



TÜRKİYE'DE ÜRETİLEN BAZI VETERİNER ENJEKTABL VİTAMİN PREPARATLARININ MİKROBİYOLOJİK KALİTE KONTROLLERİ

MICROBIOLOGICAL QUALITY CONTROLS OF SOME VETERINARY INJECTABLE VITAMIN PREPARATIONS MANUFACTURED IN TURKEY

Şükran ÖZTÜRK*, Sulhiye YILDIZ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100, Tandoğan, Ankara, TÜRKİYE

ÖZET

Beşeri preparatlar gibi veteriner enjektabl preparatlarda da mikrobiyolojik kalite için öncelikle üretim sırasında oluşabilecek mikrobiyolojik kontaminasyon risklerinin tespit edilmesi ve konuyla ilgili gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu çalışmada, Türkiye' de üretilen ve çeşitli ecza depolarından temin edilen veteriner enjektabl vitamin preparatların, membran filtrasyon tekniği ile sterilite ve mikrobiyolojik kalite kontrollerinin yapılması amaçlanmıştır. Piyasada kullanılan 23'ü yağda, 27'si suda çözünen vitamin içeren toplam 50 veteriner enjektabl vitamin preparatı ile çalışılmıştır. Mikrobiyolojik kalite kontrolleri yapılmış enjektabl preparatlardan 5 tanesinde üreme gözlenmiş olup, bu mikroorganizmalar; Bacillus polymyxa, Bacillus brevis ve Staphylococcus aureus olarak tespit edilmiştir. İlaçlarda kontaminasyona sebep olan bu bakterilerin, üretim sırasında, havadan, üretim alanından, ekipman ve personelden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: kontaminasyon; sterilite testi; veteriner ilaç

SUMMARY

For veterinary injectable preparations such as human preparations, primarily it is necessary to determine the risks of microbiological contamination for microbiological quality which may occur during production and take necessary precautions related to this. In this study it was aimed to examine sterility and microbiological quality control of veterinary injectable vitamin preparations, which were manufactured in Turkey and procured from various drug depots, using membrane filtration technique. A total of 50 veterinary injectable vitamin preparations, 23 of which were fat-soluble and 27 of which were water-soluble, were studied. Contamination was observed in 5 of the total injectable preparations. Microorganisms isolated from these samples were identified as 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.

Keywords: contamination; sterility test; veterinary medicine

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Şükran ÖZTÜRK
e-mail: sukranozturk79@gmail.com

GİRİŞ

Veteriner preparatları; hayvanları hastalıklardan korumak, tedavi etmek ve biyolojik fonksiyonları istenen yönde değiştirmek, bir hastalığı teşhis etmek amacıyla hayvana uygulanan etkin kimyasal ve biyolojik kökenli maddelerdir. Preparatların üretimi ilaç üretim tesislerinde gerçekleştirilerek iyi üretim koşullarına uygun bir şekilde tamamlanmalıdır [1,2].

FDA (Food and Drug Administration), insan ve hayvan preparatları için yapılacak olan ruhsat başvurularındaki üretim süreçlerinin aynı olması gerektiğini, enjektabl preparatlarda istenen bilgi ve verilerin hayvansal preparatları da kapsadığını ve yapılan başvurularda bu koşulların dikkate alınması gerektiğini bildirmiştir [3,4,5,6]. Bu nedenle, hammadde eldesinde, işleme sürecinde ve üretim sonrasındaki kalite kontrollerinin validasyonu üzerinde önemle durulması gerekmektedir. Veteriner enjektabl 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. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından enjektabl preparat imalatının dikkatle hazırlanmış ve valide edilmiş üretim metotlarına ve prosedürlere göre yürütülmek zorunda olduğu bildirilmiştir [7,8,9]. Steril imalat işlemleri “kalite güvencesi” dikkate alınarak Good Manufacturing Practise (GMP) prensiplerine göre gerçekleştirilmelidir.

Üretim aşamasında önemli unsurlardan biri; üretimin yapıldığı ortamdan kaynaklanabilecek kirlenmelerdir. Kirlenmenin üretimden, materyallerden, ekipmandan, operatörlerden ya da üretim ortamından kaynaklanabileceği bilinmektedir. Steril preparatların imalatında mikrobiyolojik, partiküler ve pirojenik bulaşma risklerini en aza indirebilmek, konuyla ilgili personelin yeteneklerine, eğitimine ve uygulamalarına bağlıdır [5].

Bu çalışmada; piyasada kullanılan 23’ ü yağda, 27’ si suda çözünen vitamin içeren toplam 50 adet veteriner enjektabl preparatının sterilite kontrolünün yapılması ve verilere dayanarak mikrobiyolojik açıdan üretimin irdelenmesi planlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Türkiye’ de üretilen ve çeşitli ecza depolarından temin edilmiş 20 farklı markanın değişik seri numaralarına sahip 50 adet veteriner parenteral vitamin preparatı incelenmiştir. Veteriner preparatlar, mikrobiyolojik kontrolleri yapılmıncaya kadar orijinal ambalajlarında ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Parenteral preparatların tümünün steril olma koşulu göz önünde bulundurularak USP 27’ ye göre sterilite test kontrolleri yapılmıştır [10, 11]. Üreme gözlenen ürünlerin aynı seri numaralarına ait açılmamış örnekleri üzerinde tekrarlanan testlerle sterilite testinin doğruluğu kontrol edilmiştir. Bunun

yanı sıra üreme gözlenen numunelerdeki mikroorganizmalar için identifikasyon testleri yapılarak kontaminasyon kaynağı hakkında fikir edinilmesi sağlanmıştır.

Sterilite Testi

Parenteral vitamin preparatların sterilite testi aseptik şartlar altında Sartorius “Vacuum Filter Holders Sterility Testing System” kapalı membran filtrasyon sistemi kullanılarak yapılmıştır [10,11,12]. Bu amaçla Fluid ThioglucoLat Medium (FTM) ve Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerleri kullanılmıştır. Membran filtrasyon tekniğine göre 0,45 µ ‘luk filtreler sisteme ait şişelerin içerisine yerleştirilerek 121°C’ de 15 dak. otoklavda steril edilmiş ve bu şişeler sisteme steril hortumlar vasıtasıyla bağlanarak sistem çalıştırılmıştır [13,14]. İlaçlar peristaltik pompa yardımıyla vakum yaptırılarak içlerinde filtre bulunan şişelerden geçirilmiştir. Daha sonra aynı hortum kullanılarak şişelerden birisine FTM, diğerine TSB ilave edilmiş, FTM içeren şişe bakterileri tespit etmek için 32,5 ±2,5 °C ‘de TSB içeren şişe ise küf ve mayaları tespit etmek için 22,5 ±2,5 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Her ikisi de 14 günlük inkübasyon periyodu sonuna dek kontrol edilerek değerlendirilmiştir. İnkübasyon dönemi boyunca 3., 7., 10. ve 14. günlerde, görsel incelemeyle mikrobiyal üremenin varlığı kontrol edilmiştir.

İdentifikasyon Testleri

Sterilite testi sonucunda üreme görülen örnekler kanlı agara pasajlanarak oluşan kolonilerden Mueller Hinton Agar (MHA)’a ekim yapılmak suretiyle 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üreme gözlenen kolonilerden hazırlanan preparatlara Gram boyama yapılmıştır. Mikroorganizmaların konvansiyonel yöntemler (IMVIC -İndol, Voges-Proskauer (VP), Sitrat) kullanılarak tiplendirilmesi yapılmış olup ayrıca glikoz, sükröz ve laktozun kullanım testi, H₂S oluşturma (TSI), nişasta hidrolizi, Mannitol Salt Agar’a ekim, jelatin hidrolizasyon testi, % 6,5 NaCl besiyerinde üreme, katalaz, oksidaz ve koagülaz deneylerinden de faydalanılmıştır [15,16].

SONUÇ VE TARTIŞMA

İncelenen 50 adet enjektabl vitamin preparatının 5’inde üreme gözlenmiştir. Üreyen kolonilerden elde edilen saf kültürlerin identifikasyonları yapılmış ve mikroorganizmaların 1’i *Bacillus polymyxa*, 2’si *Bacillus brevis* ve 2’si *Staphylococcus aureus* olarak tiplendirilmiştir.

İçerikleri aynı olan farklı firmalara ait iki numunede *Bacillus brevis* tespit edilmiştir. *Bacillus brevis*’ in üremiş olduğu numunelerin yağda çözünen preparatlar olduğu görülmüştür. Firmalardan bir tanesinin aynı ürününün farklı seri numaralarına sahip olan diğer iki numunesinde ise *Staphylococcus aureus* tespit edilmiştir. Diğer bir firmaya ait numunede *Bacillus polymyxa*’nın ürettiği örneğin B kompleks vitaminlerinden oluşan suda çözünen preparat olduğu saptanmıştır.

Veteriner ilaçların üretilmesi sırasında mikrobiyolojik kalite için öncelikli olarak parenteral preparat üretimleri sırasında oluşabilecek mikrobiyolojik kontaminasyon risklerinin tespit edilmesi ve konuyla ilgili gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Özellikle steril ürün imalatında çevre, personel, hava ve kullanılan ekipmanlardan kaynaklı kontaminasyon büyük önem taşımaktadır. FDA, kullanıma hazır hale gelmiş parenteral preparatlar için değerlendirme yaparken, gelişmiş kalite kontrol sistemlerini ve GMP kurallarını dikkate almaktadır [17]. Üretim sırasında kullanılacak madde ve malzemelerden başlayarak, üretimin yapıldığı alan, hava kalitesi, dolum yapılan şişeler ve personel faktörünün çok önemli olduğu yapılan araştırmalarda görülmüştür [18].

Çalışmamızda ürünlerin sterilite test sonuçlarına bakıldığında üreme gözlenmiş 5 üründen 4 'ünde görülen kontaminasyonun yağda çözünen preparatlarda, 1'inde oluşan kontaminasyonun ise suda çözünen preparatta olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Yapılan deneysel çalışmaların sonucunda, intravenöz yağlı emülsiyonların mikrobiyal büyümeyi desteklediği ve bakteriyel mikroorganizmaların besleyici lipit ve emülsiyon içeren tüm parenteral solüsyonlarda üreme gösterdiği saptanmıştır [3,19,20,21]. Benzer şekilde, McLeod ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada, yoğun bakımlarda sedasyon ve anestezi için sıklıkla kullanılan emülsiyon preparatlarında görülen mikrobiyolojik kontaminasyonların, lipitlerin mikroorganizmaları çoğaltıcı etkilerinden kaynaklandığını tespit etmişlerdir [22]. Yine Somer (2007), parenteral infüzyon solüsyonları ile yaptığı çalışmada, lipit içerikli solüsyonların mikroorganizmaların üremesi açısından en uygun solüsyonlar olduğunu tespit etmiştir [23].

Bir başka çalışmada ise; büyük hayvan hastanelerinde, küçük hayvan kliniklerinde ve veteriner kliniklerinde kullanılan çoklu doz veteriner parenteral ilaçlar, kullanılmadan önce kontaminasyon kontrolleri yapılmak üzere incelemeye alınmıştır [24]. Sterilite testine alınan 88 örnekten 16'sında kontaminasyona rastlanmıştır. Bu sonuçlar ise nozokomiyal enfeksiyonların oluşmasında bir faktör olarak kabul edilmektedir.

Japonyada bulunan 10 hastanede yapılan bir diğer çalışmada ise, toplam 199 parenteral nütrisyon solüsyonu mikrobiyal kontaminasyon açısından değerlendirmeye alınmıştır. Kontaminasyon oranı %8,2 olarak bulunmuştur. Oluşan kontaminasyonların sebepleri araştırıldığında ise ürünlerin üretim aşamasında filtrasyon tekniğinin kullanılmadığı ortaya çıkmıştır [25].

İlaç üretimi sırasında meydana gelebilecek mikrobiyal kontaminasyonun kaynaklarını araştırmak üzere Uçarlar ve ark.,'nın 2001 yılında yaptığı bir çalışmada, fabrikanın değişik üretim sahalarından alınan 112 örnek bakteriyolojik açıdan incelenmiş ve 255 bakteri suşu izole edilmiştir. İzole edilen suşların tanısı yapılmış ve 154' ünün koagülaz negatif Stapylococcus, 40'nın Micrococcus, 44' ünün Bacillus cinsindeki türlere ait saprofit bakteriler olduğu saptanmıştır [26]. Üretim sahasının havasından, su örneklerinden, kullanılan ekipmandan, üretim alanlarından ve mikrobiyoloji laboratuvarından izole

edilen bakteriler, çalışmamızda 5 üründe tespit ettiğimiz *Bacillus brevis*, *Bacillus polymyxa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, ürünlerimizde tespit edilmiş olan mikroorganizmalardan *S.aureus*, 'un insan kaynaklı olabileceği, Bacillus' ların ise, üretim sırasında kullanılan hammadde, makine, su, ekipman, üretim alanı ve havadan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Tüm bu sonuçlar değerlendirmeye alındığında, Türkiye'de üretilen bazı veteriner enjektabl vitamin preparatlarının uygun koşullarda üretilmediği ve gerekli kontrollerinin yapılmadığı sonucuna varmak mümkündür. Yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen sonuçlarla, kontamine olmuş enjektabl preparat kullanımının, hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyeceği açıktır. Bu nedenle, üretimde uyulması gereken kurallar zinciri olarak bilinen GMP ve Kalite Kontrolün doğru bir şekilde özümseyip uygulamaya konulması gerekliliği büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. AVMA (American Veterinary Medical Association).(2006). Veterinary Compounding. Erişim: Tarihi: 28.05.2007. Erişim: http://www.avma.org/issues/drugs/compounding/veterinary_compounding_brochure.aspfd.
2. Veteriner İspençiyarı ve Tıbbi Müstahzarlar Ruhsat Yönetmeliği Yetki Kanunu. (2002). Veteriner İlaçlarının Kontrolü ve İlgili Mevzuat Taşra Teşkilatı için Hizmet İçi Eğitim Programı 2002-R.gazete 23.10.2002/ 24915.
3. Berry, CB. Gillespie, T. Hood, JN. Scott, B. (1993). Growth of microorganisms in solutions of intravenous anaesthetic agents. *Anaesthesia*. 48(1): 30-32.
4. Boylan, JC. (1983). Essential elements of quality control. *Am J Hosp Pharm*. 40(11): 1936-1939.
5. İçin, S. (2006). İyi İmalat Uygulaması. Erişim tarihi: 26 Şubat 2017. Erişim: <http://www.bornova.vet.gov.tr/GMP.ppt>.
6. Marnane, WG. (2007). Sterility Testing Methods and Release Criteria Medicine Center for Veterinary. Erişim Tarihi: 5 Şubat 2017. Erişim: <http://www.fda.gov/cvm/Guidance/cmc2.htm>
7. CVM (Center for Veterinary Medicine) (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.
8. Ertürk, N. (2006). Vitaminler ve Kullanımları. Erişim Tarihi: 18 Şubat 2017. Erişim: <http://www.guvercinler.info/icerik/179/Ulkemizde-Guvercinler.html>
9. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (2002). Steril Pharmaceutical Products. Basic Principles of GMP. Annex 6. TRS 902. Revised: 2006
10. USP 27. (2004a). <797> Pharmaceutical Compounding –Sterile Preparations. United States Pharmacopeia. p:2350-2360.

11. USP 27. (2004d). <71> Sterility Test / Microbiological Tests. United States Pharmacopeial. p: 2157-2162.
12. EP. (2000). Biological Tests, Sterility. European Pharmacopoeia Supplement. Chapter:2.6.1.p:46.
13. Mo Bio, Laboratories Inc. (2006). Test Methods. Erişim Tarihi: 2016. Erişim: <http://www.mobio.com/services-view/php?id=8>
14. Wilson, JD. Varney, M. (1995). Sterility tests incubation issue. PDA J Pharm Sci Technol. 49 (4): 157-159.
15. Bakteri İdentifikasyon Testleri. Erişim Tarihi: 10.04.2017. Erişim: http://dergi.dirimbilim.net/index.php?option=com_content&view=article&id=84&Itemid=113
16. Bakteri İdentifikasyonu. Erişim Tarihi: 12.04.2017. Erişim: <http://www.bakteriler.gen.tr/bakteri-identifikasyonu.html>
17. FDA (2004). Guidance for Industry Quality Systems Approach to Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practice Regulations. Pharmaceutical cGMPs.
18. BP. (2004). Test for Sterility. British Pharmacopoeia. Vol 1 Appendix XVI A.p: 139.
19. Arduino MJ, Bland LA, McAllister SK. (1991). Microbial growth an endotoxin production in the intravenous anesthetic propofol. International Anesthesia Research Society Anesthesia & Analgesia. 12: 535- 539.
20. Gilbert, M. Gallagher, SC. Eads, M. Elmore, MF. (1986). Microbial growth patterns in a total parenteral nutrition formulation containing lipid emulsion. JPEN J Parenter Enteral Nutr.; 10(5): 494-497.
21. Rowe, CE. Fukuyama, TT. Martinoff, JT. (1987). Growth of microorganisms in total nutrient admixtures. Drug Intell Clin Pharm. 21(7-8):633-638.
22. Mcleod, NP. Inglis, MD. (1991). Bacterial growth in propofol. British J Anaesthesia. 67: 665-666.
23. Somer, A. (2007). TPN İlaç ve diğer solüsyonların hazırlanmasında DAS uygulamaları. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi.
24. Sabino, CV. Weese, JS. (2006). Contamination of multiple-dose vials in a veterinary hospital. Can. Vet J. 47(8): 779-782.
25. Oie, S. ve Kamiya, A. (2005). Particulate and Microbial Contamination in Use Admixed Parenteral Nutrition Solutions. Biol.Pharm.Bull. 28 (12)2268-2270.
26. Uçarlar, S. Döşler, S. Ötük, G. (2001). İlaç sanayinde sıklıkla izole edilen mikroorganizmaların tanımı ve bunların dezenfektan maddelere karşı duyarlılığının incelenmesi. FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi. 26 (2): 73-80.