

## Kozmetik Ürünlerde Bakteriyal ve Fungal Kompozisyonun Klasik Yöntemler ve PCR Yöntemi Kullanılarak Saptanması<sup>1</sup>

Aylin İ. Yavaşal Çarıkçı<sup>2</sup>, Füsün Uçar<sup>3</sup>, H. Tansel Yalçın<sup>4</sup>

### Özet

Bu çalışmada Türkiye'de kozmetik ürün satan firmalara ait 43 adet hiç açılmamış, 84 adet kullanılmış toplam 127 adet kozmetik ürün ile çalışılmıştır. Ürünler ambalaj tiplerine göre sınıflandırılmıştır.

Kozmetik ürünlerde hem Türk standartları hem de Amerikan farmakopisine göre bulunmaması gereken, patojen bakteriler olan *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve patojen bir maya olan *Candida albicans* 'ın aranması amaçlanmış, ancak *S. typhimurium* ve *C. albicans* örneklerden izole edilemediğinden, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* hem klasik yöntemlerle hem de moleküler biyolojik yöntemlerle tanılanıp, yöntemler arasında korelasyon varlığının kontrolü yapılmış hem de standart organizmalarla ürünler kontamine edilerek direkt olarak ürünlerden bakteriler saptanmıştır.

Ürünlerde en az kontaminasyon sprelerde, en fazla kontaminasyon ise kavanoz ve tüp ambalajlı ürünlerde görülmüştür. Kullanılmamış ürünlerde %28,57 ve kullanılmış ürünlerde %63,88 oranı ile ambalaj grupları içinde bakteri kontaminasyon oranı en yüksek olan grup kavanozlar olmuştur.

### Giriş

Çağlar boyu güzel görünmek, güzel kalmak, bakımlı bir cilde sahip olmak insanlar için son derece önemli olmuştur. Güzellik anlayışı çağlara ve toplumlara göre değişse de insanlar her zaman süslenmeye önem vermişlerdir. Buna bağlı olarak da kozmetik kullanımı o çağlardan günümüze dek devam etmektedir.

Sağlık bakanlığının 1994'de yayınlamış olduğu yönetmelikte kozmetik; insan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve genital organlar gibi değişik dış kısımlarına, ağız ve dişlere veya mukozaya uygulanmak üzere hazırlanmış, amacı ve yan amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek suretiyle iyi bir durumda muhafaza etmek, görünümünü değiştirmek ve vücut kokularını düzeltmek olan, saç boyaları ve saç açıcıları da dâhil bütün preparatlar veya maddelerdir (1).

<sup>1</sup> Bu çalışma Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Prof. Dr. Füsün Uçar danışmanlığında hazırlanıp, Ekim 2004 tarihinde tamamlanan "Kozmetik Ürünlerde Bakteriyal ve Fungal Kontaminasyonun Klasik Yöntemler ve PCR Yöntemi Kullanılarak Saptanması" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır.

<sup>2</sup> Dr., Ege Üniversitesi Ecz. Fak. Bornova, İzmir.

<sup>3</sup> Prof. Dr., <sup>4</sup> Dr. Ege Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji AbD İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: [fusun.b.ucar@ege.edu.tr](mailto:fusun.b.ucar@ege.edu.tr)

Kozmetik ürünler bileşimindeki maddeler nedeniyle mikroorganizmaların üremesi için uygun ortamlar oluşturmaktadırlar. Kozmetik ürünlerin mikrobiyal kalitesi de içeriğindeki hammaddeler ve suyun yanı sıra çevresel faktörlerden de etkilenmektedir (2).

Kozmetik ürünlerin steril olma zorunluluğu olmamasına rağmen, kontamine ürünlerin kullanılması sonucunda hasarların ortaya çıkması, kozmetik endüstrisinde hijyenik üretim şartları ve yöntemlerin uygulanmasına neden olmuştur (3).

Kozmetiklerin kontaminasyonu ile ilgili ilk olay 1946'da Yeni Zelanda'da 4 bebeğin, *Clostridium tetani* ile kontamine talk pudrasının kullanılmasıyla ölmesidir (4, 5). Yine 1963 yılında tiroid tozu tabletlerini kullananlarda *Salmonella* enfeksiyonlarına rastlanmıştır (6). *P. aeruginosa* içeren bir göz damlasını kullanan hastalarda yaygın göz enfeksiyonlarının olduğu bildirilmiştir. *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp. ile kontamine olan kozmetik ürünlerin kullanımına bağlı nazokomiyal enfeksiyonlar ve epidemiler bildirilmiştir (7).

Kozmetik ürünlerin oluşturduğu tehlikeler, bu alanda çalışanların dikkatini çekmiştir ve değerlendirmek üzere çalışmalar yürütülmeye başlanmıştır (8).

Kozmetik üreticileri, ürünlerin görünümünün düzgün ve güvenli olduğundan, zararlı mikroorganizma içermediğinden emin olmak zorundadır. Ürün piyasaya sunulmadan önce ürün güvenliğinden emin olmak için üretim ve geliştirme sırasında çeşitli testler yapılmaktadır (9, 10, 11).

Amerikan farmakopisi (US Pharmacopea, USP)'ne göre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium* gibi 4 farklı bakterinin ve *C. albicans* mayası ve *Aspergillus niger* küfünün biyostatik etkinlik testlerinde indikatör olarak kullanıldığı ve kozmetik ve farmasötik ürünlerde hiçbir şekilde bulunmaması gerektiği bilinmemektedir.

Yurdumuzda Türk Standartları Enstitüsü (TSE)'nin uyguladığı, 1994 yılında yayınlanan Kozmetik Yönetmeliği'nde belirtilen mikrobiyolojik kalite sınırları ağız çevresi ürünleri dışında CTFA'nın belirlediği sınırlarla uyumludur. Ağız çevresi ve ürünleri için TSE gram veya mililitrede 100'den az mikroorganizma bulunmasını koşul olarak getirmektedir (1).

Mikrobiyal kontaminantları saptamak, geleneksel olarak onların kültürlerinin yapıldığı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Ancak yeni moleküler yöntemler kontamine örneklerdeki mikroorganizma saptanmasında daha hızlıdır (12, 13, 14).

Kozmetik ürünlerde, mikrobiyal kontaminasyon varlığının saptanması, klasik geleneksel yöntemlerle çok uzun zaman almaktadır ve zordur. Çünkü her bir mikroorganizmanın tek tek izolasyonu, sayımı ve identifikasyonu zaman alıcıdır. Bu nedenle mikrobiyal kontaminasyonun saptanması için hızlı yöntemlere gereksinim vardır. Bu amaçla 90'lı yıllardan bu yana hızlı yöntemler geliştirilmiştir. Antibody-based assay, Visual immuno assay, nükleik asit tabanlı metotlar, otomatik enstrümantal sistem, flow cytometry ve ATP biyoluminescent bakteri identifikasyonunda ve sayımında kullanılmıştır (15, 16, 17, 18, 19). Bu metotlar mikrobiyal türler ve suşlar arasında hızlı, spesifik ve yüksek derecede ayırıcı sonuçlar vermektedir. Bunlar ATP ve DNA gibi esansiyel moleküllerin hızlı saptanması temeline dayanmaktadır (20, 21, 22).

Bunlar içinde PCR teknolojisi, gıda, su ve klinik örneklerin hızlı mikrobiyal incelenmesi için geliştirilmekte ve onaylanmaktadır (21, 22, 23, 24).

Ayrıca kozmetik ve farmasötik ürünlerde oldukça hızlı ve doğru bir şekilde bakteri ve mayaların saptanmasında kullanılmıştır (13, 14).

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı kozmetik ürünlerde bulunmaması gereken 4 patojen bakteri ve bir patojen mayanın hem klasik yöntemlerle hem de moleküler biyolojik yöntemlerle identifikasyonları yapılarak, yöntemler arasında korelasyon varlığının kontrolünün yapılması, standart organizmalarla ürünler kontamine edilerek direkt olarak ürünlerden bakteri ve mayanın saptanması, ayrıca ambalajın kontaminasyona etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Örneklerin Toplanması

Daha önce de belirtildiği gibi ambalaj, ürünün kontaminasyonunda çok önemlidir. Bu nedenle kozmetik ürünler ambalaja göre sınıflandırılarak örnekler alınmış ve kullanılmış örneklerdeki kontaminasyon hakkında bilgi sahibi olmayı sağlayan ambalajın kontaminasyona etkisi de görülmüştür.

Türkiye'de kozmetik ürün satan firmalara ait çeşitli krem, losyon, temizleme losyonu, tonik ürün gruplarından 43 adet hiç açılmamış, 84 adet kullanılmış toplam 127 adet kozmetik ürün örneği ile çalışılmıştır. Türkiye'de üretilen kullanılmamış kozmetik ürünler farklı satış yerlerinden (parfümeri, eczane, pazar) temin edilmiştir. Kullanılmış ürünler ise ürünleri kullanmakta olan tüketicilerden elde edilmiştir. Ürünler ambalaj tiplerine göre sınıflandırılmıştır. Çalışılan 127 kozmetik ve ürünün ambalaj tiplerine göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışılan kozmetik ürünün ambalaj tiplerine göre dağılımı

Ambalaj Grupları	Kullanılmamış	Kullanılmış	Toplam Ürün Sayısı
Tüp; Krem	12	27	39
Kavanoz; Krem	21	36	57
Vidalı Kapaklı Şişe; Tonik	1	2	3
Pompaşlı Şişe; Losyon	4	8	12
Sprey; Losyon	5	11	16
Toplam	43	84	127

### Kullanılan Test Mikroorganizmaları

*Escherichia coli* ATCC 35218  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
*Salmonella typhimurium* ATCC 13311  
*Candida albicans* ATCC 10231

### Primerler

*P. aeruginosa* için PAL 1 ve PAL 2 DNA primerleri kullanılmıştır.

Bu primerler oprL membran proteini için kod oluşturan 504 baz çiftlik fragmanı amplifiye etmek için kullanılmıştır (25). *E. coli* için 1,1 kb'lık Pst I DNA fragmentini spesifiye eden afa operonu kullanılmıştır (26). *S. aureus* için; *Staphylococcus enterotoksini* olan entCI geninin 801 baz çiftlik bölgesini amplifiye etmek için 25 baz çiftlik primerler kullanılmıştır (27). PCR reaksiyonunda kullanılan primerler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Organizma	Hedef Bölge	BP	Dizi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OpR L	504	Pal 1 Forward 5' ATGGAAATGCTGAAATTCGGC 3' Pal 2 Reverse 5' CTTCTTCAGCTCGACGCGACG 3'
<i>Escherichia coli</i>	Afa	750	Afa 1 Forward 5' GCTGGGCAGCAAAGCTGATAACTCTC 3' (1-26 nükleotitleri arası) Afa 2 Reverse 5' CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG 3' (5313-5288 nükleotitleri arası)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ent CI	801	Forward 5' ATGAATAAGAGTCGATTTATTTTCAT 3' (1-25 nükleotitleri arası ) Reverse 5' TTATCCATTCTTTGTTGTAAGGTGG 3' (118-142 nükleotitleri arası)

## Klasik Yöntemlerle Örneklerin Hazırlanması ve Toplam Canlı Sayısının Hesaplanması

Krem tipi kozmetik ürünler yağlı ve suda çözünmeyen preparatlardır. Bakterilerin sulu faza geçmesi ve dispersiyon için yüzey aktif ajanlardan yararlanılması gerekmektedir. Bu amaçla önerilen yüzey aktif ajanlardan, mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi düşük düzeyde olan Tween 80 (Art 822187, Merck) seçilmiştir (28, 29). Krem ve losyonlardan steril koşullarda tartılarak 1 gramlık, toniklerden de 1 ml örnekler alınmış, örneklerin üzerine 0,5 ml Tween 80 ve 8,5 ml Trypticase Soy Broth (TSB) eklenmiştir. Ardından karışım dispersiyonu kolaylaştırmak için 45 °C'lik çalkalamalı su banyosunda tutularak homojenizasyon gelişinceye dek tutulmuştur (30). Mikroorganizmaların canlılığını yitirmemeleri için bu sürenin 30 dakikayı aşmamasına özen gösterilmiştir. Böylece Tween 80 oranının %5 olduğu 1/10'lük dilüsyon elde edilmiştir. 1/10'lük dilüsyondan koloni sayımı yapılamayacak kadar çok olması ihtimaline karşı 1 ml alınarak 9 ml TSB ile 1/100'lük ve 1/1000'lik dilüsyonlar hazırlanmıştır (31).

Bu dilüsyonlardan 1'er ml alınarak Petri kutularına aktarılmış, üzerlerine Plate Count Agar (PCA) besiyeri dökülmüştür. Dilüsyonlar için paralel ekimler yapılmıştır. 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılan Petri kutularında gelişen koloniler sayılarak toplam canlı sayısı hesaplanmıştır.

## Örneklerdeki Bakteri ve Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Hazırlanan dilüsyonlardan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* ve *C. albicans*'ın aranması için gerekli olan seçici besiyerlerine ekimler yapılmıştır. 37 °C'de 24-48 inkübasyondan sonra seçici besiyerlerinde oluşan tipik koloniler dışındaki koloniler de seçilerek toplam 57 izolat elde edilmiştir. *S. typhimurium* aranması için gerekli ön zenginleştirme yapıldıktan sonra seçici katı besiyerine ekim yapılmıştır.

*E. coli* kontaminasyonunun saptanması için EMB Agar, *S. typhimurium* için Bizmut Sülfid Agar, *P. aeruginosa* için *Pseudomonas* İzolasyon Agara, *S. aureus* için Baird Parker besiyerlerine ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra gelişen koloniler Trypticase Soy Agara (TSA) ekilmiştir. Ayrıca *C. albicans* mayasının aranması için *Candida* ID agara, diğer mayalar ve filamentli funguslar için genel besiyeri olan Sabaroud Dekstroz Agar'a (SDA) ekimler yapılmıştır. *Candida* ID agar 24-48 saat 37 °C'de, SDA'da 25 °C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Bakterilerin genel olarak tanımlanmasında öncelikle oluşan kolonilerin özellikleri değerlendirilmiştir. Yukarıda bahsedilen besiyerlerinde oluşan tipik koloniler ve diğer kolonilerden örnekler alınarak TSA besiyerine aktarılmış, 24 saat 37 °C'de inkübasyondan sonra Gram boyama yapılarak bakterinin gram reaksiyonu ve morfolojisi saptanmıştır. Daha sonra biyokimyasal testler uygulanmıştır. *Staphylococcus* genusunda patojenite testi için koagülaz testi yapılmıştır. Koagülaz testi pozitif olanlar *S. aureus* olarak değerlendirilmiş, koagülaz testi olumsuz olanlar koagülaz negatif *Staphylococcus* sp. şeklinde tanımlanmıştır.

Gram negatif fermentatif ve non-fermentatif basillerin identifikasyonu için oksidaz testleri, karbonhidrat fermentasyon testleri, laktöz kullanımı, İMViC testleri, üre hidrolizi, H<sub>2</sub>S oluşturma ve DNase testleri yapılmıştır (32, 33, 34). Bu testlerle tanı konulamadığında API 20 E identifikasyon sisteminden yararlanılmıştır.

*Candida* ID agar ve SDA'da üreyen maya ve filamentli fungusların identifikasyonu ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji laboratuvarında yapılmıştır. Mayaların tanımlanmasında; koloni rengi, üreme sıcaklığı, mikroskopik özellik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır (35).

## DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları fenol kloroform isoamil alkol ekstraksiyonu ile gerçekleştirilmiştir (27). *S. aureus* 'dan DNA izolasyonunda *Staphylococ* 'lar için hazırlanmış hızlı lizis protokolü uygulanmıştır (36, 37). *S. typhimurium* ve *C. albicans* klasik yöntemlerle izole edilemediğinden PCR işlemlerine dâhil edilmemiştir.

## Kozmetik Ürünlerden İzolasyon Yapmadan Direkt Olarak Örneklerden DNA İzolasyonu

Klasik yöntemlerle PCR yöntemini karşılaştırmak ve yöntemin sağlamlasını yapmak amacıyla, hiç açılmamış nemlendirici krem, losyon, temizleme sütü, güneş sütü ve cilt toniği yapay olarak standart bakterilerle kontamine edilmiştir.

Uygulamada 10g örnek 100ml steril TSB besiyerine aktarılıp %4 oranında Tween 80 eklenmiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* 35218, *S. aureus* ATCC 25923, her bir örneğe 100cfu/ml olacak şekilde 24 saatlik kültürden aşılacaktır. 24 saatlik inkübasyondan sonra 10 µl'si üzerine 1mM Tris-0,1 mM EDTA içeren lizis buffer eklenmiştir ve pH 'sı 8 olan %0,5 Tween 80 eklenmiştir. Örnekler, lizisi tam gerçekleştirmek ve proteinleri çöktürmek için 37 °C'de 20 dakika inkübasyondan sonra 10000xg'de 10 dakika santrifüjleme yapılmıştır. Süpernatant PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere ayrılmıştır (38).

## DNA'nın Saflık Kontrolleri ve Miktar Tayinleri

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrede (Varian Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometre) yapılmıştır. Spektrofotometrede DNA'ların 260nm ve 280nm'deki absorpsanları hesaplanmış (OD 260 ve OD 280) ve bu değerler arasındaki oran kullanılarak DNA'nın saflığı kontrol edilmiştir. OD260/OD 280 oranının 1,6 ve 1,8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu, bu aralıktan daha yukarıda olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha aşağıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (39).

Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA'ların miktarlarının hesaplanması için OD260 değeri kullanılmış ve DNA miktarları;

DNA (µg/ml)= OD260 x Seyreltme oranı x 50  
formülü ile hesaplanmıştır (39).

## PCR Uygulamaları

*E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* için PCR reaksiyon karışımları Le Bouguenec ve ark., 1992; De Vos ve ark., 1997; Wilson ve ark. 1991'e göre modifiye edilerek tek bir reaksiyon karışımı şeklinde optimizasyonu sağlanmıştır. DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 15 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir (25, 26, 27).

*E. coli* için PCR şartları; ilk denatürasyon 94 °C'de 1 dk, 30 döngü için her döngüde 94 °C'de 2 dk, 65 °C'de 1dk, 72 °C'de 1dk, PCR tüpleri son döngüden sonra 72 °C'de 2 dk tutulmuşlardır (26).

*P. aeruginosa* için PCR şartları; ilk denatürasyon 94 °C'de 1 dk, 30 döngü için her döngüde 94 °C'de 40 sn, 57 °C'de 40sn, 72 °C'de 50sn, PCR tüpleri son döngüden sonra 72 °C'de 5 dk tutulmuşlardır (25).

*S. aureus* için PCR şartları; ilk denatürasyon 94 °C'de 1 dk, 50 döngü için her döngüde 94 °C'de 30sn, 50 °C'de 30sn, 72 °C'de 30sn, PCR tüpleri son döngüden sonra 72 °C'de 2 dk tutulmuşlardır (27).

PCR ürünlerinin kontrolü %1,5'lük agaroz içeren agaroz jel elektroforezinde yapılmıştır. Fotoğraflama işlemi ve bantların tespit edilmesinde Kodak EDAS 290 jel görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

## Bulgular

### Çalışılan 127 adet kozmetik ürünün ambalaj tiplerine göre kontaminasyon oranları

Çalışılan çeşitli ambalajlara sahip 127 adet örnekte en az kontaminasyon spreylerde, en fazla kontaminasyon ise kavanoz ve tüp ambalajlı ürünlerde görülmüştür. Kullanılmamış ve kullanılmış ambalaj grupları içinde en yüksek olan grup kavanozlar olmuştur (%28,57 ve %77,78). Toplam 127 adet örnekte 43 kullanılmamış kozmetik ürün örneğinin %18,60'ında bakterilerle %2,33'ünde mayalarla kontaminasyon saptanmıştır. 84 adet kullanılmış örnekte %47,62'sinde bakterilerle, %5,95'inde ise mayalarla kontaminasyon saptanmıştır.

### Ambalaj tipine göre sınıflandırılan örneklerdeki toplam canlı sayıları

Kullanılmamış kozmetik ürünlerinin sadece 1 tanesinde gramda  $10^3$ 'ü aşan koloni sayısı saptanmıştır. Kullanılmış ürünlerde ise, sadece 3 kavanoz, 3 tüp, 1 pompalı şişe ambalajlı ürünlerde  $10^3$ 'ü aşan koloni sayısı saptanmıştır. Çalışılan ürünlerin toplam %6,30'unda gramda  $10^3$ 'ü aşan koloni sayısı hesaplanmıştır.

### Çeşitli ambalaj gruplarına dâhil örneklerden izole edilen bakteri ve maya genus ve türleri

Denemeye alınan 127 örneğin hiçbirinde *S. typhimurium* ve *C. albicans* 'a rastlanmamıştır. Dolayısıyla çalışmamızın amacı olan ve USP'ye göre kozmetik ürünlerde bulunması istenmeyen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* ve *C. albicans*'tan *S. typhimurium* ve *C. albicans* 'a rastlanılmadığından çalışmamıza diğer 3 bakteriyle devam edilmiştir. 2 adet kullanılmış kavanoz ambalajlı ürünlerde *E. coli*, kullanılmamış 1 tüp, kullanılmış bir pompalı şişede *P. aeruginosa*, kullanılmış 1 tüp ve 1 kavanoz ambalajlı üründe *S. aureus* 'a rastlanmıştır. Çeşitli ambalaj gruplarına göre bakteri ve mayaların dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir. Seçici besiyerinde koloni oluşturan ve AP 20E ile saptanan toplam 51 adet bakteri ve *Candida* 'nın 3 genusuna ait 6 tür izole edilmiştir.

### PCR Sonuçları

Çalışmamızda PCR uygulamalarındaki her bir bakteri için farklı DNA primeri kullanılmıştır. *P. aeruginosa* için oprL membran proteini için kod oluşturan 504 baz çiftlik DNA fragmentini amplifiye eden PAL1 ve PAL2 DNA primerleri kullanılmıştır. *E. coli* 'nin 750 baz çiftlik PstI DNA fragmentine spesifik olan afa operonu için, Afa1 ve Afa2 primerleri kullanılmıştır. Zira kullanılmış ürünlerden elde edilen *E. coli*, hastanenin üroloji kliniğinde çalışan personelin kullandığı materyal olduğundan bu primer üropatojenik *E. coli* 'yi saptamakta kullanılan primer olup tip tür de üropatojenik kökenli bir türdür. *S. aureus* için stafilokok enterotoksini olan entCI geninin 801 baz çiftlik bölgesini amplifiye eden 25 baz çiftlik primerler kullanılmıştır (25, 26, 27).

Tablo 3. Çeşitli ambalaj gruplarına dâhil örneklerden izole edilen bakteri ve maya genus ve türleri

Bakteri ve Maya Türleri	Tüp		Kavanoz		Vidalı K. Şişe		Pompalı Şişe		Sprey		Toplam
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2
<i>Pseudomonas putida</i>	-	1	2	1	-	-	-	-	-	-	4
<i>Stenotrophomons maltophila</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	2	-	7	-	-	-	-	-	-	9
<i>Pasteurella pneumotica</i>	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	2
<i>Serratia sp.</i>	-	4	-	2	-	-	-	-	-	-	6
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>S. aureus</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
Koagülaz - <i>Staphylococ</i>	1	5	3	7	-	-	-	1	-	2	19
<i>Enterobacter sp.</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>Candida tropicalis</i>	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	3
<i>C. pseudotropicalis</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Toplam Mikroorganizma	3	16	6	27	0	1	0	2	0	2	57

A: Kullanılmış; B: Kullanılmamış

Kozmetik ürünlerde uygulanan, %10'luk hacme 100cfu/g bakteri hücreleri ile yapay olarak aşılama 24 saatlik ön zenginleştirmeden sonra 10µl hacimdeki solüsyonla gerçekleştirilen uygulama iyi PCR sonuçları vermiştir.

Bakteri DNA'larının kontrolü RAPD (Random amplified polimorphic DNA) metodu ile yapılmıştır (40). İki farklı örnekten izole edilen *E. coli* (2 ve 3 nolu bantlar); standart *E. coli* (1 nolu bant) ve ürünlere aşılama standart *E. coli* 'nin (4, 5, 6, 7, 8 nolu bantlar) test sonuçları şekil 1'de gösterilmiştir. Örneklerden izole edilen *S. aureus* (2 ve 3 nolu bantlar), tip tür ve ürünlere aşılama standart *S. aureus* 'un PCR sonuçları şekil 2'de gösterilmiştir. İki farklı örnekten izole edilen *P. aeruginosa* (2 ve 3 nolu bantlar), tip tür (1 nolu bant) ve ürünlere aşılama standart *P. aeruginosa* 'nın test sonuçları şekil 3'te gösterilmiştir.

Şekillerden de görüldüğü gibi klasik yöntemlerle tanısı yapılan bakterilerin ve standart bakterilerin saptanması, moleküler biyolojik yöntemlerle de aynı sonucu vermiştir. Dolayısıyla zaman alıcı, uğraştırıcı ve hacimli olan klasik yöntemler yerine direk örnekten PCR yöntemi ile minimum örnek hazırlığı, kullanım kolaylığı sayesinde bakterileri saptamak ve tanılamak mümkün olabilmektedir. Ayrıca 5-6 gün süren klasik yöntemlerle bakteriyel kontaminasyonun saptanması, PCR yöntemi ile 27-30 saate düşmüştür.

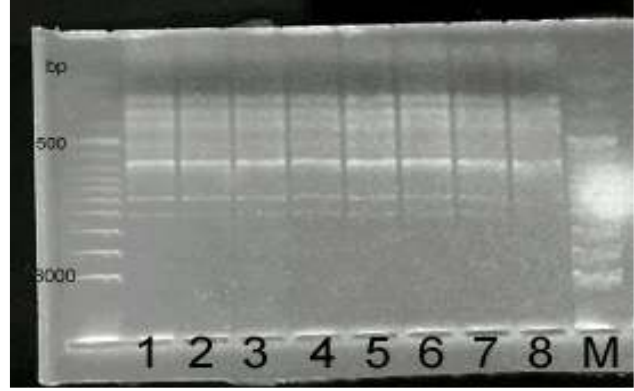
## Tartışma ve Sonuç

Kozmetik üreticileri son yıllarda mikrobiyal kontaminasyondan kaynaklanan, ekonomik zararların büyük olmasından dolayı ürünlerdeki kontaminasyonun önüne geçebilmek için büyük oranda para ve emek sarf etmektedirler (41).

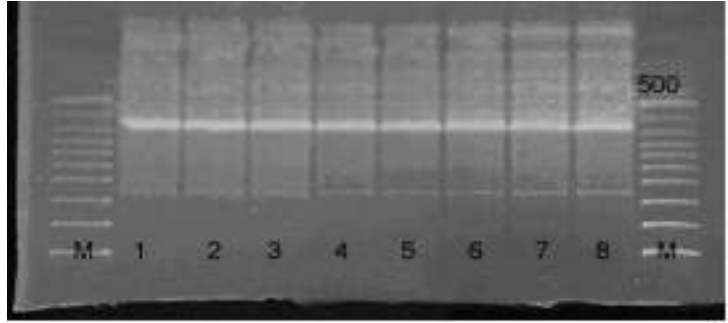


Kontaminasyon, ürünün üretiminde kullanılan sudan, hammaddelerden, paketleme materyalinden, personelden, üretim tesis ve donanımından, çevre ve depolama koşullarından kaynaklanabilmektedir (2). Kozmetik ürünlerinin üretiminde, iyi imalat uygulamaları ile mikrobiyal kalite yükseltilebilmektedir. Kontaminasyon, kozmetik endüstrisinde hijyenik imalat şartları ve yöntemlerin uygulanması ile uygun prezarvatiflerin kullanılmasına yol açmıştır (3).

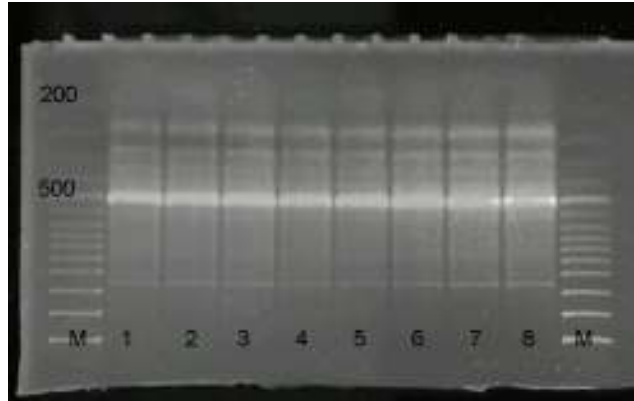
Şekil 1: Farklı örneklerdeki *Escherichia coli* saptaması. 1; Standart strain (*E. coli* ATTC 35218), 2 ve 3; Klasik yöntemlerle örneklerden izole edilen *E. coli*, 4; Nemlendirici kreme aşılama yapılmış olan standart *E. coli*, 5; Cilt losyonuna aşılama yapılmış olan standart *E. coli*, 6; Temizleme sütüne aşılama yapılmış olan standart *E. coli*, 7; Güneş sütüne aşılama yapılmış *E. coli*, 8; Cilt toniğine aşılama yapılmış *E. coli*, M: Marker, (100bp Gene Ruler: 100-3000 bp)



Şekil 2: Farklı örneklerdeki *S. aureus* saptanması. 1; Standart strain (*S. aureus* ATTC 25923), 2 ve 3; Klasik yöntemlerle örneklerden izole edilen *S. aureus*, 4; Nemlendirici kreme aşılama yapılmış olan standart *S. aureus*, 5; Cilt losyonuna aşılama yapılmış olan standart *S. aureus*, 6; Temizleme sütüne aşılama yapılmış olan standart *S. aureus*, 7; Güneş sütüne aşılama yapılmış *S. aureus*, 8; Cilt toniğine aşılama yapılmış *S. aureus*, M: Marker, (100bp Gene Ruler: 100-3000 bp)



Şekil 3: Farklı örneklerdeki *P. aeruginosa* saptaması. 1; Standart strain (*P. aeruginosa* ATTC 27853), 2 ve 3; Klasik yöntemlerle örneklerden izole edilen *P. aeruginosa*, 4; Nemlendirici kreme aşılama yapılmış olan standart *P. aeruginosa*, 5; Cilt losyonuna aşılama yapılmış olan standart *P. aeruginosa*, 6; Temizleme sütüne aşılama yapılmış olan standart *P. aeruginosa*, 7; Güneş sütüne aşılama yapılmış *P. aeruginosa*, 8; Cilt toniğine aşılama yapılmış *P. aeruginosa*, M: Marker, (100bp Gene Ruler: 100-3000 bp)



Ürünü kullanan tüketicinin de hijyen kurallarına uyması önemlidir, ürünü saklama ya da kullanma şekli kontaminasyonda etkili olmaktadır. Ambalaj tasarımı kullanım sırasında mikroorganizmalar ile en az etkileşimi sağlayacak formda olmalıdır. Ayrıca ambalajlanan ürünün miktarını azaltmak kontaminasyon olasılığını da azaltmaktadır (42, 43).

Çalışmamızda en az kontaminasyon, kullanılmış cilt solüsyonu içeren sprelerde %18,18 oranında saptanmıştır. 1990 yılında yapılan bir çalışmada, kullanılmış 138 kozmetik ürün içerisinde en az kontaminasyonu cilt losyonu içeren pompalı şişelerde %10 olarak bulmuşlardır. En fazla kontaminasyonu kullanılmış cilt solüsyonu içeren vidalı kapaklı şişelerde %71 olarak saptamışlardır (44). Bizim çalışmamızda da pompalı şişelerdeki kontaminasyon oranı %16,67 olarak bulunmuştur. Kullanılmamış ürünlerde en fazla kontaminasyon ise kavanoz ve tüp ambalajlı ürünlerde sırasıyla %28,57 ve % 25, kullanılmış ürünlerde %77,78 ve % 44,44 şeklinde bulunmuştur. Kullanılmış tonik içeren vidalı kapaklı şişe ambalajlı üründe kontaminasyon oranı ise %33,3 olarak saptanmıştır.

1998 yılında kozmetik ürünlerdeki prezervatif etkinlik testi çalışmalarında, prezervatif eklenmemiş vidalı kapaklı şişedeki şampuanların %46'sının, prezervatif eklenmemiş geniş ağızlı kavanoz ambalajlı cilt losyonlarının %97'sinin kontamine olduğunu bildirmiştir. Yine iyi prezerve edilmiş fiske kapaklı şişedeki şampuanların ve geniş ağızlı kavanoz ambalajlı cilt losyonlarının hiç kontamine olmadığını belirtmiştir (43). Bizim çalışmamızda da kavanoz ambalajlı ürünlerin kontaminasyon oranı %59,65 olup en yüksek kontaminasyon oranına sahip olduğu saptanmıştır.

Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi için bakteri, küf ve maya sayımı yapılmaktadır. Bundaki amaç ürünlerin içerdiği mikroorganizma sayısının saptanması, dolayısıyla ürünün kullanılabilirliği açısından bilgi vermesidir. Elde edilen sonuçlar standartların limitleri dâhilinde olmalıdır. Standartları aşan mikroorganizma varlığı ürünün kullanımının sakıncalı olduğunu göstermektedir. 1994 yılında yayınlanan Kozmetik Yönetmeliğinde gram veya mililitrede patojen olmayan mikroorganizma sayısının üst sınırı 1000, bebek kozmetik ürünleri ve göz kozmetik ürünlerinde 500, ağız çevresi ürünleri için 100 koloni olarak belirtilmiştir (1).

Ayrıca hem Türk Kozmetik Yönetmeliğine hem de Amerikan farmakopisine göre kozmetik ürünlerde insan sağlığı için tehlike oluşturan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *C. albicans* ve *A. niger* 'in kozmetik ürünlerde bulunmaması gerekmektedir (1, 45). Avrupa farmakopisi de bunlara ek olarak *Enterobacter* genusuna ait bazı bakterileri de eklemiştir (13). Bu yönerge ve düzenlemelere rağmen ürün bozulmasındaki mikrobiyal kontaminasyonun etkisi hala dünya çapında majör etken olarak görülmektedir. Yayınlanmış bilimsel çalışmalara göre *Enterobacter*, *Pseudomonas* sp., *Burholderia cepacia* ve küfler kozmetik ürünlerde en fazla bulunan kontaminantlardır. USP'nin test bakterileri olan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *S. typhimurium* dış macunlarında, tropikal ürünlerde, şampuanlarda, oral solüsyonlarda, ilaç ve dezenfektanlarda saptanmıştır (46). Bu kontaminasyonlar hammaddeden, sudan kaynaklanmakta ya da kötü imalat uygulamaları sırasında bulaşmıştır. Araştırmamızda USP'nin 4 test bakterisinden biri olan *S. typhimurium* hariç diğer 3 bakteri 5 kullanılmış ve 1 kullanılmamış üründe saptanmıştır.

Çalışılan 127 kozmetik ürünün %37,80'inde bakterilerle, %4,72'sinde mayalarla kontaminasyon saptanmıştır. Kozmetik ürünlerde Dawson ve Reinhardt (1981) %92, Wong ve ark. (2000) %89 oranında bakterilerle kontaminasyon saptamışlardır (47,48). Abdelaziz ve ark. (1989) mısır yapımı kozmetik ürünlerde %36, Anelich ve Korsten (1996) %7, Dawson ve Reinhardt (1981) %0,1 oranında maya kontaminasyonunu bildirmişlerdir (47,49,50). Wong ve ark, (2000) yılında örneklerinde %7 oranında maya ve küf kontaminasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada kullanılmış kozmetik ürünlerin %6,3'ünde CTFA kriterlerine uymayan düzeyde koloni sayımı yapılmıştır (48). Bu oran Anelich ve Korsten'in Güney Afrika'da 1996 yılında bildirdikleri %71,73'lük, Tran ve Hitches'in 1994'de bildirdikleri %95,01'lik orandan oldukça düşüktür (50, 51).

Çalışmamızda kullanılmış kozmetik ürünlerin %57,48'inde hiç kontaminasyona rastlanmazken, Anelich ve Korsten'in 1996'daki çalışmasında bu oranın %28,26 olduğunu bildirmiştir (50). Bu araştırmacının kontaminasyon oranı bizim çalışmamızdan yüksektir.

Çalışmamızda kullanılmamış kozmetik ürünlerdeki koloni sayımları 1 ürün dışında CTFA kriterleri ile uyumlu bulunmuştur. Kullanılmamış ürünlerde mililitre ve gramda  $10^3$ 'ü aşan koloni sayımları 1989'da Akın ve Altanlar tarafından %40,74, 1987'de Ergun ve arkadaşları tarafından %22,5 olarak bildirilmiştir. Aynı oranlar kullanılmamış şampuanlarda Ergun ve arkadaşları tarafından %23,68, 1997'de Kabukçu tarafından %33,64 şeklinde saptanmıştır. Kullanılmış kremlerde ise bu oranlar, Abdelaziz ve ark. (1989) tarafından %27, Ergun ve ark. tarafından %13,33, Okeke ve Lamikanra (2001) tarafından ise %16,3 olarak bildirilmiştir (52, 53, 54, 55).

Bu çalışmada en sık izole edilen bakteri, izolatların %33,33 oranıyla koagülaz negatif *Staphylococlar* 'dır. KNS'ler vücutta hastalık oluşturmadan bazı bölgelerde yer alırlar, deride orofarinkste ve gastrointestinal kanalda kalıcı olarak bulunurlar. Normal flora bakterisi olarak tanımlanmakla beraber genel olarak yabancı cisim, katater, shunt enfeksiyonlarına neden olur. Yapay kalp kapağına bağlı endokardit, prostetik kalça eklemi sendromları, periton diyalizine bağlı enfeksiyonların en önemli etkeni KNS (özellikle *S. epidermidis*)'dir (56). Tran ve Hitchins'in 1994'deki 3027 adet test kitiyle yaptıkları araştırmalarında izolatlarının %60'ından fazlasının *Staphylococcus* sp. ve *Micrococcus* sp. gibi tipik insan florasından oluştuğunu bildirmişlerdir ( 51).

Ergun ve arkadaşları (1987), kullanılmamış 62 kozmetik ürünün 2'sinde (%3,22), Kabukçu (1997), kullanılmamış 104 şampuanın 3'ünde (%2,88), Dawson ve Reinhardt (1981) ise kullanılmış ürünlerin %1,0'inde *S. aureus* saptadıklarını bildirmişlerdir (47, 53, 54). Bizim çalışmamızda izole edilen ve *S. aureus* türü olarak tanımlanan 2 ayrı izolattan 2'si de kullanılmış ürünlerden izole edilmiştir. *S. aureus* doğada en sık rastlanılan ve burun delikleri, koltuk altı, vagina, farinks ve hasarlı deri yüzeyinde kolonize olabilen bir bakteridir. Enfeksiyon, deri ve mukoza bariyerinde bozulma sonucu stafilokokların doku içine veya kan dolaşımına girmesiyle başlar (31). *S. aureus* 'un yaptığı hastalıklar arasında başta abse, fronkül, karbonkül, impetigo, panasir gibi deri ve mukoza enfeksiyonları, çoğunlukla çocuklarda görülen Stafilokoksik soyulmuş deri sendromu (Scalled skin syndrom) gelmektedir. Çoğunlukla deri enfeksiyonlarının %70'i *S. aureus* nedeniyle oluşmaktadır. Son yıllarda *S. aureus* 'a bağlı hastane enfeksiyonlarında artış bildirilmektedir, enfeksiyonların önlenmesi için en önemli uygulama ellerin yıkanmasıdır.

Cildin kozmetik kremlerle nemlendirilmesi sonucu değişen nem durumundan dolayı mikroorganizmalarla enfeksiyon riski artmaktadır, kremin kontamine olma durumunda ise enfeksiyon riskinin ne derece artacağı dikkate alınmalıdır (49).

Çalışmamızda izole edilen patojen bir bakteri olan *P. aeruginosa* 127 örneğin sadece 2'sinde saptanmıştır. *Pseudomonas* bulunduğu çevreye çok kolay uyum sağlayabilen, toprakta lağımlarında yaygın olarak saptanan bir bakteri türüdür. *Pseudomonas* sp. su kaynaklarından sıklıkla izole edilen ve deiyonize suda üreyebilen bir bakteridir. Kozmetiklerde bu bakterinin bulunmasının bir tehlike kaynağı olduğu bildirilmektedir (57,58). *Pseudomonas* türleri arasında insanda hastalığa neden olan *P. aeruginosa* 'dır. Bir kozmetik üründe *P. stutzeri* gibi fırsatçı bir patojenin varlığı aynı üründe *P. aeruginosa* 'nın da üreyebileceğinin göstergesi olarak bilinmektedir. *Pseudomonas* sp. antiseptik ve dezenfektan çözeltilerinde de yaşayabilmektedirler. *P. cepacia* dilue losyonlarda ya da zayıf prezervatif etkinliği olan koruyucu içeren ürünlerde üreyebilmektedir (59,60). Bu nedenlerle de pek çok araştırmacı tarafında kozmetiklerde bozulma etkeni olarak *Pseudomonas* sp. sıklıkla izole edilmektedir (27, 49, 60.).

Çalışmamızda *E. coli*, örneklerin 2'sinde, kullanılmış 2 kavanoz ambalajlı üründe saptanmıştır. Abdelaziz ve ark. (1989), incelemeye aldıkları 150 kozmetik üründen sadece 1 tanesinden *E. coli*, Ergun ve ark. (1987), farklı kozmetik ürünlerden elde edilen 14 izolattan 2'sinde *E. coli*, 2'sinde de *Enterobacter* saptamışlardır (49,53). Anelich ve Korsten (1996), araştırmalarındaki 46 kozmetik örnekten %17 oranında *Enterobacter* izole etmişlerdir (50). Kabukçu (1997)'de 104 şampuan örneğinin 2'sinden *E. coli*, Okeke ve Lamikanra (2001), ise 24 krem ve 25 losyondan oluşan 49 üründen 8'inde *E. coli* saptamıştır (54, 55). Araştırmacılar bu konuda, Nijerya'daki su kaynaklarından sıklıkla *E. coli* ve diğer koliform bakteriler izole edilmekte olduğunu ve ürünlerde saptanan kontaminasyonun da, ürünlerin üretimi sırasındaki yetersiz sanitasyon işlemlerinin göstergesi olduğu yorumunu yapmışlardır.

Araştırıldığı kadarıyla kozmetik ürünlerdeki kontaminasyonlarda bakteriyel kontaminasyonun fungal kontaminasyona göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kozmetik ürünlerden izole edilen 57 izolattan 3 tanesi *Candida tropicalis* 'dir. Anelich ve Korsten (1996), bozulmuş kozmetik ürünlerde en çok *C. parapsilosisi* izole etmişlerdir (50).

*E. coli* 'nin PCR ile saptanabilmesi için çeşitli araştırmacılar farklı DNA primerleri kullanmışlardır. Jimenez ve ark., 2000 yılındaki çalışmasında  $\beta$ -D-glukronidaz enzimini spesifiye eden uidA gen bölgesinin 147 baz çiftlik bölgesini amplifiye eden UAL-754 ve UAL-900 primerlerini, 1999 yılındaki çalışmalarında 16s rDNA bölgesini amplifiye eden bakteriyel primerleri kullanmışlardır (46). Farnleitner ve ark., (2000)'de aynı gen bölgesini çevresel sulardaki *E. coli* kontaminasyonunu saptamak için kullanmıştır (61). Bej ve ark. da (1990, 1991a ve 1991b) yaptıkları üç çalışmada LacZ gen bölgesini amplifiye eden primerleri kullanmıştır (62, 63, 64). Bizim çalışmamızda ise Le Bouguenec ve ark. (1992) tarafından önerilen *E. coli* 'nin 750 baz çiftlik PstI DNA fragmentine özgü olan afa operonu için, AFA 1 ve AFA 2 primerleri kullanılmıştır (26). Kullanılmış ürünlerden elde edilen *E. coli*, hastanenin üroloji kliniğinde çalışan personelin kullandığı materyal olduğundan bu primer üropatojenik *E. coli* 'yi saptamakta kullanılan primer olup tip tür de üropatojenik kökenli bir türdür.

Tüm test edilen örnekler PCR reaksiyonunda pozitif sonuç vermiştir. PCR'da sistem hiçbir şekilde yanlış pozitif sonuç vermemiş ve hiçbir çalışmada inhibitör etki saptanmamıştır.

PCR yöntemi ve klasik yöntemlerle yapılan analizler sonucunda %100 uyumluluk görülmüştür. PCR yöntemi ile bakteri kontaminasyonu 30 saatte saptanırken standart yöntemlerle 6-8 günü bulmaktadır. Klinik analizler ve gıda örneklerinde yapılmış olan çalışmalarda yüksek kalitede mikrobiyal DNA eldesi için geniş hacimli ekstraksiyon ve purifikasyon basamakları gerekmektedir (20,23).Örnekten direkt PCR yöntemi ile mikrobiyal kontaminasyonu saptamada ayrıca DNA ekstraksiyonu ve purifikasyona, presipitasyona ve santrifüjlemeye gerek kalmamaktadır. Bu şekilde kozmetik ve farmasötik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geniş hacimli örnek analizlerinde bu yöntemin kullanılabilirliği görülmektedir.

DNA primer sekanslarının mikrobiyal genomide kullanılabilirliğinin avantajı sınırsız olmasıdır. 1500-147 baz çiftlik bölgeden hedef bölgeyi seçmek son derece mümkündür. Bundan başka DNA ekstraksiyon protokolü optimize edilmiştir, solvent, alkol çöktürme veya diğer zaman alıcı işlemleri gerektirmemektedir. Çok çeşitli hammadde ve ürün, PCR tabanlı yöntemlerle analiz edilmektedir. Belki bundan sonra multiplex assay ile tüm farmasötik ve kozmetik ürünlerdeki kontaminantları bir sistemde uygulamak mümkün olabilecektir. Bunlardan başka DNA mikroçip teknolojisi kalite kontrol çalışmaları için kullanılabilir. DNA mikroçip teknolojisi yakın zamanda çevresel ve klinik örneklerdeki çoğul mikrobiyal popülasyonun saptanmasında kullanılmıştır. Bu teknolojinin ileride farmasötik örneklerdeki mikrobiyal kontaminasyonu saptamada kullanılabileceği düşünülmektedir (13, 65).

## Kaynaklar

1. T.C. Resmi gazete, Kozmetik yönetmeliği, Kanun No: 3977, 23/ 02/ 1994.
2. Underwood, E., 1993, Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry, Pharmaceutical Microbiology-5. Ed.W.B., Hugo and A.D., Russel,Oxford, London and Edinburg, Blackwell scientific publications, P. 353.
3. Özalp,M., 1998, Kozmetik ürünlerde görülen mikrobiyolojik kontaminasyonlar, T. Klin. Kozmetoloji, V.1, I. 3, P. 167-176.
4. Tremewan H.C.,1946, Tetanus neonatorium in Nem Zealand, N.Z. Med. J. V.45,P. 312-313.
5. Siquet, F., Devleeschouwer,M.J., 2001, Handbook of Cosmetic Science and Technology, Ed. Barel, A., Marcel Dekker Incorporated, New York, P.250.
6. Brannan D.K., 1996, Cosmetic preservation, Cosmet. Toilet., V.111, P. 69-83.
7. Reid,F.R., Wood,T.O., 1979, *Pseudomonas* corneal ulser the causative role of contaminated eye cosmetics, Arch. Ophthalmol., V.97, P. 1640-1641.
8. Dawson, N.L. and Reinhardt, D.J., 1981, Microbial flora of inuse, display eye shadow testers and bacterial challenges of unused eye shadows. Applied and Environmental Microbiology, V.42, I.2, P. 297-302.
9. Lindstrom, S.L., 1986, Consumer use testing: Assurance of Microbiological safety, Cosmet. Toilet., V. 111, P. 43-45.
10. Orth, D.S., Dumatol, C., Zia, S., 1996, Hause organisms, dealing with the bug in plant, Cosmet. Toilet., V. 113, P. 51-58.

11. Butler H., 1993, Historical Background, Microbiological control of cosmetics, Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps , V. 3, I.9, P. 572-639.
12. Baird, R.M., 1998, Contamination of non-sterile pharmaceuticals in hospital and community environments, Pharmaceutical Microbiology, 5. Ed. W.B., Hugo and A.D., Russel, Oxford, London and Edinburg, Blackwell scientific publications, P. 374.
13. Jimenez, L., 2001a, Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals, PDA J. Sci. Technol., V.55, I. 5, P.278-285.
14. Jimenez, L., 2001b, Molecular diagnosis of microbial contamination in cosmetic and pharmaceutical products: a review, J.A.O.A.C Int., V. 84, I. 3, P. 671-675.
15. Feng,P., 1992, Commercial assay systems for detecting foodborne *Salmonella*, a review, J. Food Protect., V.55, I. 11, P.927-934.
16. Feng, P.,1996, Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in food, J.A.O.A.C.Int., V. 79, I.3, P.809-812.
17. Van DerZee, H., and Veld, J.H.J.H., 1997, Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis, J.A.O.A.J. Int., V.80, I. 34, P. 934-940.
18. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, L., Atanasov, P., Wilkins, E., 1999, Biosensors for detection of pathogenic bacteria, Biosensors& Bioelectronics, V.14, P. 599-624.
19. English, D., Scalici, C., Hamilton, J., Destro, C., Jimenez, L., 1999, Evaluation of the TECRA visual immunoassay for detecting *Staphylococcus aureus* in cosmetic/ pharmaceutical raw materials and finished products, J. Rapid Method. Autom. Microbiol., V.7, I. 3, P. 193-203.
20. Hill, W.E., 1996, The polymerase chain reaction: application for the detection of foodborne pathogens, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., V.36, I. 1-2, P. 123-173.
21. Fujita,Y., Shibayama, H., Suzuki, Y., Karita,S., Takamatsu, S., 2005, Rapid and accurate identification of microorganisms contaminating cosmetic products based on DNA sequence homology, Int. J. Sci., V.27, P. 309-316.
22. Davin-Regli, R. Challet, J. Bredin, J. Chevalier, F. Lepine and L.M. Pages, 2006, *Enterobacter gergoviae* and the prevalence of efflux in parabens resistance, J. Antimicrob. Chemother, V.57, P. 757-760.
23. Ieven, M., Goossens, H., 1997, Relevance of nucleic acid amplification techniques diagnosis of respiratory tract infection in the clinical laboratory, V. 10, I. 2, P. 242-256.
24. Jaffe, R.I., Lane, J.d., Bates, C.W., 2001, Realtime identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and PCR, J. Clin. Lab. Analysis, V. 15, I. 3, P. 131-137.
25. De Vos D. A., Pirnay, J.P., Struelens, M., Vandenvelde, C., Vanderkelen, A., Cornelis, P., 1997, Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes oprI and oprL, J. Clin. Microbiol., V. 35, P. 1295-1290.
26. Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A., 1992, Rapid and specific detection of the pap, afa, sfa, adhesin encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by PCR, J. Clin. Microbiol., V. 30, I. 5, P. 1189-1193.
27. Wilson, I.G., Cooper, J.E., Gilmour, A., 1991, Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the PCR reaction for amplification and detection of Staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and thermonuclease gene nuc. Appl. Environ. Microbiol, V.57, I.5, P. 1793-1798.
28. Turakka, L., Ojanen, T., Prittinen, T., 1986, Microbiological purity testing of semisolid topical preparations, Pharmazie, V.41, P. 254-256.

29. Hitchins,A.D., 2000, Committee on microbiology and extraneous materials, J.A.O.A.C Int, V. 83,I.2, P. 491-492.
30. Türk Standartları 4765, 1986, Kozmetiklerin test metodları.
31. Anelich, L.E., 1996, Survey of microorganism associated with spoilage of cosmetic creams manufactured South Africa, Int. J. Cosmet. Sci., V. 18, P. 25-40.
32. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Washinton, C.W., 1997, Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6. Edition, Philadelphia; J.B. Lippincott Company.
33. Krieg,N.R., Holtt, J.G., 1984, Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, V.1, The William & Wilkins company, Baltimore/ Hong Kong/ london, P. 141-458.
34. Sneath, P.H.A., Mair,N.S., Sharpe, M.E.,Holtt,J.G., 1984, Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, V. 2, The William & Wilkins company, Baltimore/ Hong Kong/ london, P. 1113-1035.
35. Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000, Yeasts: Characteristics and Identification, 3<sup>th</sup> Ed., Cambridge University Press, Cambridge, P.1139.
36. Ünal,S., Hoskins J., Flavowitsch, J.E.,1992, Detection of meticillin resistant *Staphylococci* by using the PCR, J. Clin. Microbiol. V. 30, I.7, P. 1685-1691.
- polimerase chain reaction amplification of the nuc gene, J. Clin. Microbiol, V.30, I.7, P. 1654-1660.
37. Brakstad, O.D., Asbakk, K., Maeland J.A., 1992, Detection of *Staphylococcus aureus* by polimerase chain reaction amplification of the nuc gene, J. Clin. Microbiol, V.30, I.7, P. 1654-1660.
38. Jimenez, L., Ignar, R., Smalls, S., Grech, P., Bosko, Y., English, D.,1999a, Molecular detection of bacterial indicators in cosmetic/ pharmaceuticals and raw materials, J. Ind. Microbiol. and Biotech., V.22,P. 93-95.
- 39.Ausubal,F., Brent, R., Kingston, E.R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, A.J., Struhl, K., 1992, Short protocols in molecular biology, third edition, John Wiley and Sons Inc.
40. Muehlbayer, F.J., 1999, Procedures and recipis for DNA isolation, RAPD, RFLP, AFIP, STMS and ISSR Methods, Garian Lugume Genetics and Physiology Research Unit Pulman.
41. De La Rosa, M.C., Medina, M.R., Vivar,C., 1995, Microbiological quality of pharmaceutical raw materials, Pharmaceutica Acta Helvetiae, V.70, P. 227-232.
42. Patel, M.R., Patel, A.A., Gandhi, T.P., Gandhi, P.N., Joseph,A.R., Cadila, F.,1985, Microbial contamination of oral liquit medications survey, Indian Drugs, V.22, P. 243-237.
43. Brannan, D.K., 1998, Packaging's role in preservation, Cosmet. Toilet., V.113, P. 79-89.
44. Brannan, D.K., Dille, J.C., 1990, Type of closure prevents microbiol contamination of cosmetics during consumer use, Applied and Environmental Microbiology, V. 56, P. 1476-1479.
45. United States Pharmocopea XXII, 1990, U:S: pharmocopeal convention, Rockwille.
46. Jimenez L., Smalls S., Ignar R, 2000, Use PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples, V.41, P. 259-265.
47. Dawson, N.L. and Reinhardt, D.J., 1981, Microbial flora of inuse, display eye shadow testers and bacterial challenge of unused eye shadows, Applied and Environmental microbiology, V.42, I. 2, P. 297-302.

48. Wong, S., Street, D., Delgado, S.I., 2000, Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the U.S. Food and Drug Administration, *Journal of Food Protection*, V. 63, P. 113-116.
49. Abdelaziz, A.A., Ashour, M.S.E., Hefni, H., 1989, Microbiol contamination of cosmetics and personal care items in Egypt eye shadows, mascaras and face creams, *J. Clin. Pharm. Therap.*, V. 14, P. 21-28.
50. Anelich, L.E., Korsten, 1996, Survey of microorganism associated with spoilage of cosmetic creams manufactured South Africa, *Int. J. Cosmet. Sci.*, V.18, P.25-40.
51. Tran, T.T., Hitchins, A.D., 1994, Microbial survey of shared use cosmetic test kits available to the public, *Journal of Industrial Microbiology*, V. 13, I. 6, P. 389-391.
52. Akın, A., Altanlar, N., 1989, Yurdumuzda üretilen ve kullanılan dudak boylarının mikrobiyolojik kalite kontrolleri üzerine araştırmalar, *Mikrobiyal. Bül.*, V.23, I.4, P.369-378.
53. Ergun, H., Tuncer, I., Sengil, A.Z., 1987, Microbiological analysis of some, cosmetics on the market, *Mikrobiyol. Bül.*, V. 21, I. 4, P. 301-307.
54. Kabukçu, B., 1997, Türkiye'de üretilen şampuanların mikrobiyolojik kalite kontrolleri üzerine araştırmalar, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
55. Okeke, I.N., Lamikanra, A., 2001, Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. *Journal of Applied Microbiol.* V.91, P. 922-928.
56. Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., 1998, *Mikrobiyoloji 2000*, Asya Tıp Yayıncılık, 1. Baskı, Bornova-İzmir.
57. Mania, C.M., Nunes, O.C., Morais, P.V., Costa, M.S., 1990, Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral water on selective and enrichment media. *Journal of Applied Bacteriology*, V.69, P. 871-876.
58. Knowlton, J.L., 1993, Emulsion Theory, Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps, V. 3-9, Ed. Poucher, W.A., London, Glaskow, N.Y., Chapman Hall, P. 534-555.
59. Tattawasart, U., Maillard, J.Y., Furr, J.R., Russel, A.D., 1999, Comparative responses of *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents, *Journal of Applied Microbiology*, V. 87, P. 323-331.
60. McDonnell, G., Russel, A.D., 1999, Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, V. 12, I. 1, P. 147-179.
61. Farnleitner, A.H., Kreezinger, N., Kavka, G.G., Grillenberger, S., Rath, S., Mach, R.L., 2000, Simultaneous detection and differentiation of *E. coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variations in a fragment of the B-D-Glucuronidase gene, *Applied and Environmental Microbiol.*, V. 66, I. 4, P. 1340-1346.
62. Bej, A.K., Steffan, R.J., Dicesare, J.L., Haff, L., Atlas, R.M., 1990, Detection of coliform bacteria in water by PCR and gene probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 56, I. 2, P. 307-314.
63. Bej, A.K., Dicesare, J.L., Haff, L., Atlas, R.M., 1991a, Detection of *E. coli* and *Shigella* spp. in water using the PCR and gene probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.57, I.4, P. 1013-1017.
64. Bej, A.K., Mahrubani, M.H., Dicesare, J.L., Atlas, R.M., 1991b, PCR gene probe detection of microorganism by using filter concentrated samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 57, I.12, P. 3529-3534.
65. Guschin, D.Y., Mobarry, B.K., Proudnikov, D., Stahl, D.A., Rittmann, B.E., Mirzabekov, A.D., 1997, Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology, *Appl. Environ. Microbiol.* V. 63, I. 6, P. 2397-2402.