

**FARMASÖTİK ŞURUPLARIN AEROP BAKTERİ SAYISI, *SALMONELLA SP.*
VE *ESCHERICHIA COLI* YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI**Sebahattin YILDIRIM¹Mustafa YEL²**ÖZET**

Bu çalışma Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı İlaç ve Kozmetik Araştırma Laboratuvarına ruhsat alma başvurusunda bulunan 60 adet farmasötik şurup örneği üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada aerop bakteri sayısı, *Salmonella sp.* ve *Escherichia coli* araştırılmıştır. Örnekler değişik firmaların ürünlerinden alınarak uygun şartlarda laboratuvara taşınmışlardır.

Uluslararası Eczacılık Federasyonu Kriterlerine göre değerlendirilen örneklerin toplam aerop bakteri sayısı bakımından düşük olduğu, hiçbir örnekte *Salmonella sp.* ve *Escherichia coli*'ye rastlanılmamıştır.

Anahtar kelimeler: Farmasötik şurup, aerop bakteri, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*

**THE SEARCH OF PHARMACEUTICAL SYRUP SAMPLES FOR AEROP
BACTERIA NUMBER, *SALMONELLA SP.* AND *ESCHERICHIA COLI*****SUMMARY**

This study has been carried out on 60 pharmositic syrup samples sent to Refik Saydam Headquarter Medicine and Cosmetics Research Laboratory for permission licences. In this study, aerop bacteria number, *Salmonella sp.* and *Escherichia coli* have been searched for. The samples from various firms were carried to the laboratory in appropriate conditions.

It has been observed that the samples, which were evaluated according to International Pharmacy Federation criteria, were low in total aerop bacteria number, aerop bacteria have been observed with no *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*.

Key words: Pharmaceutic syrup, aerop bacteria, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*

GİRİŞ

Günümüzde, farmasötik preparatların mikrobiyolojik kontaminasyonları önemli hale gelmiş ve bu alandaki araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. İlaç ve Kozmetik üretiminde asıl amaç, üretilen preparatların normal etkileri dışında, insan sağlığına zararlı etkilerinin olmamasıdır. Uluslararası Eczacılık Federasyonu tarafından farmasötik preparat üretimi için standartlar tespit edilmiştir (1,2).

Yüksek şeker içeren farmasötik şuruplar

imalat veya kullanım sırasında hijyen kurallarına uyulmaması halinde bakteriler tarafından kontamine olmaktadır (3,4). Şuruplarda mikrobiyolojik kirliliğin nedeni olarak, doğal kaynaklı hammaddelerin hijyen kurallarına göre mikroorganizmalardan arıtılmadan üretimde kullanılmalarından kaynaklandığı ifade edilmiştir (5-8). Kontaminasyonda rol oynayan en önemli etken, üretimdir. Çevre koşulları, kullanılan araç gereç ve personel hijyeni optimal kontaminasyonu artıran veya

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Ankara

²Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü Ankara

Geliş tarihi : 15.09.2000 Kabul edilmiş tarihi: 04.10.2000

Yazışma adresi : Bio.Sebahattin YILDIRIM, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara

azaltan faktörlerdir (7).

İlaçlardan izole edilen mikroorganizmalar patojen, potansiyel patojen ve saprofit olabilirler. Mikroorganizmaların parçalanması sonucu açığa çıkan endotoksin veya üremeleri halinde oluşan toksik etkili metabolizma ürünleri çok değişik hastalık tabloların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Farmasötik ürünler kontaminasyon derecesine, şekline ve türüne bağlı olarak çeşitli hastalık tabloları oluşturmaktadırlar (3,8,9). Oral yolla kullanılan ilaçlar genel olarak çok az sayıda mikroorganizma içerebilirler. Ancak patojen mikroorganizma içermeleri halinde enfeksiyonlara neden olabilirler. *Salmonella* enfeksiyonları çoğunlukla sıvı preparat, tablet ve kapsül formlarla oluşurlar (10).

Çalışmamızda, tüketime sunulmak üzere olan değişik üretici kuruluşlara ait bazı şurupların mikrobiyolojik kalite kontrollerinin yapılması, mevcut total aerop bakteri sayısı, *Salmonella sp.* ve *E. coli*'nin bulunup bulunmadığının belirlenmesi Türkiye genelinde yapılacak yöntem standardizasyonunda faydalı olacağı düşünülerek planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1.Gereç

Araştırmamızda 60 adet farmasötik şurup incelenmeye alınmış olup, her inceleme serisi için 4'er örnek hazırlanarak çalışılmıştır. Araştırılan örneklerin çalışılması, Çevresel kontaminasyonları önlemek için laminar air flow kabini kullanılarak steril şartlarda gerçekleştirilmiştir (4,11,12).

Araştırmamızda kontrol mikroorganizmaları olarak *Salmonella paratyphi B.* 8458 (NCTC), *E. coli* B.026B6 (RSKK) bakteri kullanılmıştır.

2.Yöntem

Örneklerin incelenmesinde United State of Pharmacopeia XXI, British Pharmacopeia ve Deutsches Arzneibuch -9 test yöntemleri modifiye edilerek kullanılmıştır (13 – 21).

3.Total Aerop Bakteri Sayımı

Bütün şurup örneklerinden steril şartlarda 10 ml alınarak 90 ml'lik NaCl tamponu ile 1/10'luk dilüsyonları hazırlandı. Steril fizyolojik su ile

1/100, 1/1000, 1/10000'lik hazırlanan örneklerin seri dilüsyonlarından 1'er ml alınarak petri kaplarına inoküle edildikten sonra, üzerlerine Casein Soybean Digest Agar ilave edilerek 35°C'de 48 – 120 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda izole edilen total aerop bakteri sayısı sulandırım katsayısı ile çarpılarak 1 ml' deki bakteri sayısı tespit edildi (15).

4. *Salmonella sp.* ve *Escherichia coli* Tespiti

Şurup örneklerinde *Salmonella sp.* ve *E. Coli* bakterilerinin bulunup bulunmadığını tespit etmek için her şurup örneğinden steril şartlarda 10 ml alınarak Laktöz Broth besiyerine ekimi yapıldı. Ekimi yapılan besiyerleri 35 – 37°C'de 5 saat süre ile ön zenginleştirme için inkübasyona alındı.

Escherichia coli tespiti için Mac Conkey Broth, *Salmonella sp.*'nin tespiti için Selenite Broth ayırt edici besiyerleri kullanılmıştır. Şuruplardan izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal karakterlerinin tespiti için Kligler Iron Agar, İMVİC, (İndol, Methyl-Red, Voges-Proskauer, Sitrat) H₂S testleri gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada tüketime sunulmak üzere Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi İlaç ve Kozmetik Araştırma Müdürlüğüne ruhsat başvurusunda bulunan farklı üretici firmaya ait farklı seri numaralı 60 farmasötik şurup örneği üzerinde elde edilen bulgular Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'deki bulgular incelendiğinde görüleceği gibi 60 farmasötik şurup örneğinin total aerop bakteri sayısı yönünden Uluslar arası Eczacılık Federasyonu'nun kriterlerine uygun olduğu tespit edilmiştir.

Araştırma konusu ettiğimiz 60 farmasötik şurup örneğinde hiç *Escherichia coli* ve patojen *Salmonella sp.*'ye rastlanmamıştır. Çalışmamızda elde edilen bulguların doğruluğunu ispatlamak ve kullanılan yöntemlerin güvenilirliğini test etmek için *Salmonella sp.* ve *E.coli*'nin biyokimyasal testleri yapılmıştır. Bu iki bakteri türüne ait incelenen biyokimyasal test bulguları Tablo 2'de verilmiştir (15).

Tablo 1. Şuruplarda total aerop bakteri, *Salmonella sp.* ve *E.coli* mevcudiyeti

Örnek no	cfu/ml	Total aerop bakteri	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>
1 - 23	0	-	-
24	1.2x10 ²	-	-
25 - 41	0	-	-
42	1.1x10 ²	-	-
43	1.4x10 ²	-	-
44 - 51	0	-	-
52	10 ²	-	-
53	0	-	-
58	1.1x10 ²	-	-
59	9.2x10 ²	-	-
60	0	-	-

Tablo 2. *Salmonella sp.* ve *E.coli*'nin biyokimyasal testleri

Bakteri	IMVIC	Üre	H ₂ S	Glukoz	Laktöz	Mannit	Sukroz	KCN
<i>Salmonella sp.</i>	+++	-	+	+	-	+	-	-
<i>E.coli</i>	++-	-	-	+	+	+	D*	-

* Bir cinste türler arasındaki farklı reaksiyon

TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmamızda üretim sonrası hiç açılmamış ve ilk olarak araştırma sırasında tarafımızdan açılan 60 adet farmasötik şurup örneği incelenmiştir. Analizi yapılan bu örneklerin hiç birinde *Salmonella sp.* ve *E. coli* görülmemiştir. Bulunan total aerop bakteri sayısının ise Uluslararası Eczacılık Federasyonu tarafından verilen limitlerin altında olduğu gözlenmiştir. 54 örnekte hiç üreme olmadığı, 5 örnekte 10² cfu/ml üreme 1 örnekte de 10²-10³ cfu/ml üreme gözlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen tüm bulgular FIP, USP, DAB-9 ve BP'nin farmasötik şuruplar için öngördüğü toplam aerop bakteri üst sınırı olan 10³/ml ve hiç bulunmaması gereken *E.coli*, *Salmonella sp.* yönünden uygun olduğu görülmüştür. Farmasötik şuruplarda çok sayıda mikroorganizmanın bulunması genellikle kontamine hammadde kullanımı veya steril olmayan teknoloji ve saklama şartlarından kaynaklanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde şurupların

mikrobiyolojik kalitesi total aerop bakteri sayısının 1 ml veya 1 cm³'de 1000 den fazla olmaması, *Salmonella sp.* gibi patojenlerin 1 ml veya 1 cm³'de hiç bulunmaması ile değerlendirilmektedir (17).

İki araştırmacı, tarafından 100 adet açılmamış şurup örneği ile evlerde kısmen kullanılmış olan 48 adet şurup örneği üzerinde yapılan mikrobiyolojik araştırmada, her iki grup örneğin mikrobiyolojik açıdan kontamine oldukları saptanmıştır. Kullanılmış şurup örneklerinden toplam 173 ve açılmamış örneklerden de toplam 365 küf mantarı izole edilmiştir (6).

Dony ve ark. (18) tarafından çeşitli farmasötik formların hazırlanmasında yararlanılan suyun kontaminasyondaki risk önemi araştırılmış ve özellikle enjektabl olmayan ilaçların hazırlanmasında kullanılan, farmakopeler tarafından önerilen, deiyonize suyun kontaminasyon kaynağı olabileceği ifade etmiştir. Dony (19) tarafından yapılan bir çalışmada, denemeye alınan etken ve yardımcı etken madde ile farmasötiklerden elde edilen çok önemli olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, 1106 sıvı farmasötik preparat incelenmiş %87'sinde 1-100, %7'sinde 10²-10⁴, %5'inde 10⁴-10⁶ ve %1'inde 10⁶'dan çok jerm/gr bulunmuş olup %73 aerop sporlu basil, %15 *Pseudomonas*, %7 *Enterobacteriaceae*, %4 küf ve %0.50 oranında gram pozitif kok cinsi mikroorganizma izole edilmiştir.

Mikrobiyolojik kalite kontrolleri araştırılan 65 ekspektoran şurubun %3 total aerop bakteri ve %4.5'inin maya ve küf sayısı bakımından FIP kriterlerine uymadığı, %15'inde patojen ve potansiyel patojen mikroorganizma görüldüğü ileri sürülmüştür. Bu şurupların %1.54 *S. epidermidis*, %1.54 *Bacillus subtilis*, %4.61 *E. coli*, %3.07 *P. vulgaris* ve %4.61 oranında *Candida albicans* içerdiği belirtilmiştir (16).

Sonuçlarımızdan diğer sonuçlar karşılaştırıldığında görüleceği gibi araştırma konusu 60 farmasötik şurupta bazı patojen mikroorganizmaların hiç görülmemesi Türk ilaç üretiminin ciddi farmasötik kontrollerinin yapıldığını ve özellikle hijyenik koşullara çok önem verildiğini göstermektedir. Kuşkusuz farmasötik preparatların kontamine olmasının önlenmesi zorunluluğu

vardır. Bu nedenle farmasötik preparatların steril şartlarda üretilmesi, üretim sırasında Good Manufacturing Practices ve Good Laboratory Practices kurallarına uyulmalıdır. Ürünün hijyenik olarak korunabilmesi için uygun ambalaj seçilerek hem kontaminasyonu ve hem de enfeksiyonların oluşumunu engelleyerek bekletilmelidir.

Sonuç olarak bütün farmasötik preparatlarda olduğu gibi şuruplarda da mikrobiyolojik belirli aralıklarla kontrollerinin yapılması ve sonuçların uluslararası standartlara uygun olması gerektiği, böylece Türk toplumunun sağlığının daha iyi korunabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Güven K C, Çetin E T ve Ötük G. Microbial Contamination of elixir and syrup types pharmaceutical preparation. *Eczacılık Bülteni* 1973; 15: 55-57.
2. Akın A, ilaçların Mikrobiyolojik Standardizasyonu, Ankara Üniv Ecz Fak Mec 1981; 11: 69-79.
3. Babik I. Microbial Purity Of Medicines 1. Requirements For Microbial Purity and The result of evaluation of microbiological quality of medicine. *Cesk Forın* 1977; 8: 383-396.
4. Baird R M, Crowden, C A O' Farrel, S M and Shooter, R.A. Microbial contamination of pharmaceutical product in the horrie. *Journal of Hygiene Cambridge* 1979; 83: 277-283.
5. Özyaral O, ve Bozok, J C ilaç endüstrisinde çok kullanılan bir grup ilaıyardımcı maddesi ile bazı piyasa preparatları üzerine yapılan küf analizleri. *Türk Mikrobiyoloji Cem Dergis* 1986; 10: 85-97.
6. Özyaral O, ve Bozok, J C, Bazı farmasötik ürünler ve yardımcı maddelerin depo küfleri yönünden incelenmesi. *Kükem Dergisi* 1987; 10: 70-75.
7. İzgü E Genel ve Endüstriyel Farmasötik Teknoloji-1. A Ü Ecz Fak Basımevi Ankara 1983
8. Hıncal A A, ve Kaş. H S Farınasötik Teknoloji -1 . H Ü Ecz Fak Basımevi Ankara 1985.
9. Hugo W and Russell, A D *Pharmaceutical microbiology*, Third Edition, Blakwell Scientific Publications, Oxford, London 1983.
10. Moore K E Evaluating preservative efficacy by challenge testing during the developments stages of pharmaceutical products: *Journal of App Soc* 1976; 18: 44-51.
11. Anonim Microbiological purity of non-compulsorily sterile pharmaceutical preparations methods of examination. *Pharm. Acta Helv* 1976; 51(3): 34-40.
12. British Pharmacopeia, Tests for Sterility: 1980; 1 I, A186-A190.
13. British Pharmacopeia, Tests for microbial contamination. 1985; 1 I, A186-A 195, 14.
14. Bühlmann X, Gay, M. And Gulber, H U Microbiological quality of pharmaceutical preparations. *American Journal of Pharm* 1972; 144 (6): 165-181.
15. Russell A D, Hugo, W B AND Ayliffe, G J Principles and practice of disinfection preservation and sterilization. Blacwell Scientific Publications, 1982 Oxford.
16. Erk E. Ekspektoran şurupların mikrobiyolojik kalite kontrolleri: Yüksek Lisans Tezi, A Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1991 Ankara.
17. Özyaral O, Bozok J C. Farmasötik preparatlardan şuruplarda küf mantarları ile kontaminasyon olasılıklarının araştırılması. *FABAD Farm Bil Der* 1990; 15: 147-155.
18. Dony J, Dufaux- Fauville, M, and Devleeshouwer, M, Microbiologie et hygiene. *Seminaries et Traxaux Pratques*, Pul Presses Universitaires de Brugelles, 1978; P, 28.
19. Dony J, Bull. Et memories de L'Academic Royals de Belqiqua, 1976; 131, 323-335.
20. Dony J, Akın, A, ve Devleeshouwer, M, Sıvı majistal formların mikrop florası- ekolojik veriler ve antibiyotiklere hassasiyeti, A Ü Ecz Fak Mec 1980; (1-2): 30-40.
21. USP.XXI (United State of Pharmacopera), microbial Limit Tests. 1985; (61): 1151-1156.