

FABAD Farm. Bil. Der.
15, 89-96, 1990

FABAD J. Pharm. Sci.
15,89-96, 1990

Parenteral Kullanımlı Serumların Mikrobiyolojik Kalite Kontrolleri Üzerinde Araştırma (**)

Ahmet AKIN (*)
Şenay GÜRCAN (**)

Özet: Araştırmamızda, değişik firma ve seri numaralarına sahip, 60 adet parenteral kullanımlı serum, mikrobiyolojik kalite kontrolü açısından ele alınmıştır.

Üremeler NaCl ve Dekstroz ihtiva eden serumlarda gözlenmiştir. Üreyen mikroorganizmalar *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* ve *Candida*'dır.

Üreme görülen numunelerden birinde hem küf hem de *Bacillus coagulans*, diğerinde ise *Micrococcus* ve *Bacillus subtilis* birarada izole edilmiştir. Bu durum böyle ilaçların mikroflorası açısından önemli bir bulgu olarak değer taşır. İncelenen örneklerin hiç birinde *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonelle* ve *Shigella* gibi patojen bakterilere rastlanılmamıştır.

EXAMINATION OF MICROBIOLOGICAL QUALITY CONTROL OF LARGE VOLUME PARENTERAL SOLUTIONS

Summary: In this study, 60 large volume paranteral which one producted serial numbers have been analized from the view of microbiological quality point.

Reproductions have been observed in the large volume paranteral which contain NaCl and Dextrose. These microorganisms are *Micrococcus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *Candida*.

Başvuru Tarihi: 27.3.1989

Kabul Tarihi: 9.7.1989

(*) A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Tandoğan-Ankara.

(**) Ankara Üniversitesi Araştırma Fonunca Desteklenmiştir.

Mold and B. coagulans have been observed in I sample, in the other samples Micrococcus and B. subtilis are isolated together. This situation has a value as an important finding from the view of microflora of such demedies. We have not countered any pathogen bacteria such a S. aureus, P. aeruginosa, E. coli, Salmonella and Shigella in the samples.

GİRİŞ

Günümüzde ilaçlar giderek artan oranda ilaç fabrikalarında üretilmekte, fabrikasyondan uzun bir süre sonra, büyük bir hasta kitlesi tarafından kullanılmaktadır. Bu durum ilaçların teknolojik ve mikrobiyolojik kalitelerinin iyi olmasını ve Good Manufacturing Practic (GMP) kurallarına uygun olarak üretilmesi zorunluluğu getirmektedir. Çünkü bu tür ilaçlar yukarıda da belirtildiği gibi oldukça fazla sayıda insan tarafından kullanılmaktadır. Majistral ilaçlar belirli bir reçeteye göre eczanelerde yapıldığı için, teknolojik ve mikrobiyolojik kalitelerinin iyi olmaması halinde, sadece o ilacı kullanan hasta için tehlike arz etmektedir. Oysa offisinal ilaçları kullanan hasta sayısının çokluğuna paralel olarak tehlike arzettiği insan sayısı da o oranda fazladır (1). Bu farmasötik formlar anabolizma ve doku rejenerasyonu için besleyici unsurlar yanında yüksek kalori içeren intravenöz kullanımlı maddelerdir (2).

Bütün parenteral kullanımlı ilaçlarda olduğu gibi serumların da mutlak steril olması arzulanmaktadır (3, 4). Ancak zaman zaman mikroorganizma içerdikleri ve hasta için önemli tehlike unsuru teşkil ettikleri gözlenmektedir. Böylece münferit vakalar yanında aynı seriye ait serumları kullanan hastalarda

salgınlara da yol açabileceği hususu gözden uzak tutulmamalıdır.

Bu noktadan hareketle çalışmamızda, tüketime arz edilmiş olan değişik firma ve kuruluşlara ait parenteral kullanımlı serumların mikrobiyolojik kalite kontrollerinin yapılması, mevcut mikrobiyolojik floranın belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda piyasada üretilen değişik firma ve seri numaralarına sahip parenteral kullanımlı serumlar, Ankara'daki değişik semtlerdeki eczanelerden sağlanmış ve bu amaçla hiç kullanılmamış 60 adet serum denemeye alınmıştır.

Çeşitli serilere ait parenteral kullanımlı serumlar öncelikle "Vacuum Filter Holders Sterility Testing System" ile mikrobiyolojik analize alınmıştır. Daha sonra üreme görülen numunelerde mevcut bakterilerin izolasyon ve identifikasyonları yapılmıştır.

Vacuum Filter Holders Sterility Testing System'i oluşturan tutucular, polipropilen fişler ve metal kapaklar 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavda sterilize edildi. Sonra tutucular steril odada temiz bir tezgah üzerinde ve ultraviyole ışığı altında saklandı. Vakumlu dağıtım borusu ile peristaltik pompa aynı tezgah üzerinde monte

edildi. Dağıtım borusu muslukları ve pompalar bir pedal aracılığı ile çalıştırılabilir. Çalışmaya başlamadan hemen önce ellerin sterilize edilmesi ve steril odaya özgü giysilerin giyilmesine özen gösterildi (5).

Öngörülen sayıdaki numuneden peristaltik bir pompa ve T distribütörü kullanılarak arzulanan oranda numune alındı. 0.45 Mm zarlar ihtiva eden iki cam ve polipropilen filtre tutuculara Trypticase Soy Broth (TSB) ve Saboraud Dextrose Broth (SDB) ilave edildi. TSB bulunan filtre tutucular 32-35°C'de SDB içerenler ise 22-25°C'de ve 10-15 gün süre ile inkübe edildi. Üreme görülen numunelerden gerekli identifikasyonun yapılması için katı besiyerine ekimler yapıldı. Bu besiyerleri aerob bakteriler için Trypton Glikoz Ekstrat Agar (TGEA) (37°C'de 2 gün), maya ve küf için Saboraud Dextrose Agar (SDA) (25°C'de 2-3 gün) olarak kullanıldı.

İncelenecek bakterilerin Gram boyamaları, mikroskoptaki görüntüleri, besiyerlerine ekimler yapılan bakterilerin koloni görünimleri dikkate alındı. Daha sonra biyosimik reaksiyonlara geçildi.

4-5 nolu örneklerden izole edilen Gr (+) kokların tiplendiriminde Tablo I'de gösterilen testlerin yanı sıra, benzidin testi ile glikozun anaerobik kullanım testlerinden yararlanılmıştır (6).

BULGULAR

Çalışmamızda, Ankara'da değişik bölgelerdeki eczanelerden temin edilen 500 ml'lik 60 adet parenteral kullanımlı serum mikrobiyolojik

kalite kontrolü açısından incelenmiştir. 10 farklı serumun her birinden değişik seri numaralı 6 adet numune denemeye alınmıştır. 60 numunenin 4'ünde (% 6.6) üreme gözlenmiştir. Denemeye alınan 4 no'lu numunede Micrococcus, 5 no'lu numunede Micrococcus ve B. subtilis, 17 no'lu numunede Candida, 36 no'lu numunede B. coagulans ve küf izole edildi. İzole edilen mikroorganizmaların tiplendiriminde yararlanılan biyosimik reaksiyonlar ve elde edilen verilen Tablo I'de gösterilmiştir.

İzole edilen mikroorganizmaların hemen hemen aynı tür bakteri veya küf olması; parenteral kullanımlı serumların kontaminasyonlarında belirli bazı mikroorganizmaların rol oynadığını, kendilerine özgü bir mikrofloraya sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca denemeye alınan serumlardan birinin farklı serilerinde mikroorganizma izole edilmesi bu serumun üretiminde gerekli titizliğin gösterilmediği düşüncesini uyandırmaktadır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Analize alınan 60 adet numunenin 4'ünde bakteri, maya ve küf üremesi gözlenmiştir.

Bu durum Uluslararası Eczacılık Federasyonu (FIP) nun parenteral kullanımlı serumlar için mutlak steril olma önerisi ile çelişmektedir. İnsanlar için hayati tehlike doğuran bu olgu, konunun ne denli önem taşıdığını açıkça ortaya koymaktadır.

Hastane ortamının, intravenöz sıvıların kontaminasyonları üzerine

Tablo 1 - İzole Edilen Mikroorganizmaların Tiplendiriminde Yararlanılan Biyokimik Reaksiyonlar ve Elde Edilen Veriler

ÖRNEK NO.	4		5		36
	Gr (+)	KOK	Gr (+)	KOK	Gr (+)
Gr (+), (-)					
KOK, BASİL					
OKSIDAZ	-	-	-	+	+
KATALAZ	+	+	+	+	+
I	-	-	-	-	-
M	+	+	-	-	-
V	-	-	-	+	-
C	-	-	-	+	+
HAREKET (25°C, 37°C)	--	--	--	--	--
TSI (GSL)	G (A+) S (A+) L (A+)	G (A+) S (A+) L (A+)	G (A+) S (A+) L (A-)	G (A+) S (A+) L (A-)	G (A+) S (A+) L (A-)
ÜREME (25°C, 42°C, 65°C)	+, +, -	+, +, -	+, +, -	+, +, -	+, -, -
NIŞASTA	-	-	-	+	-
NİTRAT	+	+	+	+	-
ÜRE	-	-	-	-	-
JELATİN	-	-	-	+	-
0.7 NaCl	+	+	+	+	±
MANNİT (AEROB, ANAEROB)	+, -	+, -			
NOVOBİOSİN	Duyarlı	Duyarlı			
BASİTRASİN	Dirençli	Dirençli			

G: Glikoz

S: Sukroz

L: Laktoz

A: Asit

etkileri konusunda, Bernick, Brawn, Bell (7) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada bu sıvıların önce orjinal ambalajlarından, daha sonra intravenöz enjeksiyonlarından sonra kalan kısmından kültür yapılmış, bu numunelerin 10'unda saptanan

kontaminasyonun orjinalinden geldiği, sadece birinde enjeksiyon işlemlerinden kaynaklandığı, izole edilen mikroorganizmalarında farklı olduğu belirlenmiştir.

Maki ve Martin (8) tarafından septisemik tablo gözlenen hastalar

üzerinde yapılan bir araştırmada, olgunun tedavi amacıyla kullanılan infüzyon sıvılarından kaynaklandığı, enfeksiyon ajanlarının genelde *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* olduğu belirlenmiş, intravenöz infüzyon sıvıları ile tedavide dikkatli olunması gereği üzerinde önemle durulmuştur.

Michales ve arkadaşları (9), iki hastaya tedavi amacıyla verilen infüzyon sıvılarından Koliform basil izole ettiklerini ve bu sıvıların kullanıldığı hastalarda ateş geliştiğini kaydetmişlerdir. Laboratuvar şartlarında intravenöz infüzyon sıvılarına az miktarda ilave edilen Koliform basillerin, % 5 Dektroz ve fizyolojik tuzlu su ortamında önemli oranda

çoğaldığını göstermiştir.

Bizim çalışmamızda da fizyolojik tuzlu su ve dekstroz ihtiva eden serumlarda üremeler saptanmıştır. Toplam 60 adet serumdan birinde iki çeşit bakteri, bir numunede hem bakteri, hem küf, birinde maya ürettiği gözlenmiştir. Örneklerin hiçbirinde *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* gibi patojen bakterilere rastlanmamıştır. Çalışmamızda sadece cam şişe ambalajlı serumlar incelendiğinden, plastik torba içindeki serumlarla karşılaştırmamız mümkün olmamıştır.

Çalışmamızda elde edilen mikroorganizmalar Tablo 2'deki hava, su ve materyaller kısmındaki mikroorganizmalarla uyum sağlamaktadır (10).

Tablo 2 - Kontaminasyona Neden Olan Faktörlerden İzole Edilen Mikroorganizmalar

Çevre/Materyal		Kontaminantlar
HAVA		Bakteri: <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> Küf: <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> Maya: <i>Rhodotorula</i>
Su	Taze Toprak-Yağmur Lağım	Bakteri: <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Serratia</i> . Bakteri: <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>K. aerogenes</i> . Bakteri: <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> .
Personel	Deri Baş Ağız	Bakteri: <i>S. aureus</i> , <i>Sarcina</i> Maya: <i>B. ovale</i> Bakteri: <i>S. streptococci</i>
Materyaller	Kimyasal Paket	Bakteri: <i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>E. coli</i> Küf: <i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> . Bakteri: <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> . Küf: <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> .
Bina		Küf: <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Auriobasidiomycetes</i> .

Doktor ve eczacılar tarafından intravenöz infüzyon sıvılarında Gr (-) basillerle karşılaşma olasılığının çok yüksek olduğu, bu tür sıvıların ünite/ml'sinde 10^6 adet bakteri bulunmasına rağmen herhangi bir bulanıklık gözlenmediği kaydedilmiştir (11). Bu düşünceden hareketle çalışmamızda analize alınan numunelerden sıvı besiyerlerine ekim yapılmış inkübasyon süresi sonunda bunların bulanıklık gözlenmeyenleri de dahil olmak üzere tümünün SDA ve TGEA besiyerlerine 1'er ml steril pipetlerle aktarılıp, besiyeri sıvıyı bir süre emdikten sonra geri kalan kısım tekrar pipetle alınmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bir numunede maya üremesi gözlenmiştir. Bu olgu yukarıdaki bulguları destekler nitelikte görülmektedir.

Parenteral kullanımlı serumlarda sterilite testi için direkt inokülasyon yöntemi yerine genelde membran filtrasyon testi tercih edilmektedir. Bu tercihin sözkonusu edilen yöntemin preparatın yapısına uygun olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (12).

İntravenöz solüsyonlarda mikrobiyolojik kalite kontrolünde yararlanılan niteliksel membran filtrasyon yöntemi ile An aliquat sampling metodunun karşılaştırılması yapılmıştır. An aliquat sampling metodu hem kolay hem de ucuz bir yöntemdir. Ancak bazı kontamine solüsyonlarda yanlış sonuçlar alınmasına neden olduğu saptanmıştır. Oysa membran filtrasyon tekniği ile ortamda mevcut tüm mikroorganizmaların izole edilmesi mümkündür. Bununla beraber bu yöntemin hem pahalı ve hem de uzun

zaman gerektirdiği gözden uzak tutulmamalıdır (13).

Bu amaçla yararlanılan bir diğer yöntemde, Limulus Amebocyte Lysate (LAL) testidir ve bu testin (The United States Pharmacopeia) USP tarafından önerilen tavşan pirojen testinden daha hassas olduğu ileri sürülmektedir (14).

Kontamine olan ve kontaminasyonları çok düşük oranda gerçekleşen intravenöz kullanımlı solüsyonların sterilite kontrollerinde yararlanılan ve yukarıda sözü edilen bu iki sterilite testinden elde edilen verilerin doğruluğu araştırılmıştır. Membran filtrasyon yöntemi ile en kolay ve en doğru sonuç alındığı belirlenmiştir (15).

Yukarıda belirtilen ve kısaca özetlenmiş olan nedenlerle çalışmamızda membran filtrasyon yöntemi tercih edilmiştir.

Zaman zaman parenteral kullanımlı serumların enjeksiyonundan sonra;

1. Yabancı maddeye bağlı olarak kan damarlarında tıkanma,
2. Aglütinasyonu izleyen emboli oluşumu,
3. Doku ve partiküllerin çarpışması sonucu oluşan bölgesel inflamasyon,
4. Allerjik ve antijenik reaksiyonlara rastlandığı, insanlara damar aracılığıyla partikül, mikroorganizma ve hava verilmesinin oldukça önemli mahzurlar doğuracağı vurgulanmıştır (16).

Denemelerimiz sonucu elde edilen veriler, tüketime sunulmuş olan bu serumların mikrobiyolojik açıdan hiç

de güvenilir olmadığını göstermiştir. Gerçi yurdumuzda yapılmış böyle bir çalışmaya rastlanmadığı için verilerimizin onlarla mukayesesi mümkün olamamıştır. Ancak zaman zaman üretimde görev alan fabrikalardan ve piyasadan örnekler alınarak bu tür serumların mikrobiyolojik kalite kontrollerinin yapılması ve kontamine ürünü üreten ve pazarlayan müesseselerin uyarılması hususu üzerinde önemli durulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Akin, A., "İlaçların mikrobiyolojik standardizasyonu", A.Ü. Ecz. Fak. Mec. II: 69-79, (1981).
2. İzgü, E., "Genel ve Endüstriyel Farmasötik Teknoloji-II", A.Ü. Ecz. Fak. Basımevi: 7-59, (1983).
3. Akers, M.J., **Parenteral Quality Control**, Marcel Dekker, Inc. New York: 1-40, (1985).
4. Anonim, Purute microbiologique des formes pharmaceutiques non obligatoirement steriles methods d'ekamen. **Pharm. Acta. Helv.**, 50: 285-292, (1975).
5. Hecker, W., Lukac, J., "Sterility testing of small-volume ampules with a reusable test system for direct incubation", Concept Symposium, Frankfurt, 1981.
6. Beşe, M., "Mikrobiyolojide kullanılan biyokimyasal testler ve besiyerleri", A.Ü. Vet. Fak. Yayınları: 298, Yardımcı Ders Kitabı: 199, A.Ü. Basımevi, Ankara, 1974.
7. Bernick, J.J., Brown, G.D., Bell, E., "Adventitious contamination of intravenous admixtures during sterility testing", **Am. J. Hosp. Pharm.**, 36: 1493-1496, 1979.
8. Maki, D.G., Martin, W.I., "Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated infusion products-IV. growth of microbial pathogens in fluids for intravenous infusion", **The Journal of Infectious Diseases**, 131: 267-271, 1975.
9. Michales, L., Ruebner, B., Lond, M.B., "Growth of bacteria in intravenous infusion fluids", **The Lancet**, 18: 772-774, 1953.
10. Akers, M.J., "Parenteral fundamentals", **Journal of the Parenteral Drug Association**, 33: 257-279, 1979.
11. Guynn, J.B., Poretz, D.M., Duma, R.J., "Groves of various bacteria in a variety of intravenous fluids", **Am. J. Hosp. Pharm.**, 30: 321-325, 1973.
12. Rameshbabu, T.R., Arambulo, A.S., "Early detection of microbial contamination in sterile solutions using on electronic counter", **Bulletion of the Parenteral Drug Association**, 30: 81-83, 1976.
13. Posey, L.M., Nutt, R.E., Thomson, P.D., "Comprasion of two methods for detecting microbial contamination in intravenous fluids", **Am. J. Hosp. Pharm.**, 38: 659-662, 1981.
14. Weary, M., "Pyrogen testing of parenteral products-status repord", **Journal of Parenteral Science and Technology**, 38: 20-23, 1984.
15. Miller, M.C., Furtado, D., Hogan, C.L., Letender, E.D., "Evaluation of three methods for detecting low level bacterial contamination in intravenous solution", **Am. J. Hosp. Pharm.**, 39: 1302-1305, 1982.
16. Russel, L.H., "Pharmaceutical applications of filtration", **The Journal of Hospital Pharmacy**, 28: 125-126, 1970.