarda izole edilen bakterilerin % 76,9' unu Gram (-) bakteriler, % 14,6' sını Gram (+) koklar, % 8,5' ini Gram (+) basiller oluşturmaktadır (tablo 7) ( Martino ve ark., 1998).

**Tablo 7:** Üretimde kullanılan sudan izole edilen bazı bakteriler.

Kontaminasyon kaynakları	Bakteri türü
Su	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Aeromonas salmonicida</i>
	<i>Agrobacter radiobacter</i>

Çalışmamızda incelenen ürünlerde tespit ettiğimiz *Bacillus brevis*, *Bacillus polymyxa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri 2001 yılında yapılan çalışmanın sonuçları ile karşılaştırılacak olursa, ürünlerimizde görülen kontaminasyon kaynağının, üretim sırasında kullanılan makine, ekipman, üretim alanı ve hava olabileceği düşünülmektedir.

Parenteral preparatların mikrobiyolojik kalite kontrolü için sterilite testinin yapılması gerekmektedir (USP 27, 2004d; BP, 2004).

Sterilite testi, 2 metot kullanılarak yapılmaktadır. Bunlar direkt inokülasyon ve membran filtrasyon metodudur. Ancak mikrobiyal kontaminasyon kontrolü için en uygun test yöntemi membran filtrasyon yöntemi olarak belirlenmiştir (BP, 2004; USP 27, 2004d). Membran filtrasyon yöntemi; mikrobiyal kontaminantları tutarak filtreden yalnızca inhibitörlerin ve test numunelerinin geçmesine izin verecek şekilde tasarlanmış bir yöntemdir. Membran filtreler kontrolü yapılan numunede mikroorganizma varsa onu tutmayı sağlamaktadır. Filtre üniteleri steril bir şekilde inoküle edilerek 14 gün süreyle inkübe edilmektedir (USP 27, 2004d; BP, 2004).

10 yıllık bir periyotta yapılan analizlere bakıldığında, kontrollerin uygun sterilite yöntemiyle yapılmasının yanı sıra, inkübasyon sürelerinin de sterilite test sonuçlarını etkileyen ciddi bir faktör olduğuna karar verilmiştir. Sonuçta, gözlenebilir kontaminasyon büyümesi için membran filtrasyon ve direkt inokülasyon metodu arasında inkübasyon süresi olarak bir farkın olmadığı görülmüştür (Bathgate ve ark., 1993). Eğer ürün koruyucu veya antimikrobiyal maddeler içermiyorsa büyüme erken zamanda oluşur ve gözlenebilir. Membran filtrasyon metodu ile yapılan analizler sonucunda 7 günlük bir inkübasyon süresinin yeterli olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada bu sürenin kontaminasyonun tam olarak saptanması için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (Moldenhauer, 2004).

Baştan beri yapılan sterilite test metotlarında önemli gelişmeler olmuştur. İnokülasyon metotlarının kullanımında ve mikroorganizma tiplerinin belirlenmesinde 3 ve 7 gün gibi farklı inkübasyon periyotlarının kullanımı benimsenmiştir. Ancak Amerikan farmakopesi yayınladığı son baskısında inkübasyon periyodunu 14 gün olarak belirlemiştir (USP 27, 2004d). 14 günlük inkübasyon periyodunun sterilite testi yapılmış farmasötik ürünlerdeki mikrobiyal kontaminasyonun tespiti için yeterli bir süre olduğu başka yayınlarda da bildirilmiştir (Bugno ve Pinto, 2002b-c; BP, 2004).

Bizim çalışmamızda, üremeyi takip etmek ve sağlıklı gözlem yapabilmek açısından en uygun dönem olarak kabul edilen 14 günlük inkübasyon periyodunun sonunda değerlendirmeler yapılmıştır.

Membran filtrasyon yöntemi büyük hacimli örneklerin çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Eğer test numunesi mikroorganizmaların üremesini engelleyecek bazı maddeler içeriyorsa uygun durulama ajanı kullanılarak membran filtreden bu maddeler uzaklaştırılabilmektedir (BioReliance, 2006).

Posey ve ark. (1981) tarafından yapılan çalışmada, intravenöz solüsyonlarda mikrobiyolojik kalite kontrolünde yararlanılan niteliksel membran filtrasyon yönteminin diğer metotlara göre çok daha güvenli olduğu tespit edilmiştir. Membran filtrasyon tekniği ile ortamda mevcut tüm mikroorganizmaların izole edilmesinin mümkün olduğu bildirilmiştir.

Longfield ve ark., (1982)'nin yaptığı bir çalışmada, intravenöz solüsyonlardan 96 numuneye *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*,

*K.pneumoniae*, *E.agglomerans* veya *C.albicans* belli konsantrasyonlarda inoküle edilmiştir. Pasajdan sonra örneklerin, hem sıvı besiyeri kültürlerine direkt transfer metodu kullanılarak, hem de 0,45 µm por genişliğine sahip membran filtreden geçirilmek suretiyle sterilite kontrolleri yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra, sıvı besiyeri kültürlerinin, filtre kültürlerinin % 68' i kadar üreme gösterdiği gözlenmiştir. En düşük konsantrasyonlardaki sıvı kültürlerde ise (1 organizma / ml) membran filtrasyon tekniği sonrasında 24 saatlik büyümenin % 45 oranında hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, membran filtrasyon tekniğinin çok düşük konsantrasyonlarda dahi, mikrobiyal kontaminasyonun teşhisinde çok hızlı ve güvenilir bir metot olduğu görülmüştür. Filtrasyon metodunun uygulanmasındaki kolaylık ve doğruluğun, klinisyenlere intravenöz sıvılarla ilgili sepsis seviyelerinde oluşan şüpheyi tespit etmekte çok yardımcı olduğu bilinmektedir.

Bizim çalışmamızda "Vacuum filter Holders Sterility Testing System" adlı kapalı membran filtrasyon sistemi kullanılarak parenteral ilaçlarda mikrobiyal kontaminasyon varlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Seçilen 50 enjektabl numune bu sistem ile, aseptik koşullar altında sterilite testine alınmıştır. Test tamamlandıktan sonra 14 günlük bir inkübasyon evresinin sonunda değerlendirme yapılmış olup, 50 numuneden 5 tanesinde kontaminasyon tespit edilmiştir. Kontaminasyonların kaynağının belirlenmesi için identifikasyon testleri yapılmıştır.

Parenteral preparatlarda görülen kontaminasyonlar üretim aşamasında oluşabileceği gibi, normalde kontamine olmayan bir solüsyon, sterilite testine girdiğinde test sırasında oluşabilecek dıştan gelen bir kirlilik sonucunda da kontamine olabilir. Buna neden olabilecek başlıca etkenler; kullanılan besiyerleri, sterilite testinin yapıldığı hava ve ortam koşullarının yetersiz olması, sterilite testini yapan kişinin kıyafeti ve çalışma koşullarından kaynaklanabilecek kontaminasyonlar olarak gruplandırılabilir (TGA, 2006).

Bernick ve ark, 'nın 1979 yılında yaptıkları bir çalışmada hastanelerde kullanılan ve aseptik teknikle üretilmiş parenteral infüzyon solüsyonları sterilite kontrolüne alınmıştır. Sterilite testine alınan 10 üründen 1 tanesinde

üreme gözlenirken aynı 10 ürününün kullanılmamış serileri tekrar sterilite testine alındığında yine 1 tane kontaminasyona rastlanmış ancak bu kez farklı bir üründe üreme görülmüştür. Bu bakterilerin tiplendirmeleri yapıldığında farklı mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları dikkate alındığında, hastalara uygulanan parenteral ilaçlarda, sterilite testi uygulanırken yapılan ekim prosedürleri sırasında oluşan dıştan gelen kontaminasyonun bu işlemin bir parçası olduğu ve muhtemelen dominant faktör olduğu ortaya çıkmaktadır.

Sterilite test uygulamaları ve besiyeri oluşturma teknikleri ilaç sanayiinde başlıca gereklilikler olarak bilinmektedir. Konuyla ilgili 1988-1995 yılları arasındaki sekiz yıllık sürede Hollanda da bulunan üç büyük ilaç üretim işletmesi, sterilite testlerinin performansını, besiyeri oluşturulmasını ve bunlar arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak değerlendirmiştir. 1988- 1991 yılları arasında yapılan çalışmalarla 1992- 1995 yılları arasında yapılan çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar ve üstünlükler olduğu tespit edilmiştir. Çünkü 1991 yılından itibaren yapılan üretim proseslerinde ve sterilite testlerinde önemli ölçüde değişiklikler olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre sterilite testlerinin sonuçları incelendiğinde yanlış pozitiflik veren testlerde önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Yanlış pozitiflerin toplam oranı % 0,17 olarak belirtilmiştir. Bu koşullarda sterilite testine alınan bir ürünün yanlış pozitiflik riski göz önüne alınarak, testlerin, ürünlerin açılmamış serileriyle, uygun koşullarda yeniden tekrarlanması gerekliliği gündeme gelmektedir (VanDoorne ve ark., 1998).

Yaptığımız çalışma sonucunda izole edilen bakterilerin, sterilite testinden kaynaklanabilecek yanlış pozitiflik sonuçlarına karşı testler, ürünlerin kontrol amaçlı saklanan açılmamış aynı seriye ait örnekleri ile tekrarlanmıştır. Tekrarlanan sterilite testleri sonucunda kontaminasyona rastlanan ürünlerde aynı bulgular elde edilmiştir. 4 adet yağlı emülsiyondan izole edilen *Bacillus brevis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinin ve 1 adet yağ içermeyen preparattan izole edilen *Bacillus polymyxa*'nın Uçarlar ve ark.,'nın 2001 yılında ilaç üretim fabrikasında yapmış oldukları çalışmada da belirtildiği gibi, kontaminasyon kaynaklarının üretimin yapıldığı

odanın havasından, ortamdan ve kullanılan ekipmandan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

1970' li yıllarda kullanıma giren intravenöz infüzyon solüsyonları; sıvı, elektrolit, kan ürünleri, ilaç ve beslenme desteğini sağlamak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu solüsyonlarda steril olma koşulu ile ilgili yeterli özenin gösterilmediği yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. İntravenöz solüsyonlar; total parenteral beslenme solüsyonları, ufak hacimli parenteral ilaçlar, büyük hacimli parenteral ilaçlar, kardiyoplejik solüsyonlar, tek dozluk enjeksiyonlar ve oftalmik solüsyonlar olarak bilinmektedir (Somer, 2007).

İntravenöz infüzyon solüsyonları, iki kategoride değerlendirmeye alınmaktadır. İlk kategoride; hastanelerde aseptik koşullarda hazırlanarak kullanılan intravenöz infüzyon solüsyonları olup, yaklaşık 50' ye yakın maddeden oluşabilir ve 10'dan fazla farklı solüsyonun karışımını gerektirir. İkinci kategori ise; kontaminasyona izin vermeyecek şekilde aseptik koşullarda üretici tarafından üretilerek, kapalı sistem transfer ile steril olarak hastaya sunulan ürünlerdir. Bu ürünler, tek hasta için hazırlanmış, saklanmayacak ilaçlar veya birden fazla hasta için hazırlanmış, koruyucu madde ve katkı maddesi içeren seri ürünler olarak gruplandırılabilir (Somer, 2007).

İntravenöz infüzyon solüsyonları, üretim aşamasında oluşan (intrensek) veya ürünün hazırlanma ve hastaya verilme aşamasında oluşan kontaminasyon (ekstrensek) şeklinde 2 çeşit kontaminasyona maruz kalabilmektedir. Hastanede kullanılan i.v. sıvılardaki kültür çalışmaları, kontaminasyon oranının % 1- 2 olduğunu göstermektedir. Klinikte bildirilen infüzyona bağlı kontaminasyon oranları üçü bir arada solüsyonlarda (karbonhidrat, protein ve yağ) % 2- 4 olarak belirlenmiştir (Somer, 2007).

Rawal ve Nahata (1985)' nin intravenöz solüsyonlarla yaptıkları bir çalışmada; solüsyonların genellikle patojen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis* ve *Candida albicans* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. İ.v. solüsyonların hazırlanmasında kullanılan, glikoz, aminoasit, vitamin ve lipit gibi bileşenlerin birbirinden bağımsız solüsyonlar şeklinde hastalara uygulandığı dikkate

alınarak bu solüsyonlar, membran filtrasyon yöntemiyle mikrobiyal kontaminasyon açısından incelemeye alınmıştır. Sözü geçen bakterilerin bu bileşenlerde büyüme gösterdikleri tespit edilmiştir. Bunlardan, % 5 dekstroz, % 0,9 sodyum klorür ve laktat ringer solüsyonunda (sodyum, klorür, kalsiyum, potasyum ve laktat) yapılan incelemeler sonucunda, *Candida albicans*, *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* büyümesi gözlenmiş ancak, aminoasit solüsyonlarında *C.albicans*, *S.aureus* ve *E.coli* büyüme gösterirken *Pseudomonas aeruginosa*' ya rastlanmamıştır. İntravenöz solüsyonları oluşturan farklı içeriklerden alınan örneklerde mikrobiyal gelişim gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Parenteral infüzyon solüsyonları, çeşitli katkı maddeleri içermesi özelliğinden dolayı, kontaminasyon sonucu oluşmuş bakteri ve mantarların gelişmeleri için elverişli bir ortam oluşturmaktadırlar. Lipit içerikli solüsyonlar, mikroorganizmaların üremesi açısından en uygun solüsyonlar olarak tespit edilmiştir (Somer, 2007).

D'Arcy ve Woodside, (1973) tarafından yapılan bir çalışmada; 61 tanesi katkı maddesi içeren, 101 adet intravenöz sıvı örneği, incelenmek üzere hastaneden alınmıştır. İncelemeler sonucunda katkı maddesi içeren 61 numuneden 34 tanesinde (%55,7) kontaminasyona rastlanırken, katkı maddesi içermeyen 40 örnekten 5 tanesinde (%12,5) mikroorganizma saptanmıştır. Sonuçta; ilaçlar içinde bulunan çeşitli katkı maddelerinin kontaminasyon için bir risk oluşturduğu görülmektedir. Ancak diğer taraftan katkı maddesi içermeyen ürünlerde de üreme gözlenmesi üretim tekniklerinde eksiklikler olduğu konusunu gündeme getirmiştir.

Maki ve Martin., (1974) ' nin yapmış olduğu bir çalışmada; 94 infüzyon çözeltisi mikrobiyolojik açıdan incelemeye alınmış ve bu seriden 10 tanesinin (%11) mikrobiyal kontaminant taşıdığı saptanmıştır. Üreme olan 10 örneğin 8' inden *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus*, 2'sinden *Klebsiella pneumoniae* izole edilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* ile kontamine olmuş infüzyon sıvısının membran filtrasyon sonuçları ise; kontaminasyon seviyesinin ml' de 30 mikroorganizmadan fazla olduğunu göstermiştir.

Yapılan deneysel çalışmaların sonucunda, intravenöz yağlı emülsiyonların mikrobiyal büyümeyi desteklediği ve bakteriyel

mikroorganizmaların besleyici lipit ve emülsiyon içeren tüm parenteral solüsyonlarda büyüme gösterdiği saptanmıştır (Gilbert ve ark., 1986; Rowe ve ark., 1987; Arduino ve ark., 1991; Berry ve ark., 1993).

Yoğun bakımlarda sedasyon ve anestezi için sıklıkla kullanılan emülsiyon preparatlarındaki mikrobiyolojik kontaminasyonların, lipitlerin mikroorganizmaları çoğaltıcı etkisi de göz önünde bulundurulduğunda çok ciddi sonuçlar oluşturduğu görülmüştür (McLeod ve ark.,1991).

Emülsiyonlarda mikrobiyal büyümenin daha kolay olabileceği yaptığımız çalışmada da tespit edilmiş olup, kontamine parenteral preparatların kullanımından doğabilecek sonuçların hayvan sağlığına ve dolayısıyla da insan sağlığına çok büyük zararlar getirebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda da, 23 tanesi yağ ve vitamin içeren, 27 tanesi yağsız ve suda eriyen vitamin içeren 50 parenteral preparat incelenmiştir. Bunların sterilite test sonuçlarına bakıldığında kontaminasyon oluşmuş 5 üründen 4 tanesinde görülen kontaminasyonun yağlı preparatlarda, 1 tanesinde oluşan kontaminasyonun ise suda eriyen vitamin içeren preparatta olduğu saptanmıştır.

Standart total parenteral nutrisyonlarla yapılan çalışmalarda, yağ metabolitlerinin mevcut olmadığı formlarda kontaminasyon sonucu oluşan mikroorganizma sayısı az gözlenirken, yağ eklenerek üretilen total parenteral nutrisyon (TPN) solüsyonlarında mikrobiyal büyümeyi destekleme oranının arttığı saptanmıştır. Bu sebepten dolayı, parenteral nutrisyon solüsyonları hastalara uygulanırken mikrobiyal büyümenin görülme olasılığının düşünülerek hareket edilmesi gerekmektedir (Scheckelhoff ve ark., 1986; D'Angio ve ark., 1987).

Lawrance ve ark., (1988); 196 TPN preparatını piyasaya verilme aşamasında mikrobiyolojik açıdan değerlendirmeye almışlardır. Yapılan incelemeler sonucunda, 9' unda mikrobiyal kontaminasyona rastlanmıştır. Bunlardan 5 tanesinde (%2,6) koagulaz negatif Gram pozitif kokların meydana getirdiği kontaminasyon tespit edilirken, diğer 4'ünde, *E.coli* ve *Candida albicans'* a rastlanmıştır. Mikrobiyal büyüme göstermiş olan tüm ürünlerde 72 saatlik bir inkübasyon periyodundan sonra bu büyüme ve

gelişme gözlenebilmektedir. Büyümenin en iyi gözlemlendiği formülasyonlar ise lipit içerenler olarak tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamız da, Lawrance ve ark.,' nın yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak, mikrobiyal kontaminasyon oluşmuş 5 üründen yağ içeren 4 tanesinde, 72 saatlik bir inkübasyon periyodundan sonra üreme sonucunda besiyerlerinde oluşan bulanıklık gözlenmeye başlanmıştır.

1990'lı yıllarda Amerika Birleşik Devletlerinde lipit bazlı anestezi ajanı olan propofole bağlı çok sayıda nozokomiyal sepsis vakasının saptanması üzerine infüzyona bağlı enfeksiyonlar dikkatleri çekmiştir. O zamanlar koruyucu içermeyen bu ürünün hazırlanmasında aseptik tekniklerdeki yetersizlikler sonucu mikrobiyal kontaminasyon geliştiği görülmüştür. Bu vakalardan izole edilen patojenler sıklıkla *Candida albicans*, *Moraxella osloensis*, *Enterobacter agglomerans* ve *Serratia marcescens* olarak bildirilmiştir (Somer, 2007).

Tessler ve ark., (1992)' nın yaptığı bir çalışmada; Propofol, 2,6 diizopropilfenil emülsiyon formülasyonunun, cerrahi müdahale geçirecek hastalarda kullanılması sonucunda, *S.aureus*, *Moraxella osloensis* ve *Candida albicans* tarafından oluşan enfeksiyonların görüldüğü bildirilmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Moraxella osloensis* ve *Escherichia coli* ile *Candida albicans* ' ın emülsiyon ilaçlar içinde olduğu takdirde oda sıcaklığında geliştiği gözlenmiştir. Sonuç olarak; propofolün adı geçen tüm bu organizmaların gelişimini desteklediği görülmüştür.

FDA tarafından yapılan araştırmada, 150 hastanın incelendiği bir grupta kontamine emülsiyon tipi preparatların kullanımına bağlı, 38 enfeksiyonun ortaya çıktığı ve 4 kişinin öldüğü bildirilmiştir. Buna paralel yürütülen çalışmalarda, ameliyat sonrası emülsiyon preparatı kullanmış olan 62 hastanın 13 tanesinde enfeksiyon gözlenmiş olup, bu enfeksiyonlara sebep olan bakteriler, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella osloensis*, *Candida albicans* ve *Enterobacter agglomerans* olarak tespit edilmiştir (Bennett ve ark., 1995).

Avrupa da yapılan bir araştırmada, *Klebsilla* enfeksiyonlarının büyük oranda kontamine olmuş emülsiyon tipi preparatlardan kaynaklandığı bildirilmiştir. Buna bağlı olarak ortaya çıkan nozokomiyal enfeksiyonlarının

mortaliteyi arttırdığı ve bunun sonucunda da hastane bakım masraflarının büyük oranda arttığı vurgulanmaktadır (Veber ve ark., 1994). Nozokomiyal enfeksiyonların, hastanın hastanede yatma gününe yaklaşık olarak 7-21 gün ilave ettiği saptanmıştır (Jarvis,1996). Bu nozokomiyal enfeksiyonlar ile bağlantılı yoğun bakım (YBÜ) hastalarında görülen aşırı ölüm oranlarına bakıldığında, enfeksiyona neden olan organizmalar arasında koagulaz (-) *Staphylococcus' un* %13,8 ve *Candida'* ların %38 oranında görüldüğü ve bunlardan kaynaklı ölüm oranlarının %28 civarında olduğu bildirilmiştir (Harbath ve Pittet,1996).

Hastalık Koruma ve Önleme Merkezi tarafından izlenmiş olan %10 ve %20' lik parenteral lipit emülsiyonlardaki mikroorganizmaların gelişmeleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir. İncelemeler sonucunda, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Flavobacterium spp.*, ve *Candida albicans*, ve 2 tane de *Staphylococcus saprophyticus* izole edilmiştir. Bunlar, parenteral lipit emülsiyonların üretimleri süresince muhtemel kontaminasyonlara sebep olan türler olarak bildirilmiştir (Didier ve ark., 1998).

Brezilya' nın Pernambuco şehrinde Şubat 2002 ile Mart 2002 tarihleri arasında 5 hastanede yapılan araştırmada, hastalara uygulanan damar içi çözeltilerinin içten ve dıştan gelen kontaminasyon olasılıkları ve bunlara karşı oluşan reaksiyonlardan doğan risk faktörleri açıklanmıştır. Yapılan bu çalışmada geçmişte incelenen çözeltilerde oluşmuş reaksiyonlar tanımlanmış, bakteriler için kültür ortamları oluşturulmuş ve endotoksin konsantrasyonları ölçülmüştür. Çalışmada, hastanede bulunan cerrahi müdahale geçirmiş ve ayakta tedavi edilen 355 hastaya damar içi çözeltiler uygulanmıştır. 28 kişinin (%8) kontamine olmuş damar içi çözeltilere maruz kaldıktan sonra 2,5 saat içinde hasta olduğu gözlenmiştir. 5 kişinin ise (%17,9) hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Bu ölümler sonucunda yapılan araştırmada % 8 oranında mikrobiyal kontaminasyona rastlanmış ve endotoksin konsantrasyonunun ortalama 88,3 (endotoksin birimi olarak EU/ml) ile çok yüksek olduğu görülmüştür. Bu değer, Brezilyadaki izin

verilen değer ile karşılaştırıldığında ( $< 0,5$  EU/ml) ok yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sonucunda cerrahi müdahale geçirmiş hastalarda çeşitli kanamalar gözlenirken, çoğu hastalarda kan nakli kontrollü olarak sağlanmasına rağmen beklenen etki görülememiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, parenteral solüsyonların, intrensek (retim kaynaklı) kontaminasyona maruz kaldıkları belirlenmiştir (Daufenbach ve ark., 2006).

FDA tarafından yayınlanan bir raporda, yurt çapında sterilite kontrollerinin yeterince iyi yapılmadığı konusuna dikkat çekilmiştir. Bu rapora göre, kontamine olmuş bazı parenteral ilaçların hastalar tarafından kullanılması sonucunda 2002 Kasım ayı içerisinde hastalardan 4' nde fungal menenjit tespit edilmiş ve bunun sonucunda 1 hastanın öldüğü bildirilmiştir. Yapılan testlerde ilaçlar içerisinde tespit edilen fungusun hastalarda tespit edilen ile aynı olduğu görülmüştür (Wachter, 2002).

Aslund ve ark., (1981) tarafından yapılan bir çalışmada, hayvan hastanelerinde kullanılan, göz damlaları, enjeksiyonluk solüsyonlar ve infüzyon sıvıları sterilite testine alınarak kontaminasyon kontrolleri yapılmıştır. İncelemeye alınan 100 örnekten % 17,5 oranında kontaminasyona rastlanmış olup, bu oranın % 62' sini kapsayan kısımdaki ilaçların veteriner kliniklerinde ayakta tedavi edilen hayvanlara uygulanmış olduğu tespit edilmiştir. Kontamine olmuş ilaç kullanımından kaynaklı enfeksiyonların, hayvanlar için bir risk oluşturduğu belirtilmiştir.

Bir başka çalışmada ise; büyük hayvan hastanelerinde, kk hayvan kliniklerinde ve veteriner kliniklerinde kullanılan çoklu doz veteriner parenteral preparatları, kontaminasyon kontrolleri yapılmak üzere incelenmeye alınmıştır (Sabino ve Weese, 2006). Sterilite testine alınan 88 örnekten 16 tanesinde kontaminasyona rastlanmıştır. Enjeksiyonluk zelti çeşidi olan çoklu doz preparatların kontaminasyonu potansiyel patojen mikroorganizma içermektedir. Bu sonuçlar ise nozokomiyal enfeksiyonların oluşmasında bir faktör olarak kabul edilmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız veteriner parenterallerin bazılarında da kontaminasyon tespit edilmiş olup bunların kullanımları sonucunda ortaya çıkabilecek enfeksiyonların hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyeceği açıktır.

Tüm bu sonuçlar değerlendirmeye alındığında, Türkiye' de üretilen veteriner enjektabl vitamin preparatlarının yeterli koşullarda üretilmediği ve gerekli kontrollerinin yapılmadığı konusu gündeme gelmiştir. Üretimde uyulması gereken kurallar zinciri olarak bilinen GMP ve Kalite Kontrolün doğru bir şekilde özümsemiş uygulanmaya konulması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen sonuçlarla, kontamine olmuş enjektabl preparat kullanımının, hayvan sağlığı için ciddi problemlere neden olabileceği düşüncesi benimsenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, 23 tanesi yağda eriyen vitamin içeren, 27 tanesi suda eriyen vitamin içeren 50 adet veteriner parenteral vitamin preparatı ile çalışılmıştır. Bu preparatların membran filtrasyon yöntemi ile sterilite kontrolleri yapılmış ve toplamda 5 adet preparatta kontaminasyon tespit edilmiştir. Bu kontaminasyonları oluşturan bakterilerden 1 tanesi *Bacillus polymyxa*, 2 tanesi *Bacillus brevis* ve diğer 2 tanesi de *Staphylococcus aureus* olarak tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışma ile veteriner parenteral vitamin preparatlarında önemli sayılacak düzeyde mikrobiyal kontaminasyonun var olduğu membran filtrasyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Sterilite koşullarına uymayan ve mikrobiyal kontaminasyonu olan veteriner ilaçların uygulanması sonrasında hayvan kayıplarının olması ihtimal dahilindedir. Ekonomik açıdan ciddi kayıplar oluşturması, bu konu üzerinde hassasiyetle durulması gerektiğini gündeme getirmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre alınacak önlemler sayesinde, ilaç uygulamalarına bağlı potansiyel risk faktörlerinin modifikasyonu söz konusu olabilecektir. Bu konuda ilaç üretimi yapan merkezlere koşullarını ve yöntemlerini valide etme görevi düşerken, konuyla ilgili devlet kurumlarının da kontrol ve denetimlerini sıklaştırması gerekliliği gündeme gelmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda, enjektabl veteriner ilaçların üretim aşamasında ve üretimi sonrasında dikkat edilmesi gereken kurallar zinciri gözden geçirilmiştir. Tarihsel bir sırayla günümüzde kullandığımız yöntemlerin gelişimi literatür örnekleriyle tanımlanmıştır. Mevcut tanımlanmış kurallara rağmen, mikrobiyolojik kontaminasyonun oluşabileceği, bu nedenle üretim aşamasında titiz davranılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Gelecekte yapılacak bilimsel çalışmalarla sterilizasyon koşullarının daha da mükemmel yaklaşması ilerleyen süreçte gündeme gelebilecektir. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlar doğrultusunda, hayvan sağlığı açısından güvenli yöntemlerin tanımlanması söz konusu olabilecektir. Ayrıca mikrobiyal kontaminasyonun tanımlanması amacıyla daha ileri tekniklerin

gelişmesi, bugün negatif olarak tespit edilen sonuçların daha sensitif halde tanımlanması olanağını beraberinde getirecektir.

## ÖZET

### **Türkiye’ de Üretilen Veteriner Enjektabl Vitamin Preparatlarının Mikrobiyolojik Kalite Kontrolleri**

Çalışmamızda Türkiye’ de üretilen ve çeşitli ecza depolarından temin edilen veteriner enjektabl vitamin preparatlarının, sterilite kontrol yöntemlerinden biri olan membran filtrasyon tekniği ile mikrobiyolojik kalite kontrol açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 23 tanesi yağda, 27 tanesi suda eriyen 50 adet veteriner enjektabl vitamin preparatı ile çalışılmıştır. Toplamda çalışılan enjektabl preparatlardan 5 tanesinde üreme gözlenmiş olup, üreme görülen ürünlerdeki mikroorganizmalar Gram boyama ve biyokimyasal testler ile isimlendirilmiştir.

Bu mikroorganizmalar; *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis* ve *Staphylococcus aureus*’ tur. İlaçlarda kontaminasyona sebep olan bu bakterilerin, üretim sırasında, havadan, üretim alanından, ekipman ve personelden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda; steril olması gereken enjektabl veteriner ilaçlarda oluşan üremeler dikkate alınarak Türkiye’ de üretilen veteriner enjektabl vitamin preparatlarının üretiminde, gerekli teknik kullanımın yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Sterilite testi, membran filtrasyon yöntemi, kontaminasyon, parenteral preparat, veteriner ilaç.

## SUMMARY

### **Microbiological Quality Control of the Veterinary Injectable Vitamin Preparations Manufactured in Turkey**

Our study aimed to examining the veterinary injectable vitamin preparations, which were manufactured in Turkey and procured from various drug depots, from the point of microbiological quality control via the membrane filtration technique, which is one of the sterility control methods.

A total of 50 veterinary injectable vitamin preparations, 23 of which were fat-soluble and 27 of which were water-soluble, were studied. Reproduction was observed in 5 of the total injectable preparations studied and the microorganisms in the products, where reproduction was observed, were named with Gram staining method and biochemical tests.

These microorganisms are *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis* and *Staphylococcus aureus*'. It was believed that these bacteria, which caused contamination in the drugs, might be originated from the air, the manufacturing area, the equipment and the staff during the manufacturing processes.

As a result of our study; taking into consideration the reproduction formed in the veterinary injectable preparations, which should be sterile, it was concluded that the usage of the required techniques in the manufacturing of the veterinary injectable vitamin preparations in Turkey is not adequate.

**Key Words:** Sterility Test, membrane filtration method, contamination, parenteral preparation, veterinary medicine.

## KAYNAKLAR

- AGALLOCO, J. (2005). Importance of background microbial levels in the manufacture and testing of sterile products. *Pharmaceutical Technology*. p: 74-78
- AKERS. M.J., WRIGHT. G.E., CARLSON. K.A. (1991). Sterility testing of antimicrobial containing injectable solutions prepared in the pharmacy. *American Journal of Hospital Pharmacy*. Vol 48, Issue 11, 2414-2418.
- AKERS, E.J., (1992) .PDA Response FDA Proposal to Amend cGMP' s Entitled Use of Aseptic Processing and Terminal Sterilization in the Preparation of Sterile Pharmaceuticals for Human and Veterinary Use. *PDA Section 211.113*
- AKGÜN, A.F., YILDIZ, H., ERGÜN, A., BOSTAN, N., BODUR, N., SAYGI, N., AYDIN, N., BÜYÜKKAYA, F., HASGÜL, E. (22.02.2000). Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü. *Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi*.
- AKKAN. A.G., EŞKAZAN. E. (1999). Vitaminler. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı ilaç Kullanımı Sempozyumu, İstanbul*, s. 45-57
- APTEC. (2006). Sterility Testing Methods. *Guidelines to Sterility Testing for Biologics*.
- APVMA. (2006). Guidelines for the Generation of Storage Stability Data of Veterinary Chemical Products. Veterinary Guideline. *Avusturalian Pesticides & Veterinary Medicines Authority* no: 68 , version 2 p:12,14.
- ARDUINO, M.J., BLAND, L.A., MCALLISTER, S.K. (1991). Microbial growth and endotoxin production in the intravenous anesthetic propofol. *International Anesthesia Research Society Anesthesia & Analgesia* Vol 12 :535-539.
- ASHP (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS). (2005). Microbial Contamination Rates for USP Compounding. *Am J Health-Syst Pharm.* **62** (3): 285-288.
- ASLUND, B., OLSON, O.T., OLSSON, E., WIERUP, M. (1981). Studies on in-use microbial contamination of sterile medicines at an animal hospital. *Nord. Vet Med.* 33 (4-5): 194-198.
- AULTON, M.E. (2002). Pharmaceutical Microbiology. Microbiological Techniques. *Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design* 2nd Ed. p: 638- 641
- AVMA. (2006). Veterinary Compounding. *American Veterinary Medical Association*, Erişim:[[http://www.avma.org/issues/drugs/compounding/veterinary\\_compounding\\_brochure.asp#fda](http://www.avma.org/issues/drugs/compounding/veterinary_compounding_brochure.asp#fda)]. Erişim Tarihi: 28.05.2007
- BASU, S., PAL, A., DESAI, P.K. (2005). Quality Control of Culture Media in a Microbiology Laboratory. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **23** (3):159-163

- BATHGATE, H., LAZZARI, D., CAMERON, H., MCKAY, D. (1993). The incubation period in sterility testing. *J Parenter Sci Technol.*; **47**(5) :254-257.
- BATRA, T.R, SINGH, K., HIDIROGLU, M. (1991). Concentration of plasma and milk vitamin E and plasma  $\beta$ -carotene of mastitic and healthy cows. *J Vit Nutr Res*, 62, 233-237.
- BENNETT, S.N., MICHAEL, M.D., MCNEIL,M., LEE, A.B., MATTHEW, J.A., VILLARINO, M.E., ELSA, M.D., DENNIS, M., PERROTTA, PH.D., BURWEN, D.R., WELBEL, S.F., PEGUES, D.A., LEONARDO, S., ZEITZ, P.S., JARVÍS, W.R. (1995). Postoperative Infections Traced to Contamination of an Intravenous Anesthetic, Propofol. *New England Journal of Medicine*. Volume 333: Number 3. p:147-154,
- BERNICK, J.J., BROWN, D.G., BELL, J.E. (Nov). Adventitious contamination of intravenous admixtures during sterility testing. *Am J Hosp Pharm.* **36** (11):1493-1496.
- BERRY, C. B., GILLESPIE,T., HOOD,J. N., SCOTT, B. (1993). Growth of micro-organisms in solutions of intravenous anaesthetic agents. *Anaesthesia.* **48**:(1), p:30–32.
- BHATTI, W., ENZ., S., OCKERMAN, A., WICHMAN, K. (2006). Sterile Products Preparation and Non-Sterile Compounding. *RX422 – Advanced Dosage Forms,Lectures & Laboratories Schedules.*
- BIORELIANCE. (2006). The regulatory authorities require biosafety testing of biologics and biopharmaceuticals for mycoplasma, bacterial and fungal contamination. Principle Sterility Testing Methods. *Invitrogen bioservices 20th Annual Genetic and Molecular Toxicology Workshop.*
- BİLGEHAN., (2002). Dış ortamın mikroorganizmalar üzerine etkisi. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. s:189*
- BİLGEHAN, H., (2004). Sterilleme için hazırlık uygulamada sterilleme yöntemlerinin seçilmesi, *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, 4. Baskı, Bölüm 2: s; 36-37.
- BİLGEHAN, H. (2004). Besiyerlerinin sterillenmesi, *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, 4. Baskı, Bölüm 5: s; 104.
- BOYLAN, J.C. (1983). Essential elements of quality control. *Am J Hosp Pharm.* **40** (11): 1936- 1939.
- BP. (2004). Test for Sterility. *British Pharmacopiea*. Vol 1 Appendix XVI A.p: 139.
- BUGNO, A., PINTO, T.J. (2002a). Comparative study between culture media employed in sterility test. *Boll Chim Farm.*; **141**(5):367-371
- BUGNO, A., PINTO, T.J. (2002b). Incubation time in sterility tests for pharmaceutical products. *Boll Chim Farm.* **141**(6): 453-456.
- BUGNO, A., PINTO, T.J. (2002c). Incubation time in sterility tests for pharmaceutical products. *Boll Chim Farm.* **141**(6):453-456

- BURGESS, D.J., HUSSAIN, A.S., INGALLINERA, T.S., CHEN, M.L. (2002). Assuring Quality and Performance of Sustained and Controlled Release Parenterals: Workshop Report. *AAPS Pharm. Sci.*; 4(2): article 7. DOI: 10.1208/ps040207
- CBER. (2004). Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice. *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research Pharmaceutical CGMPs* .
- CDER. (1993). Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Recommendations for Submitting Documentation for Sterilization Process Validation and Applications for Human and Veterinary Drug Products. p:8
- CFR, (1998). Sterility Test methods and procedures. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services . *Code of Federal Regulations*. Title 21, Volume 5, parts 300 to 499. p: 353-357.
- CFR, (2006). General biological products standards. Sterility. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services . *Code of Federal Regulations*. Title 21, Volume 7, 610.12.
- CHRISTIANSON, G.G., LEVINGS, R.L. (1999). Head Cytology and Sterility Section. Testing Protocol. *Center for Veterinary Biologics (CBER) and National Veterinary Services Laboratories, (NVSL)*.
- CLONGEN Laboratories, LLC. (2003). Sterility Assurance Testing. Erişim: [[http://www.clongen.com/sterility\\_assurance\\_testing.htm](http://www.clongen.com/sterility_assurance_testing.htm)]. Erişim Tarihi: 25.04.2006.
- COONEY, P.H., KUMKUMIAN, C., ROGER, L., WILLIAMS, M.D. MARNANE, W.G. (2007). Guidance for Industry: Submission Documentation for Sterilization Process Validation in Applications for Human and Veterinary Drug Products. Sterility Testing Methods and Release Criteria, *U.S. Food and Drug Administration*. Erişim: [<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/cmc2.htm>]. Erişim Tarihi: 5 Feb 2007.
- CUMMINS, K.A., BRUNNER, C.J. (1990). Dietary Ascorbate and Stress Effects on Plasma Ascorbate, Dehydroascorbate, and Immune Development in Calves in Ascorbic Acid in Domestic Animals, Ed: WENK, L., FENSTER, R., VOLKER, L. *Proceedings of the 2nd Symposium Kartause Ittingen*, 9th-12th October, Switzerland.
- CVM., (1993). Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Recommendations for Submitting Documentation for Sterilization Process Validation and Applications for Human and Veterinary Drug Products. p:8
- CVM. (2000). Program Policy and Procedures Manual Guide 1240.4122 General Procedural Notices Responsible. *Center for Veterinary Medicine Office: HFV-100*. Center for Veterinary Medicine Program Policy and Procedures Manual Guide. (04.25.2000). Responsible. Sterility and pyrogen Requirements for injectable products. General Procedural Notices 1240.4122.

- ÇİNGİ, İ.M., EROL, K. (1996). İlaçların uygulama yerleri. Farmakoloji. *T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları*. No: 494. Ed: ERDOĞAN. M. Açıköğretim Fakültesi Yayınları No: 223. Ders Kitapları Yayın No: 108 / F.
- D'ANGIO, R., QUERCIA, R.A., TREIBER, N.K., MCLAUGHLIN, J.C., KLIMEK, J.J. (1987). The growth of microorganisms in total parenteral nutrition admixtures. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*;11(4):394-397.
- D'ARCY, P.F., WOODSIDE, W. (1973). Drug additives: a potential source of bacterial contamination of infusion fluids. *Lancet*. 2(7820):96.
- DAUFENBACH, L.Z., ALVES, W.A., AZEVEDO, J. B. DE., ARDUINO, M.,J., FORSTER, T.S., CARMO, E.H., HATCH, D. L. (2006). Pyrogenic Reactions and Hemorrhage Associated With Intrinsic Exposure to Endotoxin-Contaminated Intravenous Solutions. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. vol. 27, no. 7
- DEMİREL, Ö. (1999). İlaç Sanayiinde Temiz oda Dizaynı ve Temiz oda Sınıfı ile Mikroorganizma Sayısı Arasındaki İlişkiler. *IV. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi ve Sergisi*. Erişim: (<http://www.teskon.mmo.org.tr/bildiri/1999-50.pdf>). Erişim Tarihi: 2007
- DIDIER, M.E., FISCHER, S., MAKI, D.G. (1998). Total nutrient admixtures appear safer than lipid emulsion alone as regards microbial contamination: growth properties of microbial pathogens at room temperature. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 22(5):291-296.
- DORTUNÇ, B., GÜRSOY, A. (2004). Kontaminasyon ve Sterilizasyon. *Farmasötik Teknoloji. Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları*. Ed.: A.Z. Gürsoy. No: 2. Bölüm 8. s: 101- 104.
- EMEA. (2006). Guideline on Parametric Release. *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)*. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections.
- EP. (2000). Biological Tests , Sterility . *European Pharmacopoeia Supplement*. Chapter: 2.6.1. p: 46.
- ERATA, Y.K., GÜÇLÜ, S., (2003). Vitamin Desteği. *Perinatoloji Dergisi*. 11(1- 2):13-19. Erişim:[<http://www.perinatology.org.tr/dergi/fulltext/20031/tmetin3.htm>]. Erişim Tarihi:01.12.2004
- ERTÜRK, N. (2006). Vitaminler ve Kullanımları. Erişim:[<http://www.guvercinler.info/icerik/179/Ulkemizde-Guvercinler.html>]. Erişim Tarihi:18 Şubat.2007
- ENTR., (EUROPEAN COMMISSION)., (2001). Working Party on Control of Medicines and Inspections. Good Manufacturing Practice. *Enterprise Directorate*. Annex 17.

- FDA (1987). Guideline for submitting documentation for the manufacture of and controls for drug products. *Center for Drugs and Biologics. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services.*
- FDA (2004). Guidance for Industry Quality Systems Approach to Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practice Regulations. Pharmaceutical cGMPs.
- FRY, M. E, (1996). PDA Comments USP<71> Sterility Tests *Pharmaceutical Forum*. Volume 21, Number 3, p. 595-609
- GALSON, S.K. (2003). Providing Cleanroom Certification, ASHRAE 110 Testing, Cleanroom Equipment Calibration, Cleanroom Decontamination, USP 797 Solutions, Environmental Monitoring and Qualification Services. *Center for Drug Evaluation and Research (CDER) U.S. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services.*
- GARDNER, T., CATIZONE, C.A., RENGANATHAN, M.S. (2003). Published to promote voluntary compliance of pharmacy and drug law. Emergency Compounding Regulation Change. *Arkansas State Board of Pharmacy*. Vol.5 No.1
- GILBERT, M., GALLAGHER, S.C., EADS, M., ELMORE, M.F. (1986). Microbial growth patterns in a total parenteral nutrition formulation containing lipid emulsion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*; **10** (5):494- 497.
- GLP. (1999). Özel Veteriner Laboratuvarları Yönetmeliği Yetki Kanunu, Yayımlandığı Resmi Gazete. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü*. 23821-madde- 21.
- GUIDEVET L.D.A., (2005). Policy on limulus amoebocyte lysate (LAL) Test. *Man Vet Reg Section Release*. p: 1 of 6
- HARBATH, S., PITTET, D. (1996). Excess mortality and impact of intensive care unit-acquired infections. *Current Opinion in Anaesthesiology*; 9:139-145.
- HOFFMAN, K.H., SMITH, F.M., GODWIN, H.N., HOGAN, L.C., FURTADO, D. (1982). Evaluation of three methods for detecting bacterial contamination in intravenous solutions. *Am J Hosp Pharm.*; **39** (8):1299-302.
- HUNTER, A.J. (1996). End-line filtration of lipid emulsions used in intravenous therapy. *Presented at the Parenteral Drug Association Congress.*
- İÇİN, S. (2006). İyi İmalat Uygulaması. Erişim: [<http://www.bornova.vet.gov.tr/GMP.ppt>]. Erişim Tarihi: 2007
- İMİK, H., AYTAÇ, M., COŞKUN, B., FİDANCI H. (2000). Strese maruz bırakılan Ankara Keçisi Oğlaklarında E ve C Vitaminlerinin Büyüme ve İmmünite Üzerine Etkileri. *Türk J Vet Anim Scin* **24**: 51–58.
- İSPENÇİYARİ VE TIBBİ MÜSTAHZARLAR İMALATHANELER YÖNETMELİĞİ., (1984). *Resmi Gazete Yayım Tarihi: 1 Kasım 1984 - SAYI:18562*. Erişim: [<http://www.ikev.org/docs/tr/ispen%C3%A7iyari.htm>]. Erişim Tarihi: 20.06.2007.

- JARVIS, W.R.(1996). Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost and prevention. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. **17** (8):552-557.
- KALKAN, Y. (2006). Canlılarda Beslenme ve Beslenme Yetersizlikleri. *Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Erzurum 1.B.A.V. Toplantısı*. Erişim: [<http://stu.inonu.edu.tr/~hcavdar/bgrubu.html>]. Erişim tarihi: 9 ocak 2007.
- KASTANGO. E.S., DOUGLASS. K. (2001). Quality Assurance for Sterile Products. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. Vol. 5 No. 4
- KENTER, M.H. (2003). Temiz ve Steril Alanları Planlama Kriterleri. *VI. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi ve Sergisi*.
- KUPIEC, T.C. (2005). Quality-Control Analytical Methods: Microbial Testing Aspects of USP <797> for Compounded Sterile Preparations. Sterile Preparations. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. Vol: 9 No: 1 p: 47-49.
- LAMBERT, J. (2003). Good Manufacturing Practices Guidelines. *Health Products and Food Branch Inspectorate*. Version 2.
- LAWRENCE, J., TURNER, M., GILBERT, P. (1988). Microbial contamination and growth in total parenteral nutrition solutions. *J Clin Pharm Ther*. **13** (2):151-157.
- LEHNINGER, A.L. (1988) Biochemistry Vitamins. *New York Worth Puplichers Inc*. s:80
- LONGFIELD, J.N., CHARACHE, P., DIAMOND, E.L., TOWNSEND, T.R. (1982). Comparison of broth and filtration methods for culturing of intravenous fluids. *Infect Control*. **3** (5).p:397-400.
- MAKI, D.G., MARTIN, W.T. (1974). Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated infusion products. IV. Growth of microbial pathogens in fluids for intravenous infusions. *J Infect Dis*. **131** (3):267- 272.
- MARNANE, W.G.(2007). Sterility Testing Methods and Release Criteria Medicine Center for Veterinary. Erişim: [<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/cmc2.htm>]. Erişim Tarihi: 5 Feb 2007.
- MARTINO, T.K., HERNANDEZ, J.M., BELDARRAIN, T., MELO, L. (1998). Identification of bacteria in water for pharmaceutical use. *Rev. Latinoam Microbiol*. **40** (3-4): 142-150.
- MCGUIRE, J., KUPIEC, T.C. (2007). Quality Control Analytical Methods: The Quality of Sterility Testing. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. Vol:11 No.1 p: 52- 55.

- MCKINNON, B.T., AVIS, K.E. (1993). Membrane filtration of pharmaceutical solutions. *Am J Hosp Pharm.* **50** (9):1921-36
- MCLEOD, N.P., INGLIS, M.D. (1991). Bacterial growth in propofol. *British J Anaesthesia.* 67: 665- 666.
- MO BIO, Laboratories Inc. (2006). Test Methods. Erişim: [[www.mobio.com/services-view.php?id=8](http://www.mobio.com/services-view.php?id=8) ]. Erişim Tarihi: 2006
- MOLDENHAUER, J., SUTTON, Scott VW , (2004). Towards an Improved Sterility Test. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Techonology.* Vol.58, No. 6,
- MOTISE, P.J. (1999). Human Drug CGMP Notes are issued by the FDA Division of Manufacturing and Product Quality, Office of Compliance. *Center for Drug Evaluation and Research.* Volume 7. Number 2
- NMAC. (2005). Minimum equipment and accessory standards: Parenteral Pharmaceuticals. New Mexico Register. Volume XV, Number 24, December 30,. This is an amendment to 16.19.6.11, effective January 15, 2005. Erişim: [<http://www.nmcpr.state.nm.us/nmregister/xv/xv24/16.19.6amend.htm> ].Erişim Tarihi: 27 Feb 2007
- OIE, S., KAMIYA, A. (2005). Particulate and Microbial Contamination in In-Use Admixed Parenteral Nutrition Solutions. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(12) 2268—2270
- OLSON. W.P., GROVES. M.J., (1990). Sterility Testing. *Aseptic Pharmaceutical Manufacturing Technology for the 1990s.* Hyland Therapeutics, Los Angeles ,CA,USA-12 ,319
- PDA. (2000). Sterile Products of the Good Manufacturing Practices Guideline. *Therapeutic Products Programme ,Canada.* Section: C.02.029.
- POSEY, L.M., NUTT, R.E., THOMSON, P.D. (1981). Comparison of two methods for detecting microbial contamination in intravenous fluids. *Am J Hosp Pharm.* **38** (5):p:659-662.
- QUELAB, Laboratories Inc. (2001). Tryptic Soy Broth. TSB Broth is a liquid general purpose medium for the cultivation of non-fastidious and fastidious microorganisms with addition of some enrichments. *Technical Data of Diagnostic Products.* Erişim :[<http://www.quelab.com/htmleng/2341a.html>] Erişim Tarihi: 1 feb.2007.
- QUELAB, Laboratories Inc. (2000). Mueller Hinton Agar. . Technical Data of Diagnostic Products. Technical Data #1247a. Erişim: [<http://www.quelab.com/htmleng/1247a.html> ]. Erişim Tarihi: 1 feb.2007
- RANDOLPH, V. (1997). Mt 301 laboratory mathematics, *University of Alabama at Birmingham.* Erişim: [[http:// www.uab.edu/clabsc/formulas.htm](http://www.uab.edu/clabsc/formulas.htm)]. Erişim Tarihi: 08.05.2007.

- RAWAL, B.D., NAHATA, M.C. (1985). Variation in microbial survival and growth in intravenous fluids. *Chemotherapy*. 31 (4). 318-323.
- ROWE, C.E., FUKUYAMA, T.T., MARTINOFF, J.T. (1987). Growth of microorganisms in total nutrient admixtures. *Drug Intell Clin Pharm.*;21(7-8):633-638.
- SABINO, C.V., WEESE, J.S. (2006). Contamination of multiple-dose vials in a veterinary hospital. *Can. Vet J.* 47(8): 779-782.
- SAĞLIK BAKANLIĞI. (1994). Farmasötik Ürünlerin İyi İmalat Uygulamalarına İlişkin Kılavuz. *İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü ANKARA* Konu:3.03.1994 BAKANLIK MAKAMINA. Sayı: 1505.
- SAĞLIK BAKANLIĞI (2004). Beşeri Tıbbi Ürünler İmalathaneleri Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. 30 Haziran 2004 Tarihli Resmi Gazete Sayı: 25508
- SCHECKELHOFF, D.J., MIRTALLO, J.M., AYERS, L.W., VISCONTI, J.A. (1986). Growth of bacteria and fungi in total nutrient admixtures. *Am J Hosp Pharm.* 43(1):73-77.
- SEYFARTH, V.H. (1985). Microbiological in-process control in drug manufacture. *Arzneimittelforschung*. 35(1A). p:205-216.
- SMITH. P., (2005). Contamination focus on the risks. *The European Journal of Contamination Control* ,
- SOMER, A. (2007). TPN İlaç ve diğer solüsyonların hazırlanmasında DAS uygulamaları. 5. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*.
- SÜZER, Ö., (2006). Farmakolojiye giriş, İlaçların şekilleri ve uygulama yolları. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi HETE-202 Farmakolji Ders Notları*. Erişim : [http://www.ctf.edu.tr/farma/onersuzer/pdf/koc/01\_Farmakolojiye\_giris.pdf]. Erişim Tarihi: 2 Ekim 2006.
- ŞEN, Y.L. (2002). Besiyeri Dolum Tekniğini Kullanarak Aseptik Dolum Proses Validasyonları. Eczacıbaşı İlaç San. ve Tic. A.Ş. Aseptik Alan Validasyonları Semineri, İSTANBUL HİLTON İKEV
- ŞİMŞEK, H., AKSAKAL, M. (2005). Subklinik mastitisli ineklerde kan ve sütte lipit peroksidasyon ve bazı antioksidanlar üzerine E vitamininin etkisi. *Ankara Üniv. Vet. Fak Derg.* 52: 71-76
- TESSLER, M., DASCAL, N., GIOSEFFINI, S., MILLER, M., MENDELSON, J. (1992). Growth curves of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Moraxella osloensis* in propofol and other media. *Canadian Journal of Anesthesia*. Vol 39, 509-511.

- TGA, (2006). Guidelines for Sterility Testing of Therapeutic Goods. *Australian Government Department of Health and Ageing Therapeutic Goods Administration* . p: 9-30
- TÖRECİ, K. (1990). Dezenfeksiyon Yöntemleri ve Seçimi. *ANKEM Dergi*. 4(No 3) 364-371
- UÇARLAR, S., DÖŞLER, S., ÖTÜK, G. (2001). İlaç sanayiinde sıklıkla izole edilen mikroorganizmaların tanımı ve bunların dezenfektan maddelere karşı duyarlılığının incelenmesi. *FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi*. 26(2): 73-80
- USP 27., (2004a). <797> Pharmaceutical Compounding –Sterile Preparations. *United States Pharmacopeia*. p:2350-2360
- USP 27., (2004b). <1207> Steril Product Packaging- Integrity Evaluation. *United States Pharmacopeia*. p:2612.
- USP 27., (2004c). <85>Bacterial endotoxins Tests. *United States Pharmacopeia*. p: 2169.
- USP 27., (2004d). <71> Sterility Test / Microbiological Tests. *United States Pharmacopeial*. p: 2157-2162
- VAN DOORNE H, VAN KAMPEN BJ, VAN DER LEE RW, RUMMENIE L, VAN DER VEEN AJ, DE VRIES WJ. (1998). Industrial manufacture of parenteral products in The Netherlands. A survey of eight years of media fills and sterility testing. *PDA J Pharm Sci Technol*. 52(4):159-164.
- VEBER, B. (1994). Severe sepsis after intravenous injection of contaminated propofol. *Anesthesiology*. 80: 712- 713.
- VETERİNER İSPENÇİYARI VE TIBBİ MÜSTAHZARLAR RUHSAT YÖNETMELİĞİ YETKİ KANUNU. (2002). Veteriner İlaçlarının Kontrolü ve İlgili Mevzuat Taşra Teşkilatı için Hizmet İçi Eğitim Programı 2002- R.gazete 23.10.2002/ 24915.
- VENTI, E.M., (2006). Dermatology Quality-Control Analytical Methods: Sterility Failure Investigations. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. Vol: 10. No: 5 p: 372-375.
- VERJANS, B. (2006) . Closed Vial Technology – A New Technology for Aseptic Filling of Injectable Drugs. *Commercial Director, Aseptic Technologies Drug Manufacturing & Supply*.
- YAZGÜNOĞLU, Y. (2002). Vitamin nedir?. *Bilkent Üniversitesi Sağlık Merkezi*. Erişim:[<http://www.bilkent.edu.tr/~bilheal/aykonu/AY2002/April2002/vitaturk.htm>]. Erişim Tarihi: 08.05.2007.
- YENİPAZAR, N. (2007). Steril farmasötik ilaçların imalatı. Erişim: (<http://www.geocities.com/SiliconValley/Campus/4400/steril.htm>). Erişim Tarihi: 09.04.2007

- WACHTER, K. (2002). Line of injectable drugs recalled due to possible contamination. *Urgent Care Pharmacy. OB/GYN News. International Medical News Group.*
- WACs. (1992). Pharmaceutical — parenteral products for nonhospitalized patients. *Washington State Legislature. Title 246. Chapter 246-871*
- WILSON, J.D., VARNEY, M. (1995). Sterility tests incubation issue. *PDA J Pharm Sci Technol. 49 (4) :157-9*
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). (2002). Steril Pharmaceutical Products. Basic Principles of GMP. Annex 6. TRS 902. Revised: 2006
- ZOLNER, W.J. (2006). Quality Control Analytical Methods: A Guide to Quality Control Testing for the Compounding Pharmacist Sterile Preparations. *International Journal of Pharmaceutical Compounding. Vol:10. No:4. p: 281-284.*

## ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Şükran ÖZTÜRK  
Ünvanı : Biyolog  
Doğum Tarihi : 14.08.1979  
Uyruk : T.C.  
Medeni Durumu : Evli  
Adres : Eston Blokları 8/9 2. Etap Eryaman /ANKARA  
Telefon : 0312 2810652  
GSM : 0505 6652387  
e-mail : sukranozturk79@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
  
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi  
Biyoloji Bölümü (2002)  
  
Yabancı Dil : İngilizce

### Proje/ Staj/ Seminer/ Çalışmalar

**Seminer:** Biyolojik Silahlar –Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı- 2006.