

## Comparison of Microbiological Limit Test Methods of Antibiotics Containing Cefpodoxime Proxetil

Kenan TUNÇ, Şenay GÜLŞEN VAROL\*, Alican Bahadır SEMERCİ

Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Sakarya University, Sakarya, TURKEY

### ABSTRACT

Microbiological contamination of products containing antibiotics is one of the most serious problems in the pharmaceutical industry. The aim of this study was to evaluate the methods and neutralizing agents used to determine the microbiological quality of cefpodoxime proxetil antibiotics.  $10^{-5}$  of microorganisms of 1mL used in 90 mL of pepton were added together with 10 g of antibiotics. In addition, three experimental groups were formed by adding 0.2 mL of penase or 0.1 mL lactamator as neutralizing agent to peptone suspension. The rate of inhibiting antibiotic of cefpodoxime proxetil with neutralizing agents (penaz and lactomotor) was determined by membrane filtration and pouring methods. As a result of the experiment, it was determined that membrane filtration method is most suitable one for the determination of microbial quality of cefpodoxime proxetil antibiotic. In the experimental results with penaz, the highest yield was 8% and the lactomotor was 92%. The applications in the cast sowing method were insufficient to prevent the antibiotic effect and therefore no growth was observed in the test group. As a neutralizing agent, the lactomotor was found to be successful in inhibiting cefpodoxime proxetil antibiotic.

**Key words:** Cefpodoxime proxetil, Penaz, Lactomotor.

## Sefpodoksim Proksetil İçerikli Antibiyotiklerin Mikrobiyolojik Limit Test Metodlarının Karşılaştırılması

### ÖZET

Antibiyotik içeren ürünlerin mikrobiyolojik kontaminasyonu günümüzde ilaç endüstrisinin karşılaştığı en önemli sorunlardandır. Çalışmamızda sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiklerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin ve nötralize edici ajanların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 90 mL peptonun içine, kullanılan mikroorganizmaların  $10^{-5}$  lik sulandırmasından 1 mL ilave edilmiş ve üzerine 10 g antibiyotik eklenerek karıştırılmıştır. Ayrıca pepton süspansiyona nötralize edici ajan olarak 0.2 mL penaz veya 0.1 mL laktamator eklenerek üç deney grubu oluşturulmuştur. Membran fitrasyon ve dökme ekim yöntemleri kullanılarak nötralize edici ajanların (penaz ve laktomotorun) sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiğin mikroorganizmaları öldürme yeteneğini yok etme oranları belirlenmiştir. Deney sonucunda membran fitrasyon yönteminin sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiğin mikrobiyal kalitesinin belirlenmesinde en uygun yöntem olduğu belirlenmiştir. Penaz ile yapılan deney sonuçlarında verim en yüksek %8 iken, laktamotorda %92 olduğu gözlenmiştir. Dökme ekim metodundaki uygulamalar antibiyotiğin etkisi inhibe etmede yetersiz kalmış ve bu yüzden test grubunda üreme gözlenememiştir. Nötralize edici ajan olarak laktomotorun sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiği inhibe etmede başarılı olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Laktomotor, Penaz, Sefpodoksim proksetil.

## GİRİŞ

Antibiyotikler insanlardaki bazı hastalıkların ilerlemesini önlemek, tedavi etmek ve biyolojik fonksiyonları istenen yönde değiştirmek amacıyla uygulanan etkin kimyasal ve biyolojik kökene sahip ilaçlardır (Çelik ve ark. 2010). Yaklaşık 75 yıldır aktif olarak kullanılan antibiyotikler insanlığa büyük yararlar sağlamış güçlü ilaçlardır. Günümüzde antibiyotik sınıfında yer alan birçok ilaç vardır ve bunlar içinde azımsanmayacak bir oranda beta laktam grubundan sefalosporinler bulunmaktadır. Sefalosporinler antibakteriyel ilaçlardır ve ulaşılabilirlikleri kolay olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sefalosporinler yıllar içinde antibakteriyel etki spektrumlarına göre gruplandırılmışlardır. Sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotikler yarı sentetik üçüncü kuşak sefalosporinler içerisinde yer alırlar. Gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerinde geniş spektrumlu etkiye sahiptirler. İdrar, solunum yolu ve cilt enfeksiyonları gibi çok çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılırlar (Sader ve ark. 1993; Liarrul ve ark. 2010; Gündoğdu ve ark. 2011; Yıldız ve ark. 2014)

Türkiye’de ilaç sanayisi son zamanlarda hızlı bir gelişme göstermiştir. 1960’lı yıllarda ilaçlar reçeteye göre eczacılar tarafından yapılmaktayken günümüzde ise ilaçlar sayısı giderek artan ilaç fabrikalarında üretilmekte ve büyük bir hasta kitlesi tarafından kullanılmaktadır. Yapılan literature taramalarında Türkiye’de üretilen ilaçların bir enfeksiyon kaynağı olduğunu veya olabileceğini gösteren bir bulguya rastlanmamıştır. Bu durumun ilaçların steril olmasından değil, ilaçların mikrobiyolojik analizleri ile ilgili çalışmaların yeterli olarak yapılamamasından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Akın 1981; Öztürk ve Yıldız 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ilaç üretim prosessinin valide edilmiş üretim metodlarına ve prosedürlere göre yürütülmek zorunda olduğunu bildirilmiştir. Üretim işlemleri İyi Üretim Uygulamaları (GMP) prensiplerine göre gerçekleştirilmelidir (WHO 2002). Test edilen ilacın antimikrobiyal etkisi bulunuyorsa nötralize edici ajanlar kullanılarak bu antimikrobiyal etkinin inhibe edilmesi gereklidir. Ayrıca kullanılan inhibitor ajanların test edilen mikroorganizmalar üzerinde toksik etkisi olmamalıdır.

Laktamator enzim türevli bir üründür ve ilaç endüstrisinde rutin mikrobiyolojik incelemeden önce, test örneklerinde bulunan

beta-laktam aktif ilaç bileşenlerinin etkisizleştirilmesinde kullanılmaktadır. Birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kuşak sefalosporinler üzerinde etkilidir. Penaz konsantresi, yüksek saflıkta pesilinaz enzimi içermektedir.  $\beta$ -laktamların özellikle penisilinlerin inaktivasyonu için kullanılmaktadır (Sri Agung ve ark. 2018; Gülşen Varol 2019).

Bu çalışmada; antibiyotiklerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin (dökme ekim-membrane filtrasyon ekim) sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiğe uygulanması ve elde edilen veriler sonucunda en uygun yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Araştırmada sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotik (Ecsery) kullanılmıştır. Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 1029 suşları ve kemiteks firmasından liyofilize olarak satın alınan *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 suşu kullanılmıştır.

### Kullanılan kimyasal maddeler ve besiyerleri

Çalışmada nötralize edici ajanlar olarak laktamator ve penaz (CPC), besiyeri olarak Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Pepton (Merck), tampon çözelti olarak NaCl Pepton (pH: 7.00) solüsyonu kullanılmıştır.

### Test mikroorganizmalarının aktiveleştirilmesi

TSB içerisine inoküle edilen suşlar 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda TSB içerisinde üremiş olan mikroorganizmalardan bakteriler TSA besiyerine, küf ve mayalar SDA besiyerine inoküle edilmiştir. Bakteriler 37°C’lik inkübatörde 24 saat, küf ve mayalar 20-25°C’lik inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir.

Aktifleştirilmiş suşlar ortalama 0.5 Mc Farland olacak şekilde yoğunlukları ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonlardan pepton çözeltisi kullanılarak dilüsyon (10-1-10-5) serisi hazırlanmıştır.

### Dökme ekim yöntemi

Test grubu: 90 mL peptonun içine kullanılan

mikroorganizmaların  $10^{-5}$ lik dilüsyonundan (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*) 1 mL ilave edilmiş ve üzerine 10 g antibiyotik eklenerek karıştırılmıştır. Ayrıca pepton süspansiyona nötralize edici ajan olarak 0.2 mL penaz veya 0.1 mL laktamator eklenerek üç deney grubu (antibiyotik+mikroorganizma(D), antibiyotik+mikroorganizma + laktamator (L), antibiyotik + mikroorganizma + penaz (P)) oluşturulmuştur. Hazırlanan bu süspansiyondan petrilere 1'er mL aktarılmıştır (Halkman 2007).

Kontrol grubu: Test mikroorganizmaları üzerinde nötralize edici ajanların toksik etkilerin olmadığını gözlemek için; 90 mL peptonun içerisine her mikroorganizmaların  $10^{-5}$ lik dilüsyonundan (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*) 1 mL ilave edilmiştir. Deney grubuna göre 0.2 mL penaz veya 0.1 mL laktamator eklenerek kontrol grubu (mikroorganizma+ inhibitör ajan) oluşturulmuştur. Hazırlanan süspansiyondan petrilere 1'er mL aktarılmıştır.

İnokulum grubu: mikroorganizmaların varlığını göstermek ve test grubunu değerlendirebilmek amacıyla 90 mL pepton içerisine  $10^{-5}$ lik mikroorganizma dilüsyonundan (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*) 1 mL petriye aktarılmıştır.

Hazırlanan 1 mL'lik bakterileri içeren süspansiyonların bulunduğu petrilere TSA besiyeri dökülerek  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 3 gün, küf ve maya içeren petrilere SDA besiyeri dökülerek  $20-25^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün inkübe edilmiştir. Her deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Süre sonunda besiyerinde koloni oluşturan birim (kob) sayısı kaydedilmiştir.

### Membran filtrasyon ekimi

Çalışmada kullanılan membrane filtrasyon yöntemi Avrupa Farmokopi (2000)'sinden modifiye edilerek çalışılmıştır.

Test grubu: 90 mL peptonun içerisine kullanılan mikroorganizmaların  $10^{-5}$ lik dilüsyonundan 1 mL ilave edilmiş ve 10 g antibiyotik eklenerek karıştırılmıştır. Ayrıca süspansiyona nötralize edici ajan olarak 0.2 mL penaz veya 0.1 mL laktamator eklenerek üç deney grubu (D, L, ve P) oluşturulmuştur. Hazırlanan süspansiyonlardan 1 mL 0.45µm çaplı filtreden süzölmüştür. Filtreler steril pens yardımı ile SDA ve TSA besiyerlerine bırakılmıştır.

Kontrol grubu: Test mikroorganizmaları üzerinde nötralize

edici ajanların toksik etkilerinin olmadığını gözlemek için; antibiyotiksiz sadece mikroorganizma+penaz ve mikroorganizma+laktamator içeren süspansiyonlar kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan 1 mL alınarak 0.45 µm çaplı filtreden süzölmüştür.

İnokulum grubu: mikroorganizma varlığını göstermek amacıyla, 90mL peptonun içerisine eklenen  $10^{-5}$ lik mikroorganizma dilüsyonlarından 1 mL 0.45 µm çaplı filtreden süzölmüş ve peptonlu suyla yıkanmıştır.

Tüm gruplardan elde edilen bakteri içeren filtreler TSA besiyerine steril pens yardımıyla yerleştirilmiş ve  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 3 gün, Küf ve maya içeren filtrelere SDA besiyerine steril pens yardımıyla yerleştirilmiş ve  $20-25^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda koloni oluşturan birim (kob) sayısı kaydedildi ve aşağıda verilen formüle göre inhibitör ajanların verimliliği değerlendirildi. Metodlardaki verim % verim = Test grubu/ inokulum grubu x 100 eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm deney grupları üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

### BULGULAR

Sefpodoksim prosetil içerikli antibiyotiğin nötralize edici ajanlar kullanılarak gerçekleştirilen yöntem validasyonu sonuçları Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir. Kontrol grubu antibiyotik eklenmeden yalnızca nötralize edici ajan (blank olarak) kullanılarak hazırlanmış ve test mikroorganizmaları üzerinde nötralize edici ajanların toksik etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

Dökme ekim metoduyla yapılan deneylerde test grubunda üreme olmadığı için verim hesaplanamamıştır. Sefpodoksim prosetil içerikli antibiyotiklerin mikrobiyolojik kalitesinin incelenmesinde dökme ekim yönteminin uygun olmadığı belirlenmiştir. Membran filtrasyonla yapılan deney gruplarında penazın antibiyotiği inhibe etkisi yetersiz kalmış test gruplarında üreme düşük olmuştur. Nötralize edici ajan olarak laktamatorun kullanıldığı membran filtrasyon ekim yönteminde verimler; *S. aureus* için %92, *P. aeruginosa* için %92, *B. subtilis* için %88, *C. albicans* için %76 ve *A. brasiliensis* için %72 olarak belirlenmiştir.

**Tablo 1.** Dökme Ekim Metodundan Elde Edilen Mikrobiyolojik Analizlerin Ortalamaları

Çalışma Grupları	<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>		
	D	P	L	D	P	L	D	P	L	D	P	L	D	P	L
Test grubu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol grubu	47±1.1	50±2.1	49±2.5	61±1	62±1.5	63±0.5	58±1.5	65±1.7	58±1.1	25±3	22±1	23±1	21±2	18±2.5	17±1.1
İnokulum grubu	50±2	51±1.5	53±1.5	62±2.6	65±1.5	64±1	60±2	66±1	62±3	25±3.5	23±1	22±0.5	24±1	21± 2.1	20±2
% Verim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D: antibiyotik+mikroorganizma, P: antibiyotik +mikroorganizma+penaz, L: antibiyotik + mikroorganizma + laktomotor

**Tablo 2.** Membran Filtrasyon Metodundan Elde Edilen Mikrobiyolojik Analizlerin Ortalamaları

Çalışma Grupları	<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>		
	D	P	L	D	P	L	D	P	L	D	P	L	D	P	L
Test grubu	0±0	2± 0.5	48± 2	0±0	5± 0.5	60±1.7	0±0	3±0.5	56±2	0±0	2±0.5	19±1.5	0±0	2±0.5	16±1
Kontrol grubu	43±2	49±2.5	50±1	63±2	63±1.7	62±3	57±3	58±1.7	60±2.8	20±1.1	24±1.2	23±2	19±2.6	20±2.7	21±0.5
İnokulum grubu	48±2	51±1.5	52±1.4	65±1	64±2.3	65±2.1	61±3	62±1.3	63±2.5	21±3.6	26±3	25±2.6	22±1.5	23±2.4	22±2
% Verim	-	3	92	-	7	92	-	4	88	-	7	76	-	8	72

D: antibiyotik+mikroorganizma, P: antibiyotik +mikroorganizma+penaz, L: antibiyotik + mikroorganizma + laktomotor

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotik içeren ürünlerin mikrobiyolojik kontaminasyonu günümüzde ilaç endüstrisinin karşılaştığı en ciddi sorunlardandır. Bu durum kontaminasyon tespiti için standardize edilmemiş yöntemlerin olmasından kaynaklanmaktadır. Antibiyotiklerin kalite kontrollerinde kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Laktomotor enzim bazlı bir üründür ve  $\beta$  laktam türevi antibiyotiklerin etkisizleştirilmesi için kullanılır. Penaz konsantrisinde  $\beta$  laktam ve penisilinlerin türevli antibiyotiklerin inaktivasyonunda sıkça kullanılmaktadır (Drawz ve Bonomo 2010).

Çalışmamızda nötralize edici ajan olarak penazın kullanıldığı direk ekim metodundan verim alınamazken yine penaz kullanılarak yapılan membran filtrasyon yönteminde verimin %3-8 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Avrupa Farmakopesi'ne (2010) göre < %60 olan sonuçlar verimli kabul edildiğinden bu metod verimsiz olarak değerlendirilmiştir.

Penaz ile yapılan deneylerde verim alınamaması, kullanılan doz miktarının az gelmesine bağlı olabilir.

Nötralize edici ajan olarak laktamotorun kullanıldığı membran filtrasyon ekim metodunda test grubundaki sonuçlar ile inokulum grubundaki sonuçlar birbirine yakın çıkmış ve verimin %92-72 aralığında olduğu gözlenmiştir. Çalışmamıza paralel şekilde literatürde antibiyotiklerin mikrobiyolojik limit testlerinde uygun nötrleştirici maddelerle yapılan filtrasyon işlemlerinin antibiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesini kısmen ortadan kaldırdığı görülmüştür (Negretti 1997). %100 veriminin alınamaması, nötralize edici ajan konsantrasyonunun yetersiz kalması, nötralize edici ajanla antibiyotiklerinin homojen bir şekilde karışmaması, peptonlu suyla yıkamada oluşacak kontaminasyonlar gibi birçok nedene bağlı olarak gelişebilir.

Sri Agung ve ark. (2018)larının yapmış oldukları çalışmada  $\beta$  laktamaz içerikli laktamotorun, 3. kuşak sefalosporinler üzerindeki inhibe edici etkisini incelemişler ve  $\beta$  laktamaz nötralize edici ajanın enjektale 3. kuşak sefalosporinlerin

antibakteriyel aktivitesini yüksek oranda inhibe ettiğini rapor etmişleridir. Yapılan bu çalışmada olduğu gibi  $\beta$  laktam halkası içeren antibiyotikler üzerinde laktomotorun etkili olduğu görülmüştür.

Mshref ve ark. (2018)'i yaptıkları çalışmada laktomor enziminin sefpodosim proksetilin aktif olan  $\beta$  laktam halkasını hidroliz ederek antibakteriyel özelliğini inibe ettiğini bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada laktomotorun penaza göre Sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiği inhibe etmede daha etkili olduğu görülmüştür. Sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiklerde yüksek verimli ekim metodunun membran filtrasyon ekim metodu ve yüksek verimli nötralize edici ajanın da laktamator olduğu verilerle ispatlanmıştır.

### KAYNAKLAR

- Akın A. (1981). İlaçların Mikrobiyolojik Standardizasyonu. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 11-70.
- Çelik S, Alacadağ M, Erduran Y, Erduran F, Berberkayar N. (2010). Sağlık yüksekokulu öğrencilerinin antibiyotik kullanım durumlarının incelenmesi, Uluslararası İnsan Bilimleri Dergisi, 7(1): 1-12.
- Drawvz SM, Bonomo RA. (2010). Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors, Clinical Microbiology Reviews, 23(1):160-201.
- European Pharmacopoeia. (2010). 7th Ed., Vol. 1, Strasbourg: Council of Europe.
- European Pharmacopoeia. (2000). Biological Tests, Sterility Supplement. Chapter: 2. 6. 1 Strasbourg: Council of Europe.
- Gülşen Varol Ş. 2019. Sefpodoksin Proksetil İçeren Antibiyotiklerin Metod Validasyonu. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya.
- Gündoğdu E, Başpınar Y, Köksal C, Karasullu E. (2011). Evaluation of cefpodoxime proxetil complex with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in the presence of a water soluble polymer: Characterization and permeability studies, J. Pharm. Sci, 36, 137-148.
- Halkman AK. 2007. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi. Or-Lab Mikrobiyoloji Dergisi, 5(4):2-6.
- Liarrul Lİ, Testero SA, Fisher JF, Mobashery H. (2010). The Future of  $\beta$ -lactams. Curr Opinion in Microbiol, 13: 551-557.
- Mshref MF, Ghonemy MH, Ali HA. (2018). Determination of Beta-Lactamase Inactivation of Cephalexin by Validated RP-HPLC Method, World Journal of Applied Chemistry 2(4): 120-128.
- Negretti F. 1997. Microbiological control of drugs with antimicrobial properties with membrane filtration: problems, proposals, prospects. Boll Chim Farm, 136(1): 28-38.
- Öztürk Ş, Yıldız S. (2016). Türkiyede Üretilen Bazı Veteriner Enjektabl Vitamin Preparatlarının Mikrobiyolojik Kalite Kontrolleri. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi. 40(3):41-46.
- Sader HS, Jones RN, Washington JA, Murray PR, Gerlach EH, Allen SD. (1993). In vitro activity of cefpodoxime compared with other oral cephalosporins tested against 5556 recent clinical isolates from five medical centers. Diagn Microbiol Infect Dis, 17: 143-150.
- Sri Agung FK, Hargono CY, Winarno H. (2018). Betalactamase Enzyme Role in Minimizing False-Positive Result of Cefotaxime Injection End-Product Sterility J. Pharm. Sci. & Res, 10(5), 1036-1040.
- WHO(World Health Organization)(2002). Steril Pharmaceutical Products. Basic Principles of GMP. Annex 6. TRS 902. Revised: 2006.
- Yıldız İ, Varkal M, Ünüvar E. (2014). Günümüzde Sefalosporinler ve Antibiyotik Direnci. Çocuk Dergisi. 14: 1-12.