



FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ VE İLAÇ ENDÜSTRİSİNDEKİ ÖNEMİ

DOÇ.DR.SİBEL DÖŞLER

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

sibeldosler@hotmail.com



Farmasötik mikrobiyoloji

Temel olarak mikroorganizma – ilaç etkileşimleri ve bunların konakla olan ilişkilerini inceleyen bilim dalıdır.

Mikroorganizmaların ilaca etkileri:

- İlaçların ve kozmetik ürünlerin mikroorganizmalarla kontaminasyonu,
- Kontaminasyonun ilaç / kozmetikler üzerine olan etkileri,
- İlaç / kozmetik kontaminasyonunun insan sağlığı üzerine etkileri,
- Kontaminasyon kaynakları,
- İlaç / kozmetiklerdeki kontaminasyonun kontrolü,
- Kontaminasyonun giderilme yöntemleri,
- Kontaminasyona izin vermeksizin kaliteli ilaç / kozmetik üretimi.

İlaçların mikroorganizmalar üzerine etkileri:

- Antibiyotikler,
- Tüm antimikrobiyal ajanların,
- Yeni aday moleküllerin (antimikrobik peptitler, katyonik steroidal antibiyotikler, çeşitli bitki ekstraktları, kimyasal sentez yoluyla elde edilen maddeler, vb.)

Antimikrobiyal aktivite deneyleri:

- ✓ Farmakopeye göre potens belirlenmesi,
- ✓ Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi,
- ✓ Minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) belirlenmesi,
- ✓ Minimum biyofilm inhibe / eradike edici konsantrasyonların (MBİK, MBEK) belirlenmesi,
- ✓ Mikroorganizmaların yüzeye yapışmasının ve biyofilm oluşumunun engellenmesi,
- ✓ Fraksiyonel inhibisyon katsayısının (FİK) checkerboard yöntemi ile belirlenmesi,
- ✓ Antibiyotik sonrası etkinin (ASE / PAE) belirlenmesi,
- ✓ Zamana bağlı öldürme yöntemi (TKK) ile bakterisidal aktivite ve kombinasyonların etkinliklerinin belirlenmesi

Farmasötik mikrobiyoloji ayrıca:

- Probiyotikler; kendileri ilaç olarak kullanılan mikroorganizmalar,
- Aşılar; enfeksiyonlardan korunmadaki en önemli silahlarımız,
- Antiseptik ve dezenfektan maddeler; vücut yüzeyi ve çevredeki mikroorganizma sayısını kontrol altında tutmamızı sağlayan maddeler,
- İmmün sistem ve bu sistemi düzenleyici ilaçlar,
- Biyoteknolojik aşı ve ilaçların üretilmeleri,
-vd.

Alanlarındaki çalışmalarla ilgilenmektedir.



İlaçlar;

İnsan yada hayvanlara

- Hastalıkları tedavi edici (terapötik),
- Hastalıkları önleyici (profilaktik),
- Hastanın şikayetlerini giderici (semptomatik),
- Hastalık teşhisi yapıcı (diagnostik),
- Normal vücut fonksiyonlarını değiştirici / düzenleyici

olarak verilen, etken ve yardımcı maddelerden oluşan preparatlar olarak tanımlanabilmektedir

İlaçta mikrobiyal kontaminasyon

- Üretimin havanlardan çıkıp dünya çapında bir sanayi haline geldiği ilk dönemlerde, ilaçta kontaminasyon olabileceği fikri düşünülmemiştir.
- Ancak zaman içinde çok sayıda kontamine ilaç ve bunlara bağlı olarak oluşan enfeksiyonlar rapor edilmeye başlanmıştır.
- Bunun üzerine çeşitli araştırmacılar piyasada bulunan farklı ilaç şekilleri üzerinde çalışmalar yapmış ve çok çarpıcı sonuçlar elde etmişlerdir.
- Bu çalışmalarla katı, yarı katı yada sıvı her türlü preparatta mikrobiyal kontaminasyonun varlığı ve önemi anlaşılmıştır.

Farmasötik ürünlerde saptanmış kontaminantlar

YIL	ÜRÜN	KONTAMİNANT
1907	Veba aşısı	<i>Clostridium tetani</i>
1943	Göz damlaları	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1946	Talk pudrası	<i>Clostridium tetani</i>
1948	Serum aşısı	<i>Staphylococcus aureus</i>
1955	Kloroksenelol dezenfektan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1966	Tiroid tabletleri	<i>Salmonella muenchen</i>
1966	Antibiyotikli göz merhemi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1966	Tuzlu su	<i>Serratia marcescens</i>
1967	Karmin boyası	<i>Salmonella cubana</i>

Farmasötik ürünlerde saptanmış kontaminantlar II

YIL	ÜRÜN	KONTAMİNANT
1967	El kremi	<i>Klebsiella pneumonia</i>
1969	Nane aromalı su	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1970	Klorheksidinli-setrimidli antiseptik çözeltisi	<i>Pseudomonas cepacia</i>
1972	İntrevenöz sıvılar	<i>Pseudomonas, Erwinia, Enterobacter türleri</i>
1972	Pankreatin	<i>Salmonelle agona</i>
1977	Kontakt lens çözeltisi	<i>Serratia ve Enterobacter türleri</i>
1981	Cerrahi elbiseler	<i>Clostridium türleri</i>
1983	Sıvı sabun	<i>Pseudomonas stutzeri</i>

FIP (Uluslararası Eczacılık Federasyonu)'e göre farmasötik ürünlerin mikrobiyolojik kaliteleri

Farmasötik preparat	Bildirilen koşullar
Enjektabl preparatlar, göz preperatları	Steril
Yaralı deriye uygulanan, kulak-burun-boğaza uygulanan lokal preparatlar, jinekolojik, inhalasyon, kozmetik preparatları	10^2 aerop bakteri/gr yada ml*
Oral ve diğer preparatlar	10^3 - 10^4 aerop bakteri/gr yada ml, 10^2 maya veya küf/gr yada ml *

* *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, *S. aureus*, *P. aeruginosa* vb patojen bakteri ve mantarlar bulunmamalı

Farmasötik preparatlara uygulanan testler

- İlaçların, FIP'de bildirilen bu şartları yerine getirip getirmediğini belirlemek üzere çeşitli testler yapılmaktadır

I- Steril preparatlar için:

1. Enjektabl (parenteral) preparatlar için:

- * Sterilite testi
- * Pirojenite testi
- * Toksikite testi

2. Oftalmik (göze uygulanan) preparatlar için:

- * Sterilite testi

II- Non-steril preparatlar için:

Mikrobiyolojik limit testi;

1. Sulu çözeltiler, su/uygun çözücüde çözünen maddeler için
 - Filtreden süzme
2. Dağıtılmış sistemler için (tablet, şurup vb.)
 - Canlı bakteri sayımı
3. Az miktarda mikroorganizma içeren preparatlar için
 - En olası sayı tespiti (MPN)

Sterilite testi:

- Mutlaka steril olması gereken enjektabl ve oftalmik preparatlara uygulanır.
- Üretimin boyutuna göre yeterli sayıda örnek alınıp aseptik şartlarda açılarak bakteri ve mantarların üremesi için özel besiyerlerine ekim yapılır.
 - * Bakteriler için tiyoglikolatlı sıvı besiyeri (37°C)
 - * Mantarlar için sıvı sabouraud besiyeri (22-25°C)
- Besiyerleri 14 günün sonunda değerlendirilir
- Her iki besiyerinde de üreme yoksa ürün steril kabul edilir
- Besiyerlerinden herhangi birinde yada ikisinde üreme görülürse ürün steril değildir

Pirojenite testi

- Pirojen madde (endotoksin), Gram negatif bakterilerin metabolik yan ürünüdür
- Enjeksiyonla vücuda girdiğinde ateşi yükseltir
- Lipopolisakkarit yapıdadır
- < 50 nm'dan küçük olup filtrelerden geçebilir
- Isıya dayanıklıdır
- Pirojenler ürüne sudan yada üretim yapılan kaplardan bulaşabilirler
- Pirojenlerin giderilmesi için sterilizasyon yöntemleri yeterli değildir
- Pirojenler, cam / katı maddelerden 250°C 'de 30 dakika ısıtmayla
- Sıvılardan ise aktif kömürden geçirilerek uzaklaştırılır

Pirojenite testleri

- İki farklı yöntemle yapılabilmekte

1- **İn vivo:** tavşanlar üzerinde

- * İlacın uygun koşullarda bekletilen belirli sayıda tavşana enjekte edilmesi ve tavşanların vücut ısısının belirli bir limitten daha fazla yükselmemesi esasına dayanır

2- **İn vitro / LAL (Limulus Amebosit Lizat) Testi:**

Amebosit lizat + pirojen madde \longrightarrow jel oluşumu

(protein) (lipopolisakkarit)

- Yengeç benzeri bir sığ deniz hayvanı olan *Limulus polyphemus*'dan elde edilen protein yapısındaki lizatın lipopolisakkarit yapısındaki endotoksinle (pirojen) birleşerek çökmesi esasına dayanır



Toksisite testi

- İlaçta normalin üzerinde bir toksik etkinin var olup olmadığı araştırılır.
- Deneyde fındık fareleri kullanılır.
- İlacın uygun şartlardaki 5 fareye enjeksiyonundan sonra 48 saat içinde hiçbir farenin ölmemesi gerekir
- Eğer farelerden ölen olursa test 5 yeni fare ile tekrarlanır
- Yine ölenler olursa ürün toksik kabul edilir
- Hiçbir fare ölmezse ürün toksik değildir



Mikrobiyolojik limit testleri

- Steril olma zorunluluğu bulunmayan ilaçlarda hangi mikroorganizmanın ne kadar sayıda bulunduğunun tespit edilmesini sağlayan deneylerdir
- Ürünün özelliğine göre aşağıdaki yöntemlerden en uygun olan biri ile çalışılır;
 - * Besiyerine karıştırarak yada besiyerinin yüzeyine yayarak sayım
 - * Filtrasyon ile sayım
 - * En olası sayının tespiti
- Sayımlar sonucunda elde edilen sayılar FIP'nin verdiği tablodaki limitlerle kıyaslanarak ürünün kullanıma uygun olup olmadığı tespit edilir

Farmasötik ürünler,

- Uygulanan testlerle ancak üretim yapıldıktan sonra ve alınan numuneler ölçüsünde kontrol edilebilir
- Hiçbir zaman ürünün tümü kontrol edilemez

Sonuç olarak,

- İlaça bağlı enfeksiyon riskini en aza indirmek için üretimin her aşamasından gelebilecek riskleri bilmek ve bunlara karşı önlemler alarak kontaminasyonu daha meydana gelmeden engellemek gerekmektedir
- Yani ilaç her zaman için hatasız ve her açıdan kaliteli olarak üretilmelidir
- Bunun için de GMP adıyla anılan kurallar geliştirilmiş ve ilaç üretiminin her aşamasında kaliteyi oluşturmak üzere kullanılmaya başlanmıştır.

İlaçlarda kalite;

- Satın aldığımız hemen her ürünün kalitesi, satın alınmadan önce yada sonra kontrol edilebilir niteliktedir
- Örn: elektrikli aletler, giysiler, mobilyalar, oyuncaklar, hatta birçok yiyecek / içecek bile kontrol edilebilir ve gerekirse değiştirilebilir
- Oysa ilaçların kalitesini, görünümünü değiştirmedeği sürece, kullanmadan önce kontrol etme şansımız yoktur
- $1/10^6$ 'lık hata payı bile ilaç için kabul edilebilir değildir
- Yanlış üretilmiş / etiketlenmiş bir ilacı kullanmanın sonu ölüme kadar varabilmektedir
- Yani kalitesiz bir ilacın iade yada değişimi yoktur
- Bu nedenle kullandığımız her ilacın doğru ve kaliteli olduğuna güven duymak bir zorunluluktur.

Kalite nedir?

- Sözlük anlamı: “mükemmelliğin bir derecesi” yada,
- “Bir ürünün spesifikasyonlarına uygun olması”dır.
- GMP’ye göre kalite: “ürünün belirlenmiş amacına uygun olması” olarak tanımlanmaktadır
- Bu tanıma göre kaliteli ilaçlar:
 - * Formülasyonu doğru olmalı,
 - * Kontaminasyona uğramamış olmalı,
 - * Farmasötik şekli hasar görmemiş olmalı,
 - * Doğru etiketlenmiş olmalı
 - * Taşıma, depolama yada kullanma sırasında zarar görmeyecek şekilde kapatılarak ambalajlanmış olmalıdır.

Standart, kaliteli bir üretim için belirlenmiş kurallar = GMP (Good Manufacturing Practice / İyi Üretim Uygulamaları)

- Üretimde hata riskini en aza indirmeyi ve kullanım amacına uygun, kaliteli üretim yapmayı sağlayan bir kavram
- İlk kez 1963 yılında Amerika'da Food and Drug Administration (FDA) tarafından ortaya konulmuş,
- 1968'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kabul edilerek yayımlanmış,
- 1983'de yeniden gözden geçirilerek düzenlenmiş,
- 1984'de Türkiye'de ilaç üretiminde zorunlu olarak uygulamaya girmiştir.

GMP nedir ?



- Bir ürünün (ilacın) üretimi, ambalajlanması ve sunulması için kullanılan yöntemlerin, tesislerin ve kontrollerin asgari gerekliliklerini düzenleyen kurallar dizisidir
- Amacı, ilacın güvenli olduğu ve gereken saflığı ve kaliteyi taşıdığından emin olmaktır
- Sürekli gelişen ve değişen bir kavramdır.
- Periyodik olarak gözden geçirilerek gerekli düzeltmeler yapılmaktadır.
- Bu nedenle yürürlükte olan GMP kuralları güncel / current GMP (cGMP) adıyla da anılmaktadır

GMP'nin kapsamı

- Her türlü insan ve hayvan ilaçları
- Biyolojik ilaçlar ve medikal cihazlar
- Klinik malzemeler ve plasebolar



İlaç ve GMP

Üretimdeki her seri ürünün kalitesi, o ürünün istenen tüm standartlara uygunluğuna bağlıdır. Bunun için pratikte;

- Uygun bina ve gereçlerin sağlanması
- Personelin yeterli eğitimi
- Doğru hammadde ve yardımcı maddelerin kullanımı
- Denenmiş / valide edilmiş işlemlerin uygulanması
- Uygun depolama ve taşıma şartlarının sağlanması
- Doğru ve eksiksiz kayıt tutulması
- Her aşamada gerekli testlerin uygulanması
- **İlaçtaki mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi gerekmektedir**

Farmasötik ürünlerdeki mikrobiyal kontaminasyonun kaynakları:

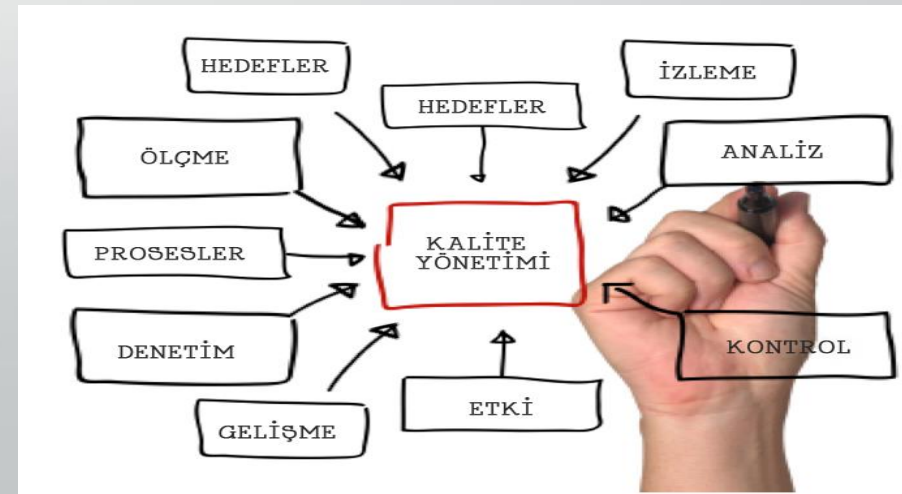
- Hammadde ve yardımcı maddeler,
- Su,
- Hava,
- Makina ve ekipman,
- Ambalaj,
- Personel,
- Depolama ve kullanma sırasında.

Farmasötik ürünlerde mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi için yapılması gerekenler;

- Çevrenin düzenlenmesi (Tesislerin dizaynı, havalandırma ve su sistemlerinin kuruluşu)
- Uygun hammadde, yardımcı maddeler ve ambalaj materyallerinin temini
- Koruyucu uygun giysiler giyilmesi
- Personelin eğitimi
- Temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri
- Dokümantasyon ve kayıtlar

Kalite kontrol ve kalite güvence

- Kalite kontrol bir ürünün hammadde, yarı mamul ve mamul aşamalarında alınan örnekler doğrultusunda fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik açılardan incelenmesidir
- Kalite kontrol birimi bu amaçla numuneler alır, analizleri yapar ve sonuçların spesifikasyonlara uygun olup olmadığını rapor eder
- Kalite güvence terimi ise bir ürünün amacına uygun olarak üretildiğinden emin olmak ve buna güvenmek için uygulanan sistematik ve organize edilmiş işlemleri ifade eder
- **Üretilen ürünlerin toplam kalitesini sağlamak kalite güvencenin görevidir**



Validasyon



- Herhangi bir işlemin, aletin, yöntemin, sistemin yada faaliyetin doğruluğunun, güvenilirliğinin ve tekrarlanabilirliğinin ispat edilmesidir
- Diğer bir deyişle, sistemin yapması gerekeni ve bekleneni yaptığının kriterlere göre tespit edilmesi, delillerle ispatlanması ve dokümanlar ile kanıtlanmasıdır
- İlaç üretiminde sıfır hata için üretimin her aşaması ayrı ayrı ve toplu olarak valide edilmiş olmalıdır
- Bu amaçla, binalar, üniteler, sistemler, makine ve ekipmanlar, bakım programları, bilgisayar sistemleri, temizlik işlemleri, dezenfeksiyon, güvenlik, ürünler ve yöntemler valide edilmelidir

Mikrobiyolojik validasyon

- Hava ve havalandırma sistemi
- Su ve su sistemi
- Makine, ekipman ve yüzeyler
- Personel
- Temizlik ve dezenfeksiyon
- Sterilizasyon → Otoklav, tünel, sıvı dolum, toz dolum validasyonları yapılır
- Her bir sistem yada işlem için farklı ve özellikle kritik noktalardan çok sayıda örnekler alınarak mikrobiyolojik açıdan kontrolleri yapılmalı
- Örnek alma ve kontrol işlemleri en az üç kez tekrarlanmalı
- Sonuçların en az 3 kez arka arkaya uygun bulunduğu kanıtlanmalıdır



Validasyon ne zaman yapılmalı?

- Validasyon yapmak GMP kurallarına göre zorunludur
- Normal koşullarda en az yılda 1-2 kez rutin olarak yapılmalıdır
- Rutin dışında validasyon yapılmasını gerektiren durumlar:
 - * Binaların ve proseslerin ilk kuruluşlarında
 - * Yeni bir alet, makine yada ekipman kullanılmaya başlandığında
 - * Yöntemlerde herhangi bir değişiklik yapıldığında
 - * Formülasyonda herhangi bir değişiklik yapıldığında
 - * Makine yada aletlerde meydana gelen arızalar sonrasında
 - * Üretime belirli bir süre ara verildiğinde

İlaçların mikroorganizmalar üzerine etkileri:

- Antibiyotikler,
- Tüm antimikrobiyal ajanların,
- Yeni aday moleküllerin (antimikrobik peptitler, katyonik steroidal antibiyotikler, çeşitli bitki ekstraktları, kimyasal sentez yoluyla elde edilen maddeler, vb.)

Antimikrobiyal aktivite deneyleri:

- ✓ **Farmakopeye göre potens belirlenmesi,**
- ✓ Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi,
- ✓ Minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) belirlenmesi,
- ✓ Minimum biyofilm inhibe / eradike edici konsantrasyonların (MBİK, MBEK) belirlenmesi,
- ✓ Mikroorganizmaların yüzeye yapışmasının ve biyofilm oluşumunun engellenmesi,
- ✓ Fraksiyonel inhibisyon katsayısının (FİK) checkerboard yöntemi ile belirlenmesi,
- ✓ Antibiyotik sonrası etkinin (ASE / PAE) belirlenmesi,
- ✓ Zamana bağlı öldürme yöntemi (TKK) ile bakterisidal aktivite ve kombinasyonların etkinliklerinin belirlenmesi

Antibiyotiklerde mikrobiyolojik yöntemle potens belirlenmesi

- Potens : Antibiyotiğin % aktivitesi / miktarı
- Tüm farmakopelerde (ABD, Avrupa, Japonya ...vs.) antibiyotiklerin aktivite tayini için hem kimyasal hem de mikrobiyolojik yöntem esas olarak bildirilmekte ve yapılması zorunlu testler arasında yer almaktadır.
- Bu tayinler antibiyotiğin özelliklerine bağlı olarak katı besiyerinde difüzyon yada sıvı besiyerinde türbidimetrik yöntemlerle yapılabilmektedir.
- Mikrobiyolojik yöntemle antibiyotik aktivite tayininin gerek hammadde, gerekse yarı mamul ve bitmiş ürün aşamasındaki tüm antibiyotik preparatlarına, tüm kullanım koşulları için ayrı ayrı uygulanması gerekmektedir.
- Her iki yöntemde de farmakope tarafından bildirilen duyarlı bir mikroorganizmaya karşı gerek referans gerekse tayini yapılacak olan antibiyotik aynı koşullar altında ve belirli doz aralıklarında etki ettirilerek elde edilen grafik yardımıyla antibiyotiğin aktivitesi belirlenir.



Teşekkürler.....