

Microbial Contamination in some Moisturizing Creams in Iran Market

Fatemeh Mohammadi Sarab Badyeh¹,
Majid Saeedi²,
Reza Enayatifard³,
Katayoun Morteza-Semnani⁴,
Jafar Akbari³

¹ MSc Student in drug Quality Assurance, Faculty of Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 19, 2014 ; Accepted February 7, 2015)

Abstract

Background and purpose: There is a high risk of pathogen contamination in poor quality cosmetic products that are illegally smuggled into our country. Such contaminations can be easily passed to consumers and endanger their health. In this study the microbial contamination were investigated in some nonstandard moisturizing creams found in poor quality markets and standard creams from drug stores.

Materials and methods: The study included nine samples of moisturizing creams obtained from poor quality markets and three samples placed on drug stores and standard markets. The samples were evaluated for microbial content (bacterial total count, fungal count, and presence of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter*) using pour plate and multiple tube techniques.

Results: Aerobic bacteria counts in all samples were more than cfu.g⁻¹ 1000. Fungal contamination was seen in 17% in non-standard samples and in 67% in standard creams which were again more than cfu.g⁻¹ 1000. All samples were found contaminated by *enterobacters*. *Staphylococcus aureus* was observed in three samples of nonstandard and two samples of drug stores. We detected *P. aeruginosa* in three samples of nonstandard and one sample of standard moisturizing creams.

Conclusion: High level of contamination in moisturizing creams would influence the health of consumers. It is believed that low grade raw materials and insufficient manufacturing surveillance in production process are amongst the main reasons for microbial contamination in cosmetic products. Hence, more supervision is needed to control such problems.

Keywords: Cosmetic, moisturizing cream, microbial content, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

بررسی آلودگی میکروبی کرم های مرطوب کننده موجود در بازار ایران

فاطمه محمدی سراب بادیه^۱

مجید سعیدی^۲

رضا عنایتی فرد^۳

کتایون مرتضی سمنانی^۴

جعفر اکبری^۳

چکیده

سابقه و هدف: امروزه امکان انتقال عوامل بیماری‌زا توسط فرآورده های آرایشی بهداشتی از دیدگاه سلامت مورد توجه جامعه می باشد، که به علت استفاده گسترده و استاندارد نبودن برخی از این فرآورده ها، احتمال انتقال آلودگی و خطرات ناشی از ایجاد عفونت توسط باکتری های مختلف دور از انتظار نیست. در این مطالعه محتوای میکروبی کرم های مرطوب کننده موجود در بازار رسمی و غیر رسمی ایران مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۹ نمونه کرم مرطوب کننده شامل ۶ نمونه کرم غیر استاندارد (در بازار غیر رسمی) و ۳ نمونه کرم تولید شده توسط تولیدکنندگان داخلی از نظر محتوی میکروبی (شمارش کلی میکروارگانیسم های هوازی، شمارش کلی کپک و مخمر و حضور میکروارگانیسم های ممنوع (سودومونا آئروژینوزا، استافیلوکوک طلائی و انتروباکتر) به دو روش Pour Plate و لوله های متعدد ارزیابی شد.

یافته ها: شمارش باکتری های هوازی در تمامی نمونه ها (غیر استاندارد و تولید داخلی) بیش تر از محدوده فارماکوپه 10^4 cfu.g⁻¹ بود. در شمارش کلی قارچ ها در ۱۷ درصد نمونه های غیر استاندارد و در ۶۷ درصد نمونه های داخلی بیش تر از محدوده فارماکوپه 10^4 cells.g⁻¹ بود. در سه نمونه غیر استاندارد و دو نمونه تولید داخل استافیلوکوک طلائی؛ و در سه نمونه از کرم های غیر استاندارد و یک نمونه تولید داخل سودومونا آئروژینوزا و در کلیه نمونه ها انتروباکترها شناسایی شدند.

استنتاج: بالا بودن میزان آلودگی در کرم های مرطوب کننده غیر استاندارد و تولید داخل مطرح کننده خطرات بهداشتی بالقوه این محصولات است. به منظور دستیابی به فرآورده های آرایشی بهداشتی ایمن باید همکاری میان تولید کننده، مقامات بهداشتی و مصرف کنندگان آنها ایجاد شود. نتایج حاصل شده، ضرورت ارتقاء عملکرد سیستم تضمین کیفیت توسط تولید کنندگان داخلی را مورد تاکید قرار می دهد.

واژه های کلیدی: فرآورده آرایشی، آلودگی میکروبی، سودومونا آئروژینوزا، استافیلوکوک طلائی، کرم مرطوب کننده

مقدمه

فرآورده های آرایشی بهداشتی در سراسر دنیا به طور گسترده، حدود ۱۰^{۱۲} واحد در سال، مورد استفاده قرار

می گیرند (۱). کرم های آرایشی فرآورده های استریل نمی باشند، اما با توجه به کاربرد موضعی، باید سلامت

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۶۴۳ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

E-mail: majsaeedi@yahoo.com

مؤلف مسئول: مجید سعیدی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد نظارت بر امور دارو، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۹/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸

میکروبی لازم را داشته باشند. کاربرد همه روزه و گسترده این گونه از فرآورده ها اهمیت این امر را بیش تر نشان می دهد. ساختار کرم ها از دو فاز آبی و روغنی تشکیل یافته است که آکنده از مواد گوناگونی است که محیطی مناسب را برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم ها فراهم می آورد (۲).

وقوع آلودگی میکروبی فرآورده آرایشی بهداشتی با دلایل و مدارک زیادی اثبات شده و گاهی ارگانیسم های بیماری زای خطرناکی نیز در این فرآورده ها یافت شده اند (۱). در سال ۱۹۶۷ آلودگی کرم به کلبسیلانومونیا سبب بروز سیتی سمی گردید (۳)، در گزارش دیگری در سال ۱۹۴۶ آلودگی تالک مورد استفاده در تهیه پودر بچه، به عامل بیماریزای کزاز (کلستریدیوم تتانی) منجر به مرگ چهار کودک در نیوزلند گردید (۴). موارد گزارش شده، نمایانگر بخش نادر وقایعی است که در عمل رخ می دهد، چرا که بسیاری از آن ها به دلایل مختلف بدون ردیابی باقی می ماند.

دستورالعمل هایی برای تضمین کیفیت میکروبی فرآورده های آرایشی بهداشتی تدوین شده است ولی الزام قانونی برای انجام این دستورالعمل ها وجود ندارد. در راستای دستورالعمل های اتحادیه اروپا و سازمان غذا و داروی ایالات متحده، فارماکوپه های مختلف محدودیت هایی را برای فرآورده های آرایشی بهداشتی بیان نموده اند که تعداد میکروارگانیسم های موجود در یک گرم یا یک میلی لیتر فرآورده باید کم تر از 1000 cfu باشد و در مورد فرآورده های موضعی باید عاری از استافیلوکوک طلائی و سودوموناس آئروژینوزا باشند (۵).

ایران دومین مصرف کننده فرآورده های آرایشی بهداشتی در خاورمیانه است که همانند بسیاری از کشورهای منطقه تعداد بسیار زیادی از فرآورده های آرایشی غیرمعتبر و گاه تقلبی به بازار آن عرضه می گردد. متأسفانه با توجه به قیمت پایین، این فرآورده ها مورد توجه بسیاری از اقشار قرار می گیرند (۶). در این

پژوهش به بررسی محتوای میکروبی برخی کرم های مرطوب کننده در بازار غیر رسمی کشور و مقایسه آن با برخی فرآورده های رسمی داخلی پرداخته شده است؛ و پس از شمارش میکروارگانیسم های زنده، وجود استافیلوکوک طلائی، سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکترها نیز در فرآورده مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۹ نمونه کرم مرطوب کننده از برند های مختلف در سال ۹۳-۱۳۹۲ مورد بررسی قرار گرفت. ۶ نمونه فرآورده آرایشی غیر استاندارد بودند که از بازار غیر رسمی تهیه شدند، ۳ نمونه دیگر تولید شده توسط تولیدکنندگان داخلی بودند و از داروخانه تهیه شدند. جهت برداشت نمونه، زیر هود لامینار ایرفلو و رعایت شرایط، مقدار یک گرم از فرآورده برداشته شده و در ۹ میلی لیتر نرمال سالین استریل یکنواخت گردید. جهت آزمون مقدماتی از استافیلوکوک طلائی (PTCC 1112) و سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1074) استفاده شد. به این منظور ۱ میلی لیتر از نمونه های رقیق شده به پلیت منتقل شد، ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی (کدورت ۰/۵ مک فارلند یا 10^8 میکروارگانیسم) به آن اضافه گردید. سپس حجم مناسب از محیط کشت SCDA (سوی بین-کازین دایجست آگار، مرک آلمان) به آن افزوده و در ۳۵ درجه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. نمونه های شاهد بدون فرآورده نیز تهیه شده و امکان رشد میکروبی آن ها بررسی شد.

در روش لوله های متعدد یک رقت از فرآورده تهیه و مورد آزمون قرار گرفت و روش پلیت (برای باکتری ها و قارچ ها) تا چهار رقت تکرار شد و نتایج آن ها به صورت میانگین گزارش شد. برای آماده سازی رقت ها ۹ ml نرمال سالین به عنوان رقیق کننده و توتین ۸۰ به مقدار ۳ درصد برای خنثی کردن اثر محافظ (۷، ۸) مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها و بحث

در تست مقدماتی در نتیجه تلقیح سوسپانسیون میکروبی به نمونه‌های مورد آزمایش هیچ رشدی مشاهده نگردید، که نشان از عدم خنثی شدن محافظ و لزوم استفاده از توئین ۸۰ به میزان ۳ درصد بود. تعداد میکروارگانیسم‌های زنده (باکتری و قارچ) و ارگانیسم‌های شناسایی شده در کرم‌های مرطوب کننده غیر استاندارد (نمونه‌های ۱ تا ۶) و کرم‌های موجود در بازار رسمی (نمونه‌های ۷ تا ۹) در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. شمارش تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های غیر استاندارد به روش لوله‌های متعدد بیش تر از حد مجاز 1000 cfu.g^{-1} بود و در روش پلیت تنها در نمونه‌های ۱ و ۳ رشد دیده شد که تعداد باکتری‌ها در نمونه ۱ و ۳ نیز بیش تر از 1000 cfu.g^{-1} بود. با مقایسه نتایج در روش پلیت و لوله‌های متعدد تفاوت معنی داری دیده شد که با توجه به دقت بیش تر در روش لوله‌های متعدد می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که عدم رشد در روش پلیت به علت خنثی نشدن اثر ماده محافظ می‌باشد که در نتیجه استفاده مقدار زیادی از ماده محافظ بوده است. با توجه به نتیجه حاصل از شمارش باکتری‌ها در نمونه‌های غیر استاندارد می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که نمونه‌ها دارای حد بالایی از آلودگی بوده‌اند که از ماده محافظ به منظور از بین بردن آلودگی اولیه در فرآورده استفاده شده است، در صورتی که مبنای استفاده از ماده محافظ در فرآورده‌های چند بار مصرف ممانعت از

برای شمارش تعداد میکروارگانیسم‌های هوازی از هر دو روش پلیت و لوله‌های متعدد استفاده شد. برای شمارش تعداد میکروارگانیسم‌های هوازی به روش لوله‌های متعدد محیط SCDB (سوی بین-کازئین دایجست مایع، مرک آلمان) و برای روش پلیت محیط SCDA و برای قارچ‌ها محیط SDA (سابورو دکستروز آگار، مرک آلمان) مورد استفاده قرار گرفت.

روش لوله‌های متعدد مطابق فارماکوپه ایالات متحده انجام شد (۵) و لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس آن‌ها را از نظر شواهد رشد مورد بررسی قرار گرفت. برای شمارش میکروارگانیسم‌های هوازی به روش پلیت و شمارش کپک و مخمر ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده به پلیت منتقل شد. سپس حجم مناسب از محیط کشت به آن افزوده و در مورد محیط SCDA، در ۳۵ درجه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت، و در مورد محیط SDA در دمای ۲۵-۲۰ درجه به مدت ۷-۵ روز انکوبه گردید، سپس شمارش میکروبی صورت پذیرفت. برای تشخیص افتراقی، تلقیح بخشی از محیط حاوی فرآورده را بر روی سطح محیط مانیتول سالت آگار، ستریماید آگار و مک کانکی به شکل مخطط منتقل گردید. پلیت‌ها را به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده شد. سپس پلیت‌ها از نظر رشد (با توجه به مشخصات کلنی میکروارگانیسم مربوطه) و عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت.

جدول شماره ۱: محتوای میکروبی کرم‌های مرطوب کننده غیر استاندارد و رسمی در بازار ایران

کد نمونه	تعداد کل باکتری‌های هوازی		تعداد کل کپک و مخمر (cells.g ⁻¹)	ارگانیسم‌های شناسایی شده در نمونه (استافیلوکوک طلایی، سودوموناس آئروژینوزا، اتروباکتر)
	روش لوله‌های متعدد (cfu.g ⁻¹)	*روش پلیت (cfu.g ⁻¹)		
۱	>1100	$4/5 \times 10^2$	۱۰	استافیلوکوک طلایی، اتروباکتر
۲	>1100	-	5×10^3	استافیلوکوک طلایی، اتروباکتر
۳	>1100	$1/5 \times 10^2$	-	استافیلوکوک طلایی، سودوموناس آئروژینوزا، اتروباکتر
۴	>1100	-	-	سودوموناس آئروژینوزا، اتروباکتر
۵	1100	-	-	سودوموناس آئروژینوزا، اتروباکتر
۶	>1100	-	-	اتروباکتر
۷	>1100	5×10^2	5×10^3	استافیلوکوک طلایی، اتروباکتر
۸	>1100	$3/5 \times 10^2$	5×10^3	اتروباکتر
۹	>1100	1×10^4	5×10^2	استافیلوکوک طلایی، سودوموناس آئروژینوزا، اتروباکتر

(-) عدم رشد

* میانگین تعداد باکتری‌ها در چهار رقت متوالی

رشد میکروارگانسیم ها، در یک آلودگی حین مصرف می باشد. شمارش تعداد باکتری ها در نمونه های داخلی به روش لوله های متعدد، در هر سه نمونه بیش تر از حد مجاز بود که نتایج به دست آمده از روش پلیت آن را تأیید می کند. با مقایسه تعداد ارگانسیم های شمارش شده در نمونه های غیر استاندارد و تولید داخل اگرچه آلودگی تمامی نمونه ها بیش تر از حد مجاز بود، ولی بیش ترین مقدار آلودگی در نمونه های داخلی (10000 cfu.g^{-1}) کم تر از کم ترین حد آلودگی قابل شمارش در نمونه های غیر استاندارد (15000 cfu.g^{-1}) بوده است. تعداد قارچ و مخمر شمارش شده در دو نمونه داخلی و یک نمونه غیر استاندارد بیش تر از حد مجاز $1000 \text{ cells.g}^{-1}$ بود. احتمال این که نتایج حاصل از رشد کپک و مخمر در نمونه های غیر استاندارد متاثر از خنثی نشدن ماده محافظ باشند نیز وجود دارد.

عفونت های فردی که به علت آلودگی لوازم آرایشی ایجاد شده اند بعید است که کشف و یا مستند شده باشند و بیش تر گزارشات مربوط به عفونت هایی است که در بیمارستان شیوع پیدا کرده اند. فرآورده های آرایشی بهداشتی عمدتاً بر روی پوست مورد استفاده قرار می گیرند و استافیلو کوک ارئوس شایع ترین ارگانسیم پوستی است که باعث ایجاد جوش، زرد زخم، ورم ملتحمه، فولیکولیت و مسمومیت غذایی می شود (۹)، هم چنین این ارگانسیم باعث به وجود آمدن شکل حاد عفونت پوست، سندرم پوست سوخته استافیلو کوکی که عمدتاً در نوزادان و کودکان رخ می دهد است (۱۰). Darmstadt بروز ۷۰ درصد عفونت های پوستی (اولیه و ثانویه) در کودکان را ناشی از استافیلو کوک ارئوس گزارش کرد (۱۱).

سودوموناس آئروژینوزا غالباً در فرآورده های آرایشی آلوده وجود دارد که موجب عفونت زخم ها و سوختگی ها و هم چنین باعث پنومونی در بیمارانی است که سیستم ایمنی آن ها سرکوب شده است (۹، ۱۲). در یک پژوهش عفونت و یک مورد مرگ که به علت استفاده شامپوی آلوده به سودوموناس آئروژینوزا توسط

بیمارانی که سیستم ایمنی آن ها سرکوب شده بود را گزارش شده است (۱۳). در مواردی عفونت چشم و حتی از دست دادن بینایی به علت آلودگی فرآورده های آرایشی به سودوموناس آئروژینوزا نیز گزارش شده است (۱۴، ۱۵). طی سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۸، اتحادیه اروپا ۲۴ فرآورده آرایشی مختلف را به علت آلودگی میکروبی ریکال کردند و حداقل ۴۲ درصد از محصولات که ریکال شده بودند، آلوده به سودوموناس آئروژینوزا بودند (۱۵).

آزمایش کیفی برای تشخیص باکتری های خطرناک نشان داد که ۵۰ درصد از فرآورده های غیر استاندارد و ۶۷ درصد از فرآورده های داخلی آلوده به استافیلو کوک طلائی و ۵۰ درصد فرآورده های غیر استاندارد و ۳۳ درصد از فرآورده های داخلی آلوده به سودوموناس آئروژینوزا و تمامی نمونه ها (غیر استاندارد و نمونه های داخلی) به انتروباکترها آلوده بودند. در نمونه ۶ (غیر استاندارد) و نمونه ۱۵ (داخلی) تنها آلودگی به انتروباکترها دیده شد، در حالی که در نمونه های شماره ۳ و ۷ آلودگی به هر سه میکروارگانسیم دیده شد. در بررسی که بر روی فرآورده های آرایشی بهداشتی سر بسته انجام شد، برخی از میکروارگانسیم ها به ویژه انتروباکترها در این فرآورده ها شناسایی شدند (۱)، انتروباکترها ارگانسیم های گرم منفی و معمولاً عوامل بیماری زای فرصت طلب می باشند که باعث عفونت های بیمارستانی به ویژه پنومونی و عفونت ادراری می شوند و از این رو دارای اهمیت می باشند (۱۶).

با توجه به نتایج حاصله هیچ یک از این فرآورده ها در محدوده مجاز فارماکوپه قرار نگرفته و از نظر میکروبی غیر قابل قبول محسوب می شوند. با توجه به این که گرم ها برای استفاده بر روی پوست مالیده می شوند، درصد بالای آلودگی میکروبی این محصولات خطر عفونت های پوستی را در مصرف کنندگان افزایش می دهد، در نتیجه ضرورت ارتقاء عملکرد سیستم تضمین کیفیت با رعایت اصول GMP توسط تولید کنندگان داخلی بیش تر از پیش باید مورد توجه قرار گیرد.

References

1. Baird R, Bloomfield BR. Quality assurance against microbes in cosmetic, toiletries and non-sterile drugs. CRC Press; 1996. p.18-22.
2. Piu L, Juliano C, Pirisino G, Minghetti P. Application of film method for microbial monitoring of cosmetic raw materials. J Appl Cosmetol 1996; 14(4): 155-161.
3. Morse LJ, Williams HL, Grenn FP, Eldridge EE, Rotta JR. Septicemia due to *Klebsiella pneumonia* originating from a hand cream dispenser. New Eng J Med 1967; 277(9): 472-473.
4. Tremewan HC. Tetanus neonatorum in New Zeland. N Z Med J 1946; 45: 312-313.
5. United States Pharmacopeia convention 30- (USP 30) national formulary 25; 2007.
6. Report from Research, statistic and information center for fighting against goods and foreign exchange, 2013.(Persian). Available from: www.icana.ir. Accessed May 2, 2013.
7. Heinzl M. Antimicrobial and Preservative Efficacy. Cosmetics. Heinzl M. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1999. p. 275-290.
8. Scholtyssek R. Directory of Microbicides for the Protection of Materials. Protection of cosmetics and toiletries. Scholtyssek R. Springer Netherlands: 2005. p. 263-266.
9. Brannan DK. Biology of microbes. In: Geis PA(ed). Cosmetic microbiology. 2nd ed. Taylor & Francis Group. New York: 2006. p. 19-69.
10. Aly R. Staphylococcal infections. In: Aly R, Maibach HI, (eds). Atlas of Infections of the Skin, 3rdedn. New York: Churchill Livingstone; 1999. p. 115-122.
11. Darmstadt GL. Oral antibiotic therapy for uncomplicated skin infections in children. Pediatr Infect Dis J 1997; 16(2): 227-240.
12. Tenenbaum S. Pseudomonas in cosmetics. J Soc Cosmetic Chemists 1967; 18: 797-807.
13. Geis PA. Preservation strategies. In: Geis PA editor. Cosmetic microbiology. 2nd ed. Taylor & Francis Group. New York; 2006. p. 163-180.
14. Reid FR, Wood TO. Pseudomonas corneal ulcer. The causative role of contaminated eyecosmetics. Arch Ophthalmol 1979; 97(9): 1640-1641.
15. Lundov MD, Zachariae C. Recalls of microbiological contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. Int J Cosmet Sci 2008; 30(6): 471-474.
16. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Zinsser H. Zinsser's Microbiology, Mc. Graw Hill; 1992, p. 248.