

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEFPODOKSİM PROKSETİL İÇEREN
ANTİBİYOTİKLERİN YÖNTEM VALİDASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şenay GÜLŞEN VAROL

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Kenan TUNÇ

Nisan 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SEFPODOKSİM PROKSETİL İÇEREN
ANTİBİYOTİKLERİN YÖNTEM VALİDASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şenay GÜLŞEN VAROL

Enstitü Anabilim Dalı

:

BİYOLOJİ

Bu tez 19.04.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi
Kenan TUNC
Jüri Başkanı

Doç. Dr.
Şule BARAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi
Gökay AYDIN
Üye

BEYAN

Teziindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Şenay GÜLŞEN VAROL
19.04.2019



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresi içerisinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sabrını ve bilgisini esirgemeyen, kendine güvenen bireyler olarak yetişmemizde büyük rol oynayan saygıdeğer tez danışmanım Dr. Öğr.Üyesi Kenan TUNÇ'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimi boyunca biliminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim değerli hocam Doç. Dr. Şule BARAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Biyolog Alican Bahadır SEMERCİ'ye ve Biyolog Aydan CAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, başarı ya da başarısızlığında hep yanımda olan, kendileriyle gurur ve onur duyduğum çok değerli anneme ve canım babama, yoğun çalışmalarım sırasında sabır gösterdiği ve bana güzel bir çalışma ortamı sunduğu için eşim Harun'a, nadir de olsa çalışmama izin verdiği için kızım Nil'e, çalışmalarım sırasında ümit verdiği ve destek olduğu için biricik kardeşim Sinem'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix

BÖLÜM 1.

GİRİŞ	1
-------------	---

BÖLÜM 2.

KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Antibiyotiğin Tanımı	3
2.2. Antibiyotiğin Tarihçesi	3
2.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	4
2.3.1. Sefalosporinler	5
2.3.2. Sefpodoksim proksetilin antibakteriyal özelliğinin inhibisyonu	6
2.4. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları	9
2.4.1. Türkiye’de antibiyotik kullanımı	10
2.5. Antibiyotiklerin Vücuttaki Hareketleri (Farmakokinetik)	10
2.5.1. Emilim	10
2.5.2. Dağılım	11
2.5.3. Atılım.....	11
2.6. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları(Farmakodinamik)	11

2.7. Antibiyotiklerin Yan Etkileri	13
2.8. Mikrobiyal Limit Test	14
2.8.1. Yöntem validasyonu	14
2.8.2. Analiz yöntemleri	15
2.8.3. Dilisyon hazırlanması	15
2.8.4. Kullanılan bazı test mikroorganizmaları	15
2.8.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	16
2.8.4.2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	17
2.8.4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	18
2.8.4.4. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	19
2.8.4.5. <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	20

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal	21
3.1.1. Kullanılan araç-gereçler	21
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Kullanılan besiyeri içerikleri ve hazırlanması	22
3.2.2. Tampon çözelti hazırlığı	24
3.2.3. Test mikroorganizmalarının aktifleştirilmesi.....	25
3.2.4. Mikroorganizma dilisyonlarının hazırlığı	25
3.2.5. Dökme ekim yöntemi	26
3.2.5.1. Dökme ekim yöntemi ile deneyin yapılışı	27
3.2.6. Membran filtrasyon ekim yöntemi	28
3.2.6.1. Membran filtrasyon ile deneyin yapılışı	28
3.2.7. % Verimin hesaplanması	29

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Dökme Ekim Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar	30
4.2. Penaz Kullanılarak Yapılan Dökme Ekim Yöntemi Deneyinin	

Sonuçları.....	31
4.3. Laktamator Kullanarak Yapılan Dökme Ekim Yöntemi Deneyinin Sonuçları	32
4.4. Membran Filtrasyon Ekim Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar	33
4.5. Penaz Kullanılarak Gerçekleştirilen Membran Filtrasyon Ekim Yöntemi Sonuçları	34
4.6. Laktamator Kullanılarak Gerçekleştirilen Membran Filtrasyon Ekim Yöntemi Sonuçları	35
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	36
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	43

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<i>A.brasiliensis</i>	: <i>Aspergillus brasiliensis</i>
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>C.albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
F.I.B	: Uluslararası Eczacılık Federasyonu
gr	: Gram
MİK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S.aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
TSA	: Tyriptic Soy Agar
TSB	: Tyriptic Soy Broth

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Sefalosporinlerin moleküler yapısı	7
Şekil 2.2.Sepfodoksim proksetilin protein bağlanma enzimlerinin değişimi	8
Şekil 2.3.Sepfodoksim proksetilin laktamaz enzimi ile hidrolizi	8
Şekil 2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> mikroskop görüntüsü	16
Şekil 2.5. <i>Bacillus subtilis</i> mikroskop görüntüsü	17
Şekil 2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mikroskop görüntüsü	18
Şekil 2.7. <i>Candida albicans</i> mikroskop görüntüsü	19
Şekil 2.8. <i>Aspergillus brasiliensis</i> mikroskop görüntüsü	20
Şekil 3.1. Dilisyon hazırlığı aşamaları a)TSB içerisinde bulunan bakterinin vortexile karıştırılması b)bakterinin öze yardımı ile pepton dolu tüpe aktarımı c)pipet ile seyreltme işleminin yapılışı d)kullanıma hazır seyreltilmiş dilisyonlar	25
Şekil 4.1. Dökme ekim yöntemi(<i>S.aureus</i> üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu	30
Şekil 4.2.Dökme ekim yöntemi + penaz(<i>S.aureus</i> üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu	31
Şekil 4.3.Dökme ekim yöntemi + laktamator (<i>S.aureus</i> üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu	32
Şekil 4.4.Membran filtrasyon ile ekim yöntemi(<i>S.aureus</i> üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu	33
Şekil 4.5.Membran filtrasyon ile ekim yöntemi + penaz(<i>S.aureus</i> üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu	34
Şekil 4.6.Membran filtrasyon ile ekim yöntemi + laktamator(<i>S.aureus</i> üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu	35

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması	5
Tablo 2.2. Sefalosporinlerin kuşakları ve etkinliklerindeki temel özellikler	6
Tablo 2.3. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları	12
Tablo 2.4. Antibiyotiklerin genel yan etkileri	13
Tablo 3.1. Kullanılan besiyeri marka katalog no ve lot bilgileri	22
Tablo 3.2. 1 L TSA besiyeri içeriği	22
Tablo 3.3. 1 L SDA besiyeri içeriği	23
Tablo 3.4. 1 L TSB besiyeri içeriği	24
Tablo 3.5. 1 L Pepton besiyeri içeriği	24
Tablo 3.6. Kullanılan Mikroorganizmalar	25
Tablo 4.1. Dökme ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları	30
Tablo 4.2. Penaz kullanılarak yapılan dökme ekim yöntemi analizlerinin Ortalamaları	31
Tablo 4.3. Laktamator kullanılarak yapılan dökme ekim yöntemi analizlerinin Ortalamaları	32
Tablo 4.4. Membran filtrasyon ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları	33
Tablo 4.5. Penaz kullanılarak yapılan membran filtrasyon ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları	34
Tablo 4.6. Laktamator kullanılarak yapılan membran filtrasyon ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları	35

ÖZET

Anahtar kelimeler: antibiyotik, yöntem validasyonu, laktamator, penaz, ilaç, sefalosporin, sefpodoksim proksetil

Silahlar ne kadar öldürücüye ilaçlar da en az o kadar öldürücüdür. Ani ve nicel olarak gözlenebilecek çoklukta olmasa da sürekliliği ve yeryüzünün her yerinde neden olduğu ölümlerin toplamı hesaplandığında, ilaçların ve kullanım sonuçlarının savaşıardan daha fazla öldürücü olduğu kesindir.

Üretilen ilaçların mikrobiyolojik analizlerinin çoğu Avrupa Farmakopesi baz alınarak yapılmaktadır. Vitamin, ağrı kesici vb. ilaçların mikrobiyolojik analizlerinde bir aksilik görülmezken antibiyotik ve türevlerinde sorun görülmektedir. Çünkü antibiyotikler bakteriyal kontaminasyonu inhibe etmektedir. Sağlıklı sonuçların elde edilmesi ve en iyi sonuç alınan analiz yönteminin belirlenmesi için ilaca özgü yöntem validasyonunun yapılması gerekmektedir.

90 mL peptona inoküle edilen mikroorganizmaların 10^{-5} 'lik dilisyonundan 1 mL ilave edilmiş ve üzerine 10 g antibiyotik eklenerek karıştırıldı. Ayrıca peptona nötrale edici ajan olarak 0.2 mL penaz veya 0.1 mL laktamator eklenerek üç deney grubu oluşturuldu. Membran filtrasyon ve dökme ekim yöntemleri kullanılarak nötrale edici ajanların (penaz ve laktomotorun) sefpodoksim proksetil etken maddeli antibiyotiği inhibe edicilik oranları belirlenmiştir.

Deney sonucunda membran filtrasyon yönteminin sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiğin mikrobiyal kalitesinin belirlenmesinde en uygun yöntem olduğu belirlenmiştir. Penaz ile yapılan deney sonuçlarında verim en yüksek %8 iken, laktamotor ile yapılan deney sonuçlarının %92 olduğu gözlenmiştir. Dökme ekim yöntemindeki uygulamalar antibiyotiğin etkisini inhibe etmede yetersiz kalmış ve bu yüzden test grubunda üreme gözlenmemiştir. Nötrale edici ajan olarak laktamotorun sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiği inhibe ettiği tespit edilmiştir.

METHOD VALIDATION OF ANTIBIOTICS WITH SEFPODOXIM PROKSETILE

SUMMARY

Keywords: antibiotic, method validation, lactamator, penase, drug, cephalosporin, cefpodoxime proxetil

The more deadly the weapons are, the more deadly the drugs are. When the sum of the continuity and the deaths it causes in all parts of the earth is calculated, although it cannot be observed suddenly and quantitatively, the results of the drugs and their use are more lethal than the wars.

Most of the microbiological analyzes of the drugs produced are based on the European Pharmacopoeia. Vitamin, pain reliever and so on. microbiological analysis of the drugs is not seen a problem in the antibiotics and derivatives are seen in the problem. Because antibiotics inhibit bacterial contamination. In order to obtain healthy results and to determine the best method of analysis, specific method validation should be performed.

1 mL of 10⁻⁵ dilutions of microorganisms inoculated with 90 mL of peptona were added and mixed with 10 g of antibiotic added. In addition, three experimental groups were created by adding 0.2 mL of penase or 0.1 mL lactamator to the peptone as neutralizing agent. Antimicrobial inhibition rates of cefpodoxime proxyl were determined by membrane filtration and bulk sowing methods.

As a result of the experiment, it was determined that membrane filtration method is the most suitable method for determination of microbial quality of cefpodoxime proxetil antibiotic. In the results of the experiment with Penaz, it was observed that the results of the experiment with lactamator were 92%. Applications in cast sowing were insufficient in inhibiting the effect of antibiotic and therefore no growth was observed in the test group. As a neutralizing agent, the lactamator inhibited cefpodoxime proxetil antibiotic.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Ülkemizde ilaç sanayisi son zamanlarda oldukça hızlı gelişme göstermiştir. 1960'lı yıllarda ilaçlar reçeteye göre eczacılar tarafından yapılmaktaydı. Günümüzde ise ilaçlar sayısı giderek artan ilaç fabrikalarında üretilmekte ve büyük bir hasta kitlesi tarafından kullanılmaktadır. Elimizde Türkiye'de üretilen ilaçların bir enfeksiyon kaynağı olduğunu veya olabileceğini gösteren bir bulgu bulunmamaktadır. Bu durum üretilen bütün ilaçların steril olmasından değil, ilaçların mikrobiyolojik analizleri ile ilgili çalışmaların yeterli olarak yapılmamasından kaynaklanmaktadır (Akın, 1981).

Önceleri bir tedavi aracı olarak kullanılan ilaçların mikroorganizma içerebileceği ve bazı hastalıkların nedeni olabileceği düşünülüyordu. 1963 yılında ağız yoluyla alınan ve lokal olarak kullanılan kontamine ilaçların hastalıklara neden olduğu saptandı. Bu durum ilaçların da enfeksiyon kaynağı olabileceğini gösterdi (Dony, 1976). İlaçlarda bulunması muhtemel olan kontaminasyonlar insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Örneğin; içinde *P.aeruginosa* bulunan bir göz damlası, kullanan hastalarda göz hastalığının oluşmasında rol oynar (Dony, 1976). Bu yüzden üretilen ilaçlar aseptik şartlarda üretilmese bile patojen mikroorganizma bakımından kontamine olmaması gerekmektedir.

Antibiyotikler insanlardaki bazı hastalıkların ilerlemesini önlemek, tedavi etmek ve biyolojik fonksiyonları istenen yönde değiştirmek amacıyla uygulanan etkin kimyasal ve biyolojik kökene sahip ilaçlardır (AVMA, 2006). Bu nedenle hammadde eldesi, işleme süreci ve üretim sonrasındaki kalite kontrollerin validasyonu büyük önem taşımaktadır (Öztürk ve Yıldız, 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından hammaddelerin dikkatle hazırlanmış ve valide edilmiş üretim yöntemlerine ve prosedürlere göre yürütülmek zorunda olduğu bildirilmiştir.

Üretim işlemleri Good Manufacturing Practise (GMP) prensiplerine göre gerçekleştirilmelidir (WHO, 2016).

Antibiyotiklerin insan sağlığı için önemli bir yer teşkil ettiği göz önüne alındığında, üretim aşamalarının ve mikrobiyolojik açıdan incelenmelerinin düzenli ve kontrollü bir şekilde yapılması gerektiği açıktır. İlaçlarda olası kontaminasyonu engellemek adına yapılan çalışmalar üretim aşamasından başlar (Ertürk,2006). Bu kapsamda yapılan çalışmalar; çevre kontrolleri (yüzey swabı, su, hava, basınçlı gaz kontrolleri vs.) ve hijyen kontrollerini içermektedir. Üretim aşamasında en önemli ögelerden biri üretimin yapıldığı ortamdaki kaynaklanabilecek kirlenmelerdir. Kirlenmenin üretimden, materyallerden, ekipmandan, operatörden ya da üretim ortamından kaynaklanabileceği bilinmektedir. Mikrobiyolojik bulaşma risklerini en aza indirebilmek, konuyla ilgili personelin yeteneklerine, eğitimine ve uygulamalarına bağlıdır (İçin, 2006).

Üretim prosesinde üretilen örnekler, mikrobiyolojik kirlilik açısından değerlendirilmek üzere mikrobiyoloji laboratuvarına yollanır. Laboratuvarda ürünler yöntemlerine uygun olarak çalışılmalıdır. Ancak çalışmanın yanı sıra hangi yöntemle daha verimli sonuçlar aldığımız da önemlidir. Bu yüzden Avrupa Farmakopisi'nde yer alan yöntemleri kullanmakla kalmayıp, ürüne özgü daha sağlıklı sonuçlar elde edebileceğimiz yöntemler geliştirmeliyiz.

Bu çalışmada; sefpodoksim proksetil içeren antibiyotiklerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin denenmesi ve elde edilen verilere göre en uygun yöntemin bulunması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Antibiyotiğin Tanımı

Antibiyotikler yaklaşık 75 yıldır kullanılan ve insanlığa büyük yarar sağlamış güçlü ilaçlardır (Liarrulve ark., 2001). En sade tanımı ile antibiyotikler; doğada düşük konsantrasyonlarda zaten bulunmakta olan, bir mikroorganizmanın üremesini inhibe eden maddeler olarak tanımlanabilir (Yıldızve ark., 2010). Antibiyotik ismi Yunanca anti(karşı) ve bios(yaşam) sözcüklerinden türetilmiştir. Sözlüklerde ise; bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır (Gökçe, 2017). 1940'larda antibiyotik sözcüğünü ilk kez Walksman kullanmıştır (Yıldız ve ark., 2010).

2.2. Antibiyotiğin Tarihçesi

19. yüzyılda mikrobiyoloji alanında büyük atılımlar yapılmıştır. 19. yüzyılın ikinci yarısında, mikroorganizmaların sağaltımında yararlanılabilecek potansiyele sahip olduklarını ilk düşünen Pasteur ve Joubert olmuştur. Araştırmacılar, steril idrarda iyi üreyen şarbon basillerinin diğer bakterilerle kirlenmiş idrarda üreyemediklerini ve sonunda öldüklerini saptamışlardır. Bu gözlemlerini deneysel olarak ortaya çıkarmak istemişlerdir. Pasteur ve Joubert'in diğer bakterilerle kirletilmiş idrara karıştırılan şarbon basillerinin deney hayvanlarında hastalık oluşturmadığını ortaya koymaları, enfeksiyonların antibiyotikle sağaltımı alanındaki ilk adımları oluşturmuştur (Chambers, 2001).

1928 yılında *Staphylococcus* varyantları üzerinde çalışmalar yapan Alexander Flemming, kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarının çevresinde stafilokokların

üreyemediklerini ve öldüklerini bir rastlantı sonucu görmüştür. Flemming bu mantarların Penicillum türünden olmalarından esinlenerek etken maddeye penicillum adını vermiştir. Böylece ilk antibiyotik Sir Alexander Flemming tarafından, 1928 yılında keşfedilmiştir (Topal ve ark., 2015). Bundan sonraki yıllar antibiyotik keşiflerinin altın yılları olmuştur. Bilim insanları diğer antibiyotik özellikli moleküllerin keşfi için yoğun çaba harcamışlardır (Yıldız ve ark., 2010). Domagh, 1935 yılında enfeksiyon hastalıklarının kemateropisini sülfonamidlerle başlatmış ve prontasil üzerinde yaptığı çalışmalarla 1938 yılında Nobel ödülü kazanmıştır (Aktuylu, 1998).

Streptomisinlerin, II. Dünya Savaşı'nın geniş insan kitlelerine yaydığı tüberküloz hastalığının denetim altına alınmasında büyük katkısı olmuştur. Özellikle Gr(-) mikroorganizmalarda giderek artan direnç gelişimlerine yol açmıştır. Sonuç olarak etkinliğini giderek yitirmiş ve daha dar alanlarda daha bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır. II. Dünya Savaşı'nın sonlarına doğru streptomisin, kloramfenikol ve klortetrasiklin bulunmuş vegümüze kadar yüzlerce antimikrobiyal ajan literature girmiştir (Topal ve ark., 2015).

2.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak gerekmektedir. Antibiyotikler, etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine çeşitli şekillerde sınıflandırılır (Gökçe, 2017). Mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre bakteriyostatikler ve bakterisidler olmak üzere 2 şekilde sınıflandırılırlar. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması en sık kullanılan sınıflandırmadır. Detaylı olarak Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması

BAKTERİSİDLER	BAKTERİYOSTATİKLER
Penisilinler	Tetrasiklinler
Sefalosporinler	Kloramfenikol
Aminoglikozidler	Sülfonamidler
Vankomisin	Eritromisin
Rifampisin	Klindamisin
Florokinolonlar	Mikonazol
Polimiksinler	Etambutol
Teikoplanin	

2.3.1. Sefalosporinler

Sardinya Ada'sındaki *Salmonella* salgınına karşı mücadelede araştırmalar yapan İtalya Cagliari Üniversitesi hijyen kürsüsü profesörü Giuseppe Brotzou, 1948 yılında, *Cephalosporium acremonium* mantarının *Salmonella* üremesini engellediğini gözlemlemiştir (IOM, 2010). Bu gözlemden sonra Oxford Üniversitesi'nden 2 araştırmacı tarafından ilk sefalosporin molekülü kristalize edilmiş ve "penisilin-N" adı verilmiştir (Yıldız ve ark., 2010). Bunu takiben 1964 yılında E. Lilly ilaç firması bir sefalosporin olan sefalotini ilk ruhsatlı sefalosporin olarak tıbbın kullanımına sunmuştur. Bu yıldan itibaren penisiline alternatif ilaç olarak öne çıkan sefalosporinler yaklaşık 50 yıldır kullanılmaktadırlar (Yıldız ve ark., 2014).

Günümüzde antibiyotik adı altında çok sayıda ilaç vardır. Sefalosporin bunların içinde önemli bir orana sahiptir (IOM, 2010). Sefalosporinler grup olarak beta-laktam grubu içinde yer alır. Ana biyokimyasal yapısında ortak yapı 7-amimosefalosporinik asittir. Bu yapı 6-APA yapısına benzer görünse de iki uç kısmı R ve R2 kısımları sentetik olarak yeni ilaç geliştirmeye daha uygundur. Bu özellik sayesinde birçok sefalosporin grubu antibiyotik sentezlenmiştir. Sefalosporinlerin tatları çocukların oral alımına uygundur. Genel olarak çocuklar tarafından sevilenler; sefaklor, sefdinir, sefaleksim iken, sefuroksim aksetilin

çocuklar tarafından kabulü daha zordur (Baguley ve ark., 2012). Sefalosporinler yarı ömürleri penisiline göre daha uzun olan bakterisidal ilaçlardır. İlaç profilleri güvenilirdir. Penisiline göre daha pahalı olmaları ise dezavantajdır.

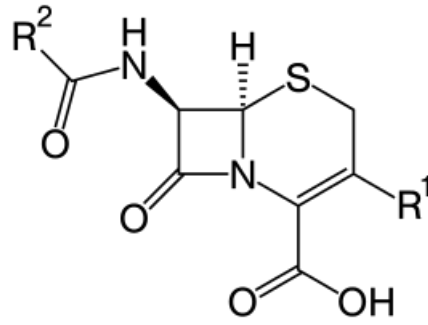
Sefalosporinler antibakteriyel etki spektrumlarına göre 'kuşak' veya 'jenerasyon' başlıkları ile gruplandırılmışlardır.

Tablo 2.2. Sefalosporinlerin kuşakları ve etkinliklerindeki temel özellikler

Birinci Kuşak Sefalosporinler	Sefaleksim	Gram pozitif etkinlikleri vardır.
	Sefadroksil	Oral kullanılırlar.
	Sefazolin	
	Sefalotin	
İkinci Kuşak Sefalosporinler	Sefaklor	Gram negative etkinlikleri vardır.
	Sefuroksim	
	Sefotetan	Hem parenteral hem oral kullanılırlar.
	Sefoksitin	
Üçüncü Kuşak Sefalosporinler	Sefotaksim	Gram negative etkinlikleri vardır.
	Seftadizm	
	Seftriakson	Parenteral kullanılırlar.
	Sefpodoksim	
Dördüncü Kuşak Sefalosporinler	Sefepim	Gram pozitif ve gram negatiflere etkinlikleri vardır. Parenteral kullanılırlar
Beşinci Kuşak Sefalosporinler	Seftarolin	Gram negative etkinlikleri vardır.
	Seftobiprole	Oral kullanılırlar.

2.3.2. Sefpodoksim proksetilin antibakteriyel özelliğinin inhibasyonu

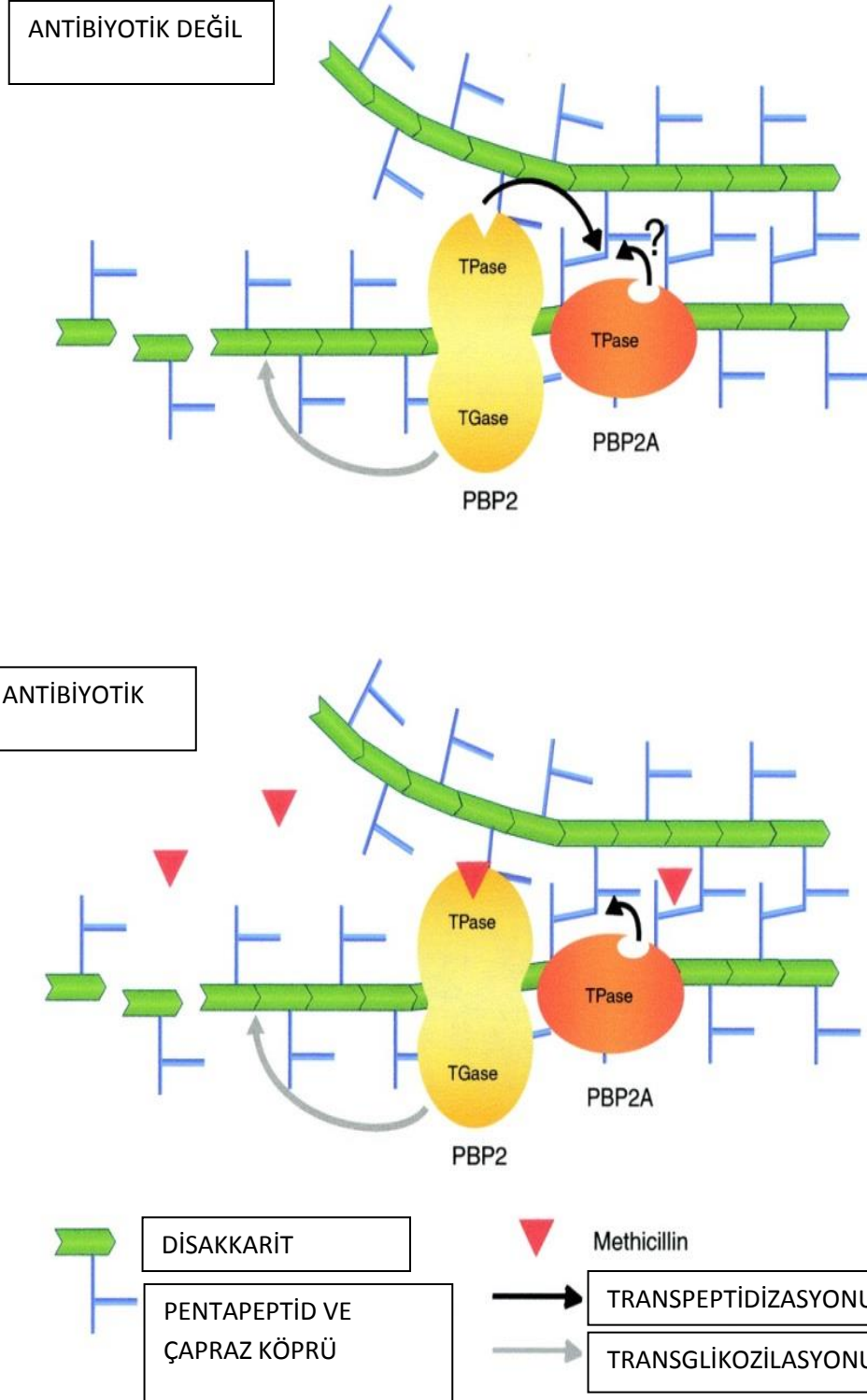
Sefalosporinler grup olarak β -laktam gurubu içinde yer alır, ana biyokimyasal yapısı ortak yapı 7-aminosefalosporinik asittir (Yıldız ve ark., 2014). Sefalosporinlerin genel moleküler yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir.



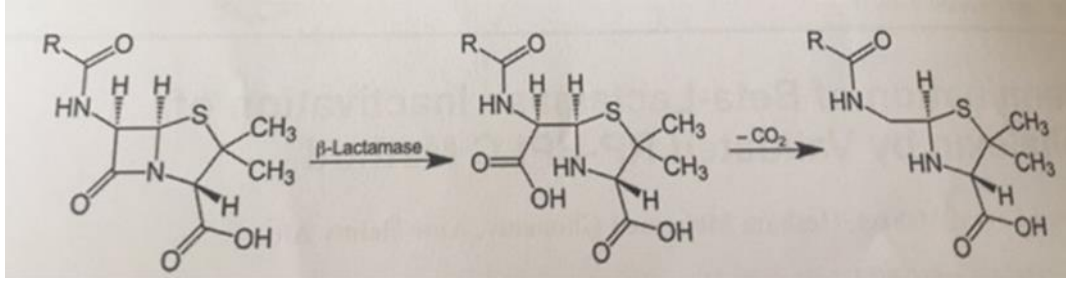
Şekil 2.1. Sefalosporinlerin moleküler yapısı (Url-6)

β -laktam türevi antibiyotikler bakteriyel organizmada hücre duvarı biyosentezini inhibe ederek çalışır ve en yaygın kullanılan antibiyotik grubudur (Mshref, ve ark., 2017).

Tüm β -laktam antibiyotiklerin yapılarında β -laktam halkası vardır. Bu nedenle β -laktamlara karşı iki ana inhibisyon şekli vardır; bunlardan birincisi penisiline bağlanarak proteinlerinin değiştirilmesi (Şekil 2.2.), ikincisi β -laktam halkasının enzimatik hidrolizidir (Şekil 2.3.).Laktamator enzimi sefodoksim proksetilin aktif laktam halkasını hidrolize eder ve bu da antibiyotiği etkisiz hale getirir. Laktamator enzimi, antibiyotik yapısını kırarak antibiyotik direnci oluşturur. Hidroliz yoluyla, β -laktam halkasını açarak molekülün antibakteriyel özelliğini etkisiz hale getirir.(Drawz, 2010).



Şekil 2.2. Sefpodoksim proksetilin protein bağlanma enzimlerinin değişimi (Url-8)



Şekil 2.3. Sepfodoksım proksetilin laktamaz enzimi ile hidrolizi (Url-7)

Laktamator enzim türevli bir üründür ve β -laktam türevi antibiyotiklerin etkisizleştirilmesi için özel olarak tasarlanmıştır. Birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kuşak sefalosporinleri etkisiz hale getirebilir. İlaç endüstrisinde rutin mikrobiyolojik incelemeden önce, test örneklerinde bulunan beta-laktam aktif ilaç bileşenlerinin etkisizleştirilmesinde kullanılır. Steril sıvı laktamator, test örneklerine doğrudan katılabilen kullanıma hazır bir çözeltilidir.

Penaz konsantresi, β -laktamların özellikle penisilinlerin inaktivasyonu için tasarlanmış yüksek saflıkta penisilaz enzimi içeren bir üründür. Mikrobiyolojik incelemelerden önce kan veya doku örneğinden β -laktamların inaktivasyonu için penaz konsantresi kullanılabilir. Test örneklerine doğrudan katılabilir. Penaz konsantresi sadece in-vitro kullanıma uygundur.

Bu çalışmada penisilaz enzimi ile penisilin bağlanma proteinlerinin değiştirilmesi ve laktamator ile de β -laktam halkasının hidrolizi amaçlanmıştır. Böylece 2 farklı inhibisyon şekli araştırılmıştır.

2.4. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları

Son yıllarda artan antibiyotik kullanımı, hayatımızın her alanında kendini göstermektedir. Özellikle insan ve hayvan sağlığı, gıda sektöründe besinlerin korunması, balık gibi sucul canlıların sağlığı ve ilaç endüstrisinde bilimsel araştırma faaliyetleri için antibiyotikler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Antibiyotikler tüm dünyada en çok kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Antibiyotikler, gelişmemiş ve az gelişmiş olan ülkelerde yanlış ve aşırı kullanılmaktadır. Avrupada antibiyotiklerin 2/3'si insan tıbbında, 1/3'i ise hayvanlarda kullanılmaktadır (Fedesa, 2001).

Ancak bilinçsiz ve gereksiz antibiyotik kullanımı sonucunda hem çevresel sorunlar hem de besin zinciri yoluyla canlılarda, özellikle insanlarda sağlık problemleri meydana gelmektedir (Topal ve ark., 2015).

2.4.1. Türkiye'de antibiyotik kullanımı

Türkiyede ilaç sektöründe yaklaşık 300 firma faaliyet göstermekte ve firmaların 53'ünün üretim tesisi bulunmaktadır. Türkiye'de, ilaç sektöründe antibiyotikler ve analjezikler başta olmak üzere, fermantasyon, ekstraksiyon ve sentez yoluyla birçok ilaç etken maddesi üretilmektedir (Sarıçay, 2009).

Türkiye'de 2002 yılında 969 milyon kutu ilaç üretilmiştir. 2002 yılında tedavi gruplarına göre ilaç kullanımı yüzdesi en fazla %18.1 ile antibiyotiklerde olmuştur.

2.5. Antibiyotiklerin Vücuttaki Hareketleri (Farmakokinetik)

2.5.1. Emilim

Bir ilacın etkin olabilmesi için enfeksiyonun bulunduğu bölgeye ulaşmasından önce ilacın uygulama yerinden emilmesi gereklidir. Genellikle damar içine uygulama ile emilimin tam olduğu kabul edilirken, kas içine ya da oral uygulamada emilim tam olmaz ve daha yavaştır (Aktuylu, 1997). Emilim ile ilgili iki önemli parametre vardır. Bunlardan ilki emilim derecesi yani oranı diğeri ise emilim hızıdır. Bu iki parametre o antibiyotiğin biyoyararlanımını belirler. Biyoyararlanım antibiyotiğin fiziksel ve kimyasal özellikleri kadar, hastanın fizyolojik ve patolojik durumu ile de ilgili olarak değişkenlik gösterir (Aktuylu, 1997 ; Karten, 2000).

İlacın emiliminde rol oynayan birçok faktör vardır. Bunlar ilacın kendi biyokimyasal yapısı, gastrointestinal sistemin hareketi, geçiş zamanı, kan akış hızı, gastrointestinal sistem içeriği ve pH'ı, bağırsak duvarının metabolizması, ilaç-ilaç ve ilaç-gıda etkileşimidir (Aktuylu, 1997).

2.5.2. Dağılım

İlacın dağılım hacmi; bir ilacın vücutta denge içinde dağılımı sonucu elde edilen plazma konsantrasyonunu belirleyen sıvının hacmidir. Vücutta ilacın dağılımını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Antibiyotiklerin lipid çözünürlüğünün iyi olması, plazma proteinlerine bağlanma oranlarının düşük olması ve doku proteinine bağlanma özelliklerinin yüksek olması, daha yüksek doku penetrasyonuna yol açmaktadır. Doku penetrasyonunun yüksekliği aynı zamanda plazma konsantrasyonunun düşüklüğü anlamını taşımaktadır (Karten, 2000).

2.5.3. Atılım

Eliminasyon antibiyotiğin aktif olan kısmının vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Antibiyotiklerin önemli bir kısmının eliminasyonu değişmeden veya metabolitleri ile böbrekler aracılığı ile olmaktadır. Bu nedenle böbrek yetmezliği olan hastalarda doz aralığının açılması, doz azaltılması veya bu iki yöntemin birlikte uygulanması gerekebilir (Aktuylu, 1997). Antibiyotiklerin ikinci önemli eliminasyonu karaciğer yoluyla olur. Lipofilik ilaçlar karaciğer yoluyla elimine olur. Karaciğer özellikle böbrek tarafından yapılamayan eliminasyonların yapılmasında önemli rol oynar. Böbrek ve karaciğer dışında bilinen eksresyon ve dışkı ile eliminasyon gibi diğer eliminasyon yolları klinikte daha az önemlidir (Karten, 2000).

2.6. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları(Farmakodinamik)

Farmakodinamik, antibiyotik ile mikroorganizmanın etkileşimini zaman dilimi içinde inceler ve antibiyotik konsantrasyonlarındaki değişikliklerin mikroorganizmanın büyüme dinamiklerine ve ölümüne olan etkisini ifade eder. Bu

etkileşim başlıca iki alandaki etkileri değerlendirmeyi amaçlar. Etki değerlendirme kriterleri;

1. Antibiyotik konsantrasyonundaki artış ile mikroorganizma ölüm hızı ve boyutu arasındaki ilişki,
2. Antibiyotik düzeyleri MİK değerinin altına düştüğünde mikroorganizmanın büyümesinde inhibitör etkilerin devam edip etmediği, ediyorsa bunun boyutu ile ilişkisi (Çevik, 2007).

Tablo 2.3. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları

Bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek veotolitik enzimleri active ederek	Penisilin
	Sefalosporin
	Monobaktamlar
	Karbapenemler
	Basitrasin
	Vankomisin
	Teikoplanin
	Ristosetin
Sikloserin	
Sitoplazma membrane permeabilitesini bozarak	Polimiksinler
	Amfoterisin B
	Gramisidin
	Nistatin
	Ketokonazol
	Flukonazol
Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek	Aminoglikozidler
	Tetrasiklinler
	Eritromisin
	Klindamisin
	Kloramfenikol
DNA ve RNA sentezini bozarak	Kinolonlar
	Rifampisin
	Mitomisin-in
	Aktinomisin
	Doksorubisin
	Daunorubisin
Intermedier metabolizmayı bozarak	Sülfonamidler
	Sulfonlar

2.7. Antibiyotiklerin Yan Etkileri

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bir maddenin ilaç amacına uygun biçimde profilaksi, tanı ya da tedavi amacıyla kullanıldığı dozlarda ortaya çıkan hedeflenmemiş ve zararlı etkilere yan etkiler denir (WHO, 2005).

Antibiyotik kullanımının artışı ile birlikte ilaçlara bağlıyan etki görülme sıklığı da artmaktadır. Tüm antibiyotiklerin potansiyel olarak yan etki riski vardır.

İlaç seçiminde antibiyotiğin terapötik etkisi ile yan etki riski mutlaka karşılaştırılmalıdır. Antibiyotiklerin yan etkisi geniş bir spektrum gösterir (Aktuyulu,1997 ; Ulutan, 2004).

Tablo 2.4. Antibiyotiklerin genel yan etkileri

Hematolojik	Böbrek	Karaciğer	Sinir sistemi
Aplastik anemi	İntertisiyel nefrit	Transaminaz yüksekliği	Ototoksisite
Hemolitik anemi	Ürik asit nefropatisi	Kolestatik hepatit	Görme bozukluğu
Megaloplastik anemi	Metabolitlerin nefrotoksisitesi	Kernikterus	Konvulsiyon
Nötropeni	Hematuri	Hepatic nekroz	Pişşik bozukluklar
Kanama	Albuminüri		Periferik nöropati
Lökopeni	Akut tübüler nekroz		Nöromusküler blok
Eozinofili			Ensefalopati
Trombositopeni			Ataksi
Tromosit disfonksiyonu			Baş ağrısı
			Baş dönmesi
			Halüsinasyon

2.8. Mikrobiyal Limit Test

Toplam aerobik bakteri ve toplam küf maya sayısının tespitinde kullanılan testtir. Spesifik mikroorganizmaların varlığının belirlenmesi amacıyla kullanılan kantitatif bir analiz yöntemidir. Steril olma zorunluluğu olmayan ürünler Avrupa Farmakopesi'nde yazan limit belirleme testlerine göre analize alınır. Farmakopede yazan değer aralığında bulununan sonuçlarda ürün temiz kabul edilir. Ürünlerdeki mikrobiyal kirliliğin tespiti çok önemlidir. Bu yüzden limit testleri dikkatli ve özenli yapılmalı doğru sonuçlar raporlandırılmalıdır.

2.8.1. Yöntem validasyonu

Mikrobiyal limit testlerinde Avrupa Farmakopesi dikkate alınarak çalışılır. Ancak Avrupa Farmakopesi'nde yer alan analiz yöntemleri genel olarak kullanılan yöntemlerdir. Daha verimli sonuçlar elde edilebilmesi için bu yöntemlerin ürüne özgü hale getirilmesi gereklidir. Avrupa Farmakopesi dikkate alınarak ürüne özgü yöntemler AR-GE laboratuvarları tarafından geliştirilir.

Yöntem validasyonlarının doğruluğu kanıtlanmalıdır. Bunun için tekrarlanabilir olması ve sonuçlarının birbirinden çok farklı olmaması gereklidir. Bir yöntem validasyonunun kabul görebilmesi için aynı çalışmanın tüm şartlar aynı kalmak suretiyle 3 kere tekrarlanması, kontrol guruplarının olması ve verim yüzdelerinin Avrupa Farmakopesi'nde istenilen aralıklarda olması gerekmektedir.

Yöntem validasyonlarında üründeki kirliliğin optimum verimde elde edilmesi adına farklı analiz yöntemleri, farklı dilisyonlar, belli mikroorganizmalar denenir.

2.8.2. Analiz yöntemleri

Antibiyotiklerin analizlerinde üç temel ekim yöntemine başvurulmaktadır. Doğru analiz yöntemlerinin seçiminde Avrupa Farmakopesi'nde var olan tekniğin, antibiyotikteki kirliliklerin tespitinde en yüksek derecede verimlerin alınması adına

valide edilmesi gerekmektedir. Yöntem validasyonlarında en doğru tekniği bulmak adına bu yöntemler denenmektedir. Bu yöntemler; membran filtrasyon yöntemi, dökme ekim yöntemi ve yüzeye yayma ekim yöntemidir.

2.8.3. Dilüsyon hazırlanması

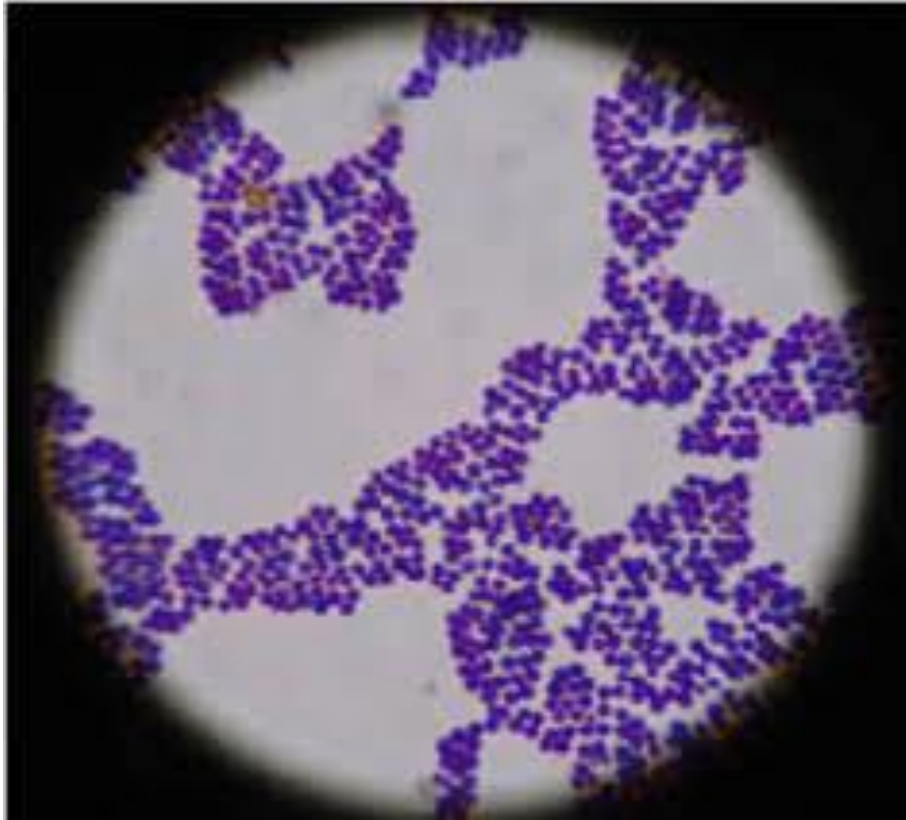
Seyreltme yapma, mikrobiyolojik yönden incelemeye alınan orijinal örnek içindeki mikroorganizma sayısının belli oranlarda seyreltilerek (dilüe edilerek) daha aza indirilmesini amaçlayan bir işlemdir. Bu amaçla kullanılan sıvılara dilüsyon çözeltisi (seyreltme sıvısı) denir. Seyreltmede iki husus çok önemlidir. Bunlar; seyreltme çözeltisinin seçimi ve seyreltme oranıdır. Seyreltme çözeltisinin mikrobiyal sayı üzerinde bir değişikliğe neden olmaması gerekir. Çözücü ilave etmek suretiyle çözeltinin konsantrasyonunun azaltılması işlemine seyreltme(dilüsyon) denir. Bu işleme yüksek konsantrasyonlu çözeltilerden düşük konsantrasyonlu çözelti hazırlamak için başvurulur. Bu seyreltme ile oluşan gelen madde konsantrasyonunun azalmasını düzeltmek için hesaplanan faktöre dilüsyon faktörü denir.

2.8.4. Kullanılan bazı test mikroorganizmaları

Antibiyotiklerde patojen olmayan mikroorganizmaların belli limitlerde kabul edilebilir olmasına karşın patojen olan mikroorganizmaların antibiyotikte kesinlikle barınmaması gerekmektedir. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerin validasyonu kapsamında numune içine katılan patojen mikroorganizmalar mevcuttur. Amaç yöntemin, mikroorganizma içeren ürünlerdeki bu patojenlerin varlığını tespit edip etmediğini görmektir.

2.8.4.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Staphylococcus aureus aerobik bakteriler arasındadır. Fakültatif aerobdur. Hem oksijenli hem oksijensiz ortamlarda glikozdan asit oluşturabilir. Gram pozitif koktur. Hücre kümeleri oluşturur. Katalaz pozitifdir. Kurumaya ve yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı oldukça yüksek direnç gösterir. *Staphylococcus aureus* cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından invazif kemik-eklem enfeksiyonları, menenjit ve artrit gibi patolojik durumlarla ilgili olarak ortaya çıkan bir organizmadır. Taşıdığı sarı pigmentten dolayı görünüşü sarı renktir (Martinko, 2014; Bucak ve ark., 2014).

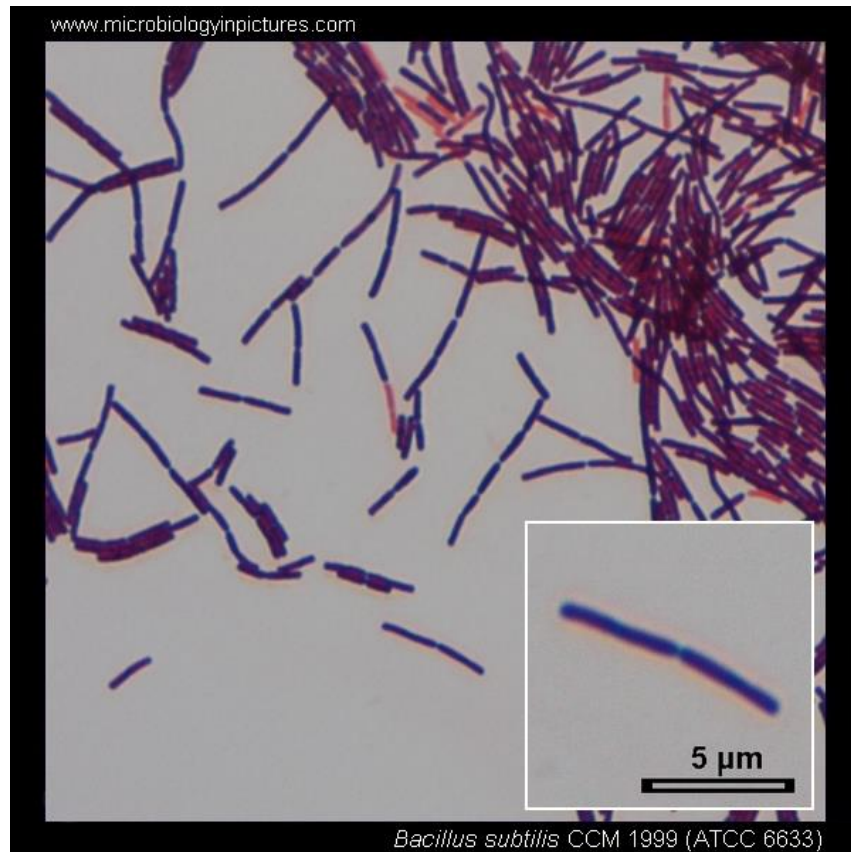


Şekil 2.4. *Staphylococcus aureus* mikroskop görüntüsü (Url-1)

2.8.4.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacillus subtilis oksijenli solunum veya geçici oksijenli solunum yapan, 25-35°C üreyen bir bakteri cinsidir. Gram pozitif, kirpikli bir basildir. Doğada çok yaygın olarak bulunur. Kapsülsüzdür ve zenginleştirilmemiş besiyerinde çok rahat üreyebilir.

B. subtilis gıdaları kontamine ederek gıda zehirlenmelerine yol açabilir. Düşük toksijenik özelliğe sahip olmakla beraber maruz kaldığında alerjiye sebep olabilir. Rough(pütürlü) şeklinde koloniler oluşturur. Beyazımsı renktedir (Bilgehan, 1995; Ağaçfıdan ve ark. 2005).

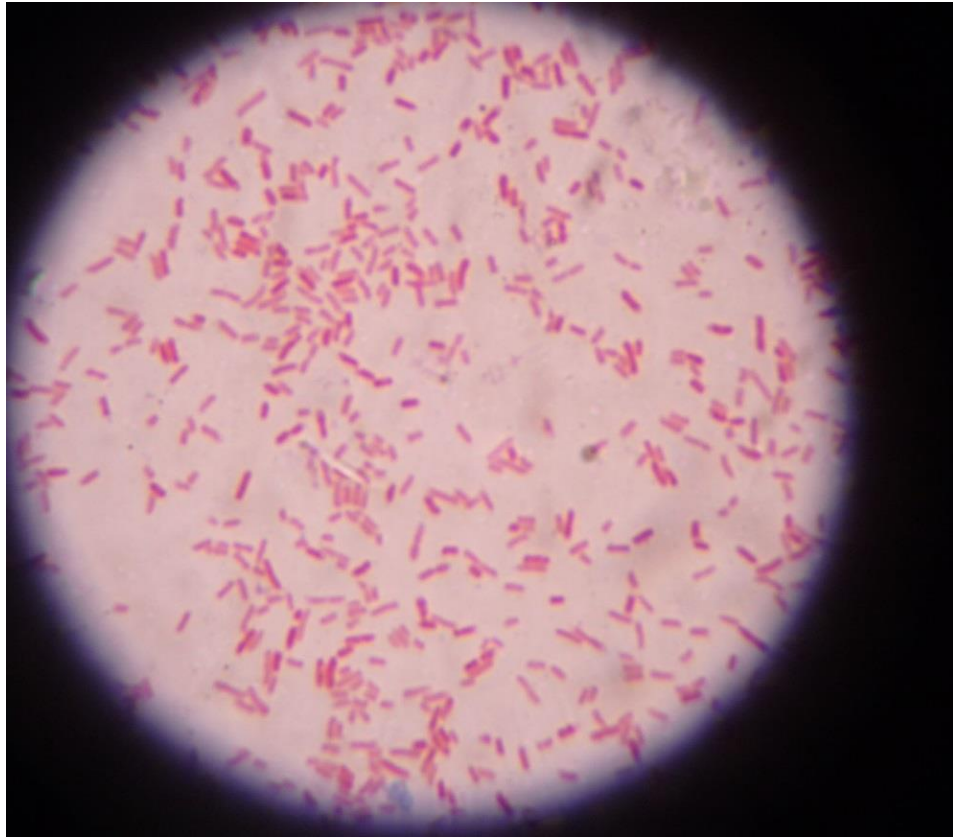


Şekil 2.5. *Bacillus subtilis* mikroskop görüntüsü (Url-2)

2.8.4.3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Pseudomonas aeruginosa gram negatif, çubuk şeklinde, kemoorganotrofik aerobik morganizmalardır. Polimer kamçıkları vardır. Katalaz pozitifler.

Pseudomonas türlerinin birçoğu patojeniktir. Fırsatçı bir organizma olan bu bakteri vücut direnci düşük kişilerde enfeksiyonlara neden olur. *Pseudomonas aeruginosa* insanda idrar ve solunum yolları enfeksiyonlarına sebep olur. Yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir (Aktaş ve ark. 2012;Martinko, 2014).



Şekil 2.6. *Pseudomonas aeruginosa* mikroskop görüntüsü(Url-3)

2.8.4.4. *Candida albicans* ATCC 10231

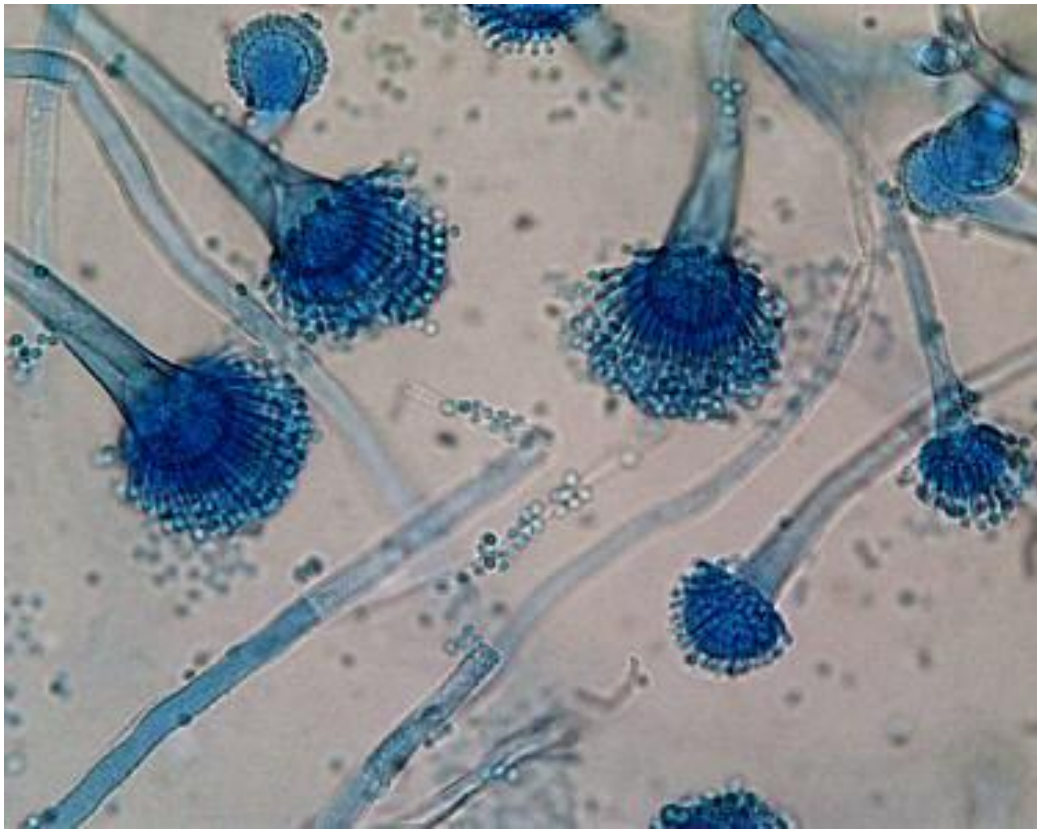
Tek hücreli fungus olup *Ascomycetes*'lere dahildir. Eşeyli çoğalan, diploid, maya tipi bir mantar türüdür. Maya hücreleri bakteri hücrelerinden çok daha büyüktür. İnsanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonların etmenidir (Kingsbury ve Wagner, 1990; Martinko, 2014).



Şekil 2.7. *Candida albicans* mikroskop görüntüsü (Url-4)

2.8.4.5. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Küfler filamentli funguslardır. Doğada yaygındırlar. Mikroskopta bir sap, sapa bağlı bir top ve topun etrafına doğru yayılan püsküller şeklinde görülür. Paranasal sinus hastalıklarına sebep olurlar. Gıda bozulmalarına da neden olmaktadır.(Varga ve ark., 2011; Martinko, 2014).



Şekil 2.8. *Aspergillus brasiliensis* mikroskop görüntüsü (Url-5)

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada, eczanelerden temin edilen sefpodoksim proksetil içerikli 20 kutu antibiyotik kullanılmıştır. Deneyde kullanılan test mikroorganizmaları (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*) Kemiteks firmasından liyofilize olarak satın alınmıştır. Çalışmalar Sakarya Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1.1. Kullanılan araç-gereçler

Araştırmamızda kullanılan başlıca ekipmanlar, 30-35°C ve 20-25°C inkübatör, su banyosu, vortex, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, mikropipet, laf kabini, hassas terazi, filtre, membran filtrasyon cihazı, koloni sayıcıdır.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmamızda kullanılan nötralize edici ajanlar(laktamator ve penaz) CPC firmasından satın alınmıştır.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada direk ekim yöntemi ve membran filtrasyon ile ekim yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1. Kullanılan besiyeri içerikleri ve hazırlanması

Araştırmamızda kullanılan besiyerleri Merck firmasından satın alınmıştır. Besiyerleri aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Çalışmamızda Tryptic Soy Agar, Tryptic Soy Broth, Sabouraud Dextrose Agar besiyerleri kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan besiyeri marka katalog no ve lot bilgileri

BESİYER ADI	MARKASI	KATALOG NO	LOT NO
TSA	MERCK	1.05458	VM780458
SDA	MERCK	1.05438	VM811438
TSB	MERCK	1.05459	VM785759

TSA besiyerini hazırlamak için 40 gram toz halindeki TSA 1 L suda karıştırılarak çözüldü. Ph'ı sterilizasyon sonrası 7.3 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı. Otoklavda 100°C'de 15 dakika eritildi. Çıkartılıp 45°C'ye geldikten sonra 250 mL'lik şişelerde kapakları yarım kapatılarak otoklava konuldu. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Kullanım zamanına kadar +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir.

Çözünürlük: Tam çözünür

Renk: Saydam, açık amber

Koku: Besiyerine özgü koku

Raf ömrü: 4 hafta

Tablo 3.2. 1 L TSA besiyeri içeriği

Pancreatic Digest of Casein	15.0g
Papaic Digest of Soybean	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g

SDA besiyerini hazırlamak için 65 gram toz halindeki SDA 1 L suda karıştırılarak çözüldü. PH'ı sterilizasyon sonrası 5.6 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı. Otoklavda 100°C'de 15 dakika eritildi. Çıkartılıp 45 °C'ye geldikten sonra 250 mL'lik şişelere bölündü. Kapakları yarım kapatılarak otoklava konuldu.121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Kullanım zamanına kadar +4°C'de buzdolabında bekletildi.

Çözünürlük: Tam çözünür

Renk: Saydam, sarımsı kahverengi

Koku: Besiyerine özgü koku

Raf ömrü: 4 hafta

Tablo 3.3. 1 L SDA besiyeri içeriği

Peptic Digest of Animal Tissue	5.0g
Pancreatic Digest of Casein	5.0 g
Dextrose	40.0 g
Agar	15.0 g

TSB besiyerini hazırlamak için 30 gram toz halindeki TSB 1 L suda karıştırılarak çözüldü. pH'ı sterilizasyon sonrası 7.3 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı.250 mL'lik şişelerde, kapakları yarım kapatılarak otoklava konuldu.121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

Çözünürlük: Tam çözünür

Renk: Saydam, açık amber

Koku: Besiyerine özgü koku

Raf ömrü: 4 hafta

Tablo 3.4. 1 L TSB besiyeri içeriği

Pancreatic Digest of Casein	17.0g
Papaic Digest of Soybean	3.0 g
Dextrose	2.5 g
Sodium Chloride	5.0 g
Dipotassium Phosphate	2.5 g

3.2.2. Tampon çözelti hazırlığı

Bu çalışmada tampon özelti olarak NaCl Pepton pH: 7.00 solüsyonu kullanıldı. 3.6 g potasyum dihidrojen fosfat, 7.2 g disodyum hidrojen fosfat, 4.3 gr sodyum klorid, 1.0 g meat pepton tartıldı. 1 L suda karıştırılarak çözündürüldü. pH'ı sterilizasyon sonrası 7.0 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı. 250 mL'lik şişelere konularak ve kapakları yarım kapatılarak otoklarda 121°C'de 15 dakika steril edildi.

Çözünürlük: Tam çözünür

Renk: Saydam, renksiz

Koku: Besiyerine özgü koku

Raf ömrü: 4 hafta

Tablo 3.5. 1 L pepton besiyeri içeriği

Potassium Dihydrogen Phosphate	3.6g
Di-sodium Hidrogen Phosphate	7.2 g
Sodium Chloride	4.3 g
Meat Pepton	1.0 g

3.2.3. Test mikroorganizmalarının aktifleştirilmesi

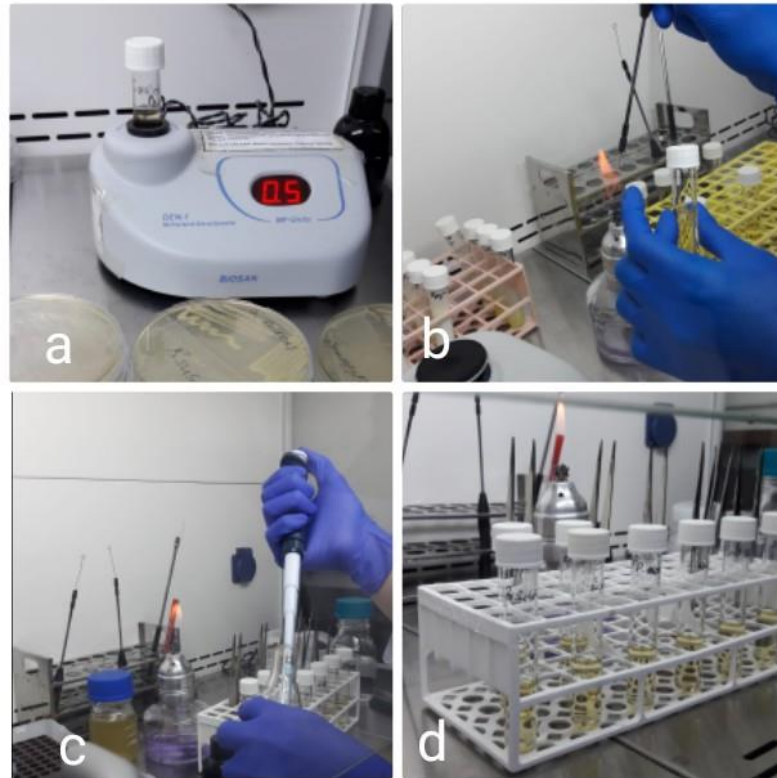
Hazır olarak satın alınan liyofilize kültürlerden mikroorganizmalar aktifleştirilmiştir. Bunun için liyofilize kültür 100 mL TSB içerisine inoküle edilmiş ve 24 saat 30-35°C'lik inkübatörde üremesi için bekletilmiştir. 24 saatin sonunda TSB içerisinde üremiş olan mikroorganizmalardan bakteriler için TSA, küf ve mayalar için SDA besiyerine inoküle edilmiştir. Bakteriler 30-35°C'lik inkübatörde 24 saat, küf ve mayalar 20-25°C'lik inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. Taze aktifleştirilmiş kültürlerden dilisyonlar hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. Kullanılan Mikroorganizmalar

BAKTERİ ADI	ATCC KODU	MARKASI
<i>S.aureus</i>	ATCC 6538	Microbiologics- 485
<i>P.aeruginosa</i>	ATCC 3027	Microbiologics- 484
<i>B.subtilis</i>	ATCC 6633	Microbiologics- 486
<i>C.albicans</i>	ATCC 10231	Microbiologics- 443
<i>A.brasiliensis</i>	ATCC 16404	Microbiologics- 392

3.2.4. Mikroorganizma dilisyonlarının hazırlanması

Aktifleştirilmiş suşlar ortalama 0.5 Mc Farland değeri olacak şekilde yoğunlukları ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonlardan pepton çözeltisi kullanılarak dilisyon serisi (10^{-1} - 10^{-5}) hazırlanmıştır. Mikroorganizma sayısının az olması deneyin verimliliğini hesaplamak için önemlidir. Bu nedenle analizlerde 10^{-5} 'lik dilisyon kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Dilisyon hazırlığı aşamaları a) TSB içerisinde bulunan bakterinin vortex ile karıştırılması b) bakterinin öze yardımı ile pepton dolu tüpe aktarımı c) pipet ile seyreltme işleminin yapılması d) kullanıma hazır seyreltilmiş dilisyonlar

3.2.5. Dökme ekim yöntemi

9 cm çapındaki petrilere test örneklerinden 1 mL numune dökülür. 40-45° C sıcaklıkta olan besiyerinden 15-20 mL petriye aktarılır. Karıştırılarak katılaşmaya bırakılır.

3.2.5.1.Dökme ekim yöntemi ile deneyin yapılışı

Test grubu:

90 mL peptonun içine kullanılan mikroorganizmaların 10^{-5} 'lik dilisyonundan (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) 1 mL eklenmiş ve üzerine 10 g sefopodoksim proksetil içeren antibiyotik eklenerek karıştırılmıştır. Petriye bu karışımdan birer mL aktararak dökme ekim yöntemi ile 3 farklı çalışma yapılmıştır.

Test grubunun;

- 1.Çalışma kontrol grubu olarak nötralize edici ajan eklenmeden,
- 2.Çalışmaya nötralize edici ajan olarak 0.2 mL penaz eklenerek,
- 3.Çalışmada ise nötralize edici ajan olarak 0.1 mL laktamator kullanılarak yapılmıştır.

Hazırlanan karışımdan 1 mL petriye aktararak üzerine besiyeri dökülmüştür.

Pepton grubu:

90 mL peptonun içine 10^{-5} 'lik mikroorganizma dilisyonundan (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) 1 mL ilave edilmiştir. Petriye bu karışımdan 1'er mL aktarılmıştır.

Pepton grubunun;

1. Çalışması nötralize edici ajan eklenmeden,
2. Çalışmaya nötralize edici ajan olarak 0.2 mL penaz eklenerek,
3. Çalışmada ise nötralize edici ajan olarak 0.1 mL laktamator kullanılmıştır. Hazırlanan karışımdan 1 mL petriye aktarılarak üzerine gerekli besiyeri dökülmüştür.

İnokulum grubu:

10^{-5} 'lik mikroorganizma dilisyonundan (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) 1 mL petriye aktarıldı. Her çalışma için ayrı inokulum grubu hazırlanmıştır. İnkübasyon süresince petriler her gün kontrol edilmiş, üreme görülmesi varsa sayılarak belirlenmiş ve not alınmıştır.

Tüm deney gruplarında bakteri içeren petrilere TSA besiyeri, küf ve maya içeren petrilere SDA besiyeri dökülmüş ve donmaları için bir süre beklenilmiştir. Bakteri inokülasyonu gerçekleştirilen petriler 30-35°C'lik inkübatörde 5 gün süreyle, küf ve maya petrileri 20-25°C'lik inkübatörde 7 gün süreyle inkübe edilmiştir.

3.2.6. Membran filtrasyon ekim yöntemi

Membran filtrasyon yöntemi ile büyük partiküller içermeyen sıvıların mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilir. Porçapı $0.45\mu\text{m}$ 'yi geçmeyecek özellikteki membran filtreler kullanılır. Membran filtrasyon yönteminde amaç $0.45\mu\text{m}$ 'dan büyük olan bakterilerin porlarda tutunması ile çok az sayıda mikroorganizma içeren ürünlerde dahi sağlıklı sonuç alınabilmektir. Filtre materyal tipi, mikroorganizma tutma potansiyeli test edilecek örneğin komponentlerinden etkilenmeyecek şekilde seçilir. Yöntem validasyonlarında her mikroorganizma için bir filtre kullanılır. Örnek, membran filtreye transfer edilir, hemen filtre edilir ve

filtre uygun miktarda pepton ile yıkanır (Köksal ve Samastı, 2007; Kireççi ve ark., 2016).

3.2.6.1. Membran filtrasyon ile deneyin yapılışı

Test grubu:

TSA ve SDA besiyeri petrilere dökülerek çalışma aşamasına kadar +4°C'de bekletilmiştir. 90 mL peptonun içine 10^{-5} 'lik örnek mikroorganizma dilisyonundan (*S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B.subtilis*, *C.albicans*, *A.brasiliensis*) 1 mL ve 10g sefpodoksim proksetil içeren antibiyotik eklenerek karıştırılmıştır. Hazırladığımız karışımdan 1 mL filtreye aktarılarak süzdürülmüş ve 300 mL pepton aynı filtreden geçirilerek filtrenin temizlenmesi sağlanmıştır. Filtreler steril pens yardımı ile besiyerlerine yerleştirilmiştir. Membran filtrasyon ekim yöntemi ile 3 farklı çalışma gerçekleştirilmiştir.

Test grubunu:

1. Çalışma kontrol grubu olarak nötralize edici ajan eklenmeden,
2. Çalışmaya nötralize edici ajan olarak 0.2 mL penaz eklenerek,
3. Çalışmaya ise nötralize edici ajan olarak 0.1 mL laktamator peptonlu karışımla karıştırılarak hazırlanmıştır.

Pepton grubu:

90 mL peptona 10^{-5} 'lik mikroorganizma dilisyonundan (*S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B.subtilis*, *C.albicans*, *A.brasiliensis*) 1 mL eklenmiştir. Hazırladığımız karışımdan 1 mL filtreye aktarılarak süzülüş daha sonra 300 mL pepton aynı filtreden geçirilerek filtrenin temizlenmesi sağlanmıştır. Filtreler steril pensle ile önceden döktüğümüz TSA ve SDA içeren petrilere aktarılmıştır.

Pepton grubunun:

- 1.Çalışma nötralize edici ajan ekmeden,
- 2.Çalışma nötralize edici ajan olarak 0.2 mL penaz eklenerek,
- 3.Çalışmada nötralize edici ajan olarak 0.1 mL laktamator eklenerek yapılmıştır.

İnokulum grubu:

10^{-5} 'lik mikroorganizma dilisyonundan (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*) 1 mL filtreden süzölmüştür. Filtreler steril pens yardımı ile önceden hazırlanan petrilere yerleştirilmiştir. Her çalışma için ayrı inokulum grubu hazırlanmış ve tüm çalışmalar 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon aşamasında petrilere her gün rutin olarak kontrol edilerek üreme sayısı takip edilmiştir.

Tüm deney gruplarında bakteri içeren filtreler 30-35°C'lik inkübatörde 5 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. Küf ve maya içeren filtreler 20-25°C'lik inkübatörde 7 gün bekletilmek suretiyle inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.7. % Verimin hesaplanması

Verim hesaplaması yapılırken aşağıdaki eşitlik denklemini (Denklem 3.1) kullanılmıştır. Test grubundan elde edilen veri, inokulum grubundan elde edilen veriye bölünmüş ve 100 ile çarpılmıştır. Sonuçlar cfu/g olarak verilmiştir. (3.1)

$$\% \text{ verim} = \frac{\text{test grubu}}{\text{inokulum grubu}} \times 100$$

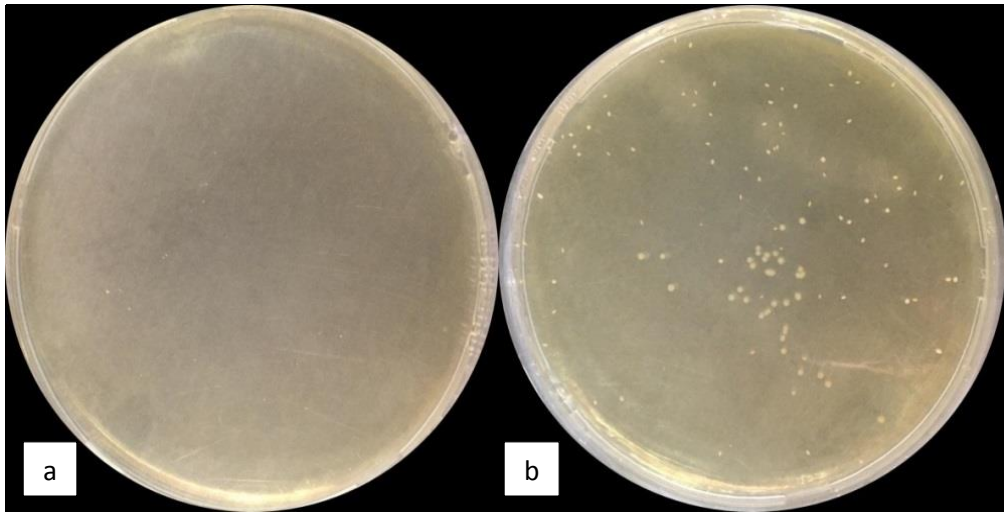
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Dökme Ekim Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlar

Dökme ekim yönteminde test, pepton ve inokulum grupları, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* mikroorganizmaları kullanılarak 3 grup şeklinde çalışılmıştır. Elde edilen verilerin ortalaması, çalışılan bakteriler ve çalışma grupları Tablo 4.1.'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre test grubunda üreme gözlenmemiş ve yöntem verimsiz kabul edilmiştir.

Tablo 4.1. Dökme ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları

Çalışma Grupları	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
test grubu	0	0	0	0	0
pepton grubu	47	61	58	25	21
inokulum grubu	50	62	60	25	24



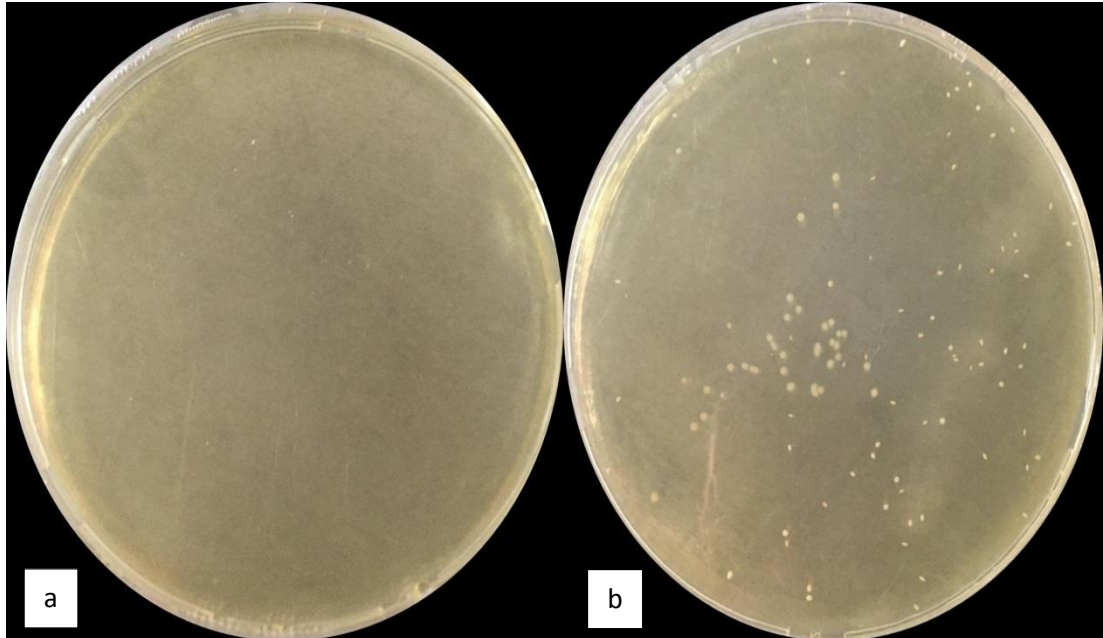
Şekil 4.1. Dökme ekim yöntemi (*S. aureus* üzerinde) a) test grubu b) inokulum grubu

4.2. Penaz Kullanılarak Yapılan Dökme Ekim Yöntemi Deneyinin Sonuçları

Penaz kullanılarak yapılan dökme ekim yönteminde test, pepton ve inokulum grupları, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* mikroorganizmaları kullanılarak 3 grup şeklinde çalışılmıştır. Elde edilen verilerin ortalaması, çalışılan bakteriler ve çalışma grupları Tablo 4.2.'de verilmiştir. Test grubunda üreme gözlenmemiştir.

Tablo 4.2. Penaz kullanılarak yapılan dökme ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları

Çalışma Grupları	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
test grubu	0	0	0	0	0
pepton grubu	50	62	65	22	18
inokulum grubu	51	65	66	23	21



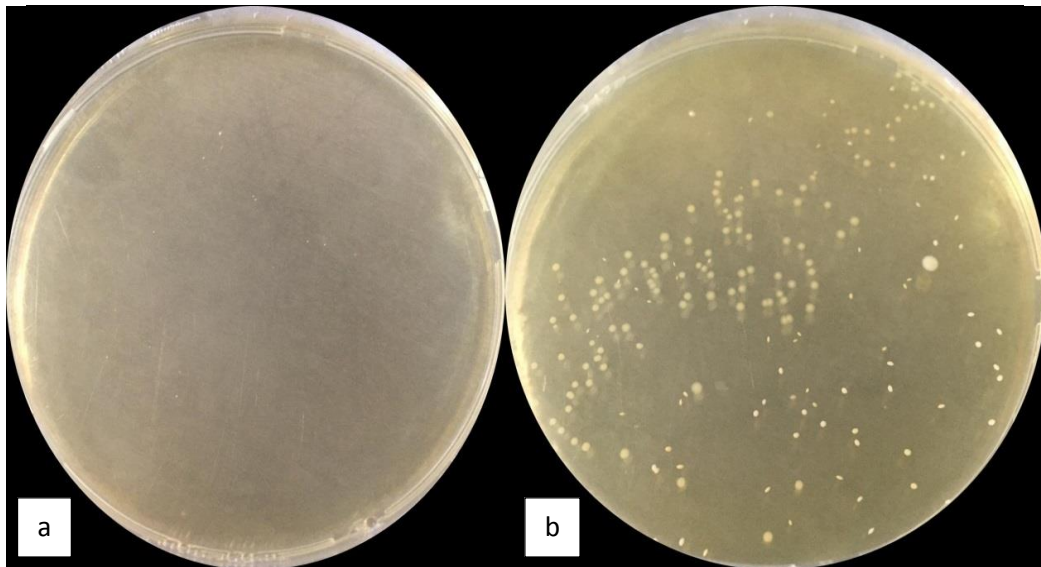
Şekil 4.2. Dökme ekim yöntemi + penaz (*S.aureus* üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu

4.3. Laktamator Kullanılarak Yapılan Dökme Ekim Yöntemi Deneyinin Sonuçları

Laktamator kullanılarak yapılan dökme ekim yönteminde test, pepton ve inokulum grupları, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* mikroorganizmaları kullanılarak 3 grup şeklinde çalışılmıştır. Elde edilen verilerin ortalaması, çalışılan bakteriler ve çalışma grupları Tablo 4.3.'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre test grubunda üreme gözlenmemiş ve yöntem verimsiz kabul edilmiştir.

Tablo 4.3. Laktamator kullanılarak yapılan dökme ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları

Çalışma Grupları	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
test grubu	0	0	0	0	0
pepton grubu	49	63	58	23	17
inokulum grubu	53	64	62	22	20



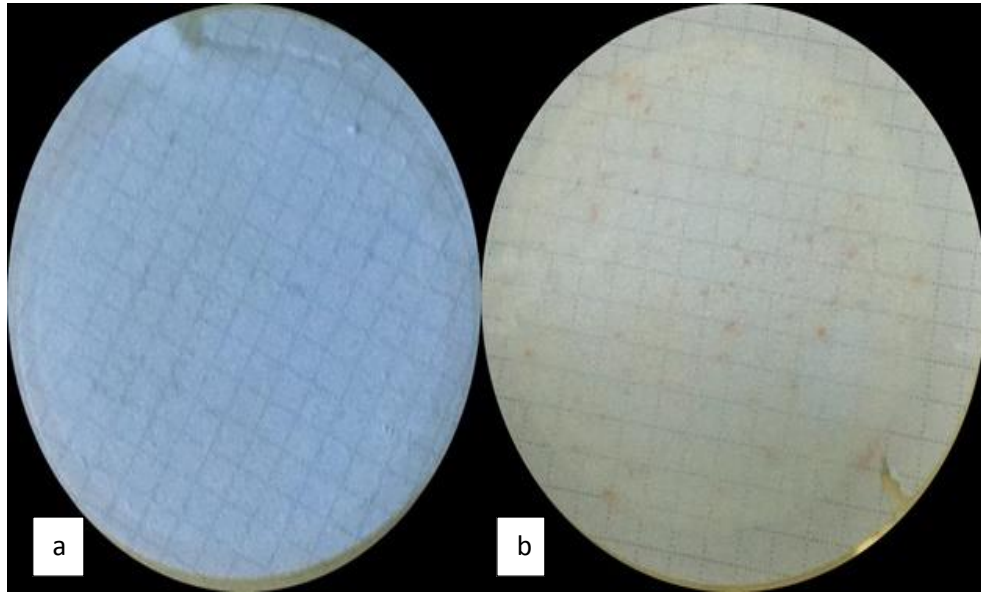
Şekil 4.3. Dökme ekim yöntemi + laktamator (*S.aureus* üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu

4.4. Membran Filtrasyon Ekim Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar

Membran filtrasyon ekim yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen verilerin ortalaması, çalışılan bakteriler ve çalışma gurupları Tablo 4.4.'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre test gurubunda üreme gözlenmemiş ve yöntem verimsiz kabul edilmiştir.

Tablo 4.4. Membran filtrasyon ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları

Çalışma Gurupları	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
test grubu	0	0	0	0	0
pepton grubu	43	63	57	20	19
inokulum grubu	48	65	61	21	22



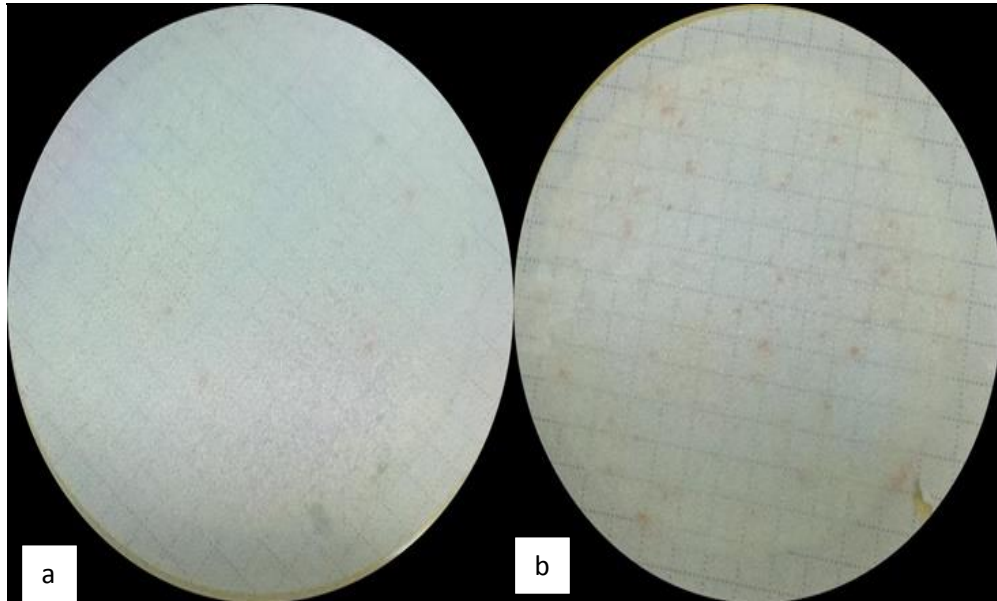
Şekil 4.4. Membran Filtrasyon ile ekim yöntemi(*S.aureus* üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu

4.5. Penaz Kullanılarak Gerçekleştirilen Membran Filtrasyon Ekim Yöntemi Sonuçları

Penaz kullanılarak yapılan membran filtrasyon işlemi sonucundaki veriler Tablo 4.5.'de verilmiştir. % verim *S.aureus*'da %3, *P. aeruginosa*'da %7, *B. subtilis*'de %4, *C. albicans*'da %7 ve *A. brasiliensis*'de %8 olarak belirlendi. Elde edilen verilere göre % verim değerleri %3- %8 arasında olduğu için yöntem verimsiz kabul edilmiştir.

Tablo 4.5. Penaz kullanarak yapılan membran filtrasyon ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları

Çalışma Grupları	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
test grubu	2	5	3	2	2
pepton grubu	49	63	58	24	20
inokulum grubu	51	64	62	26	23
% verim(cfu)	3	7	4	7	8



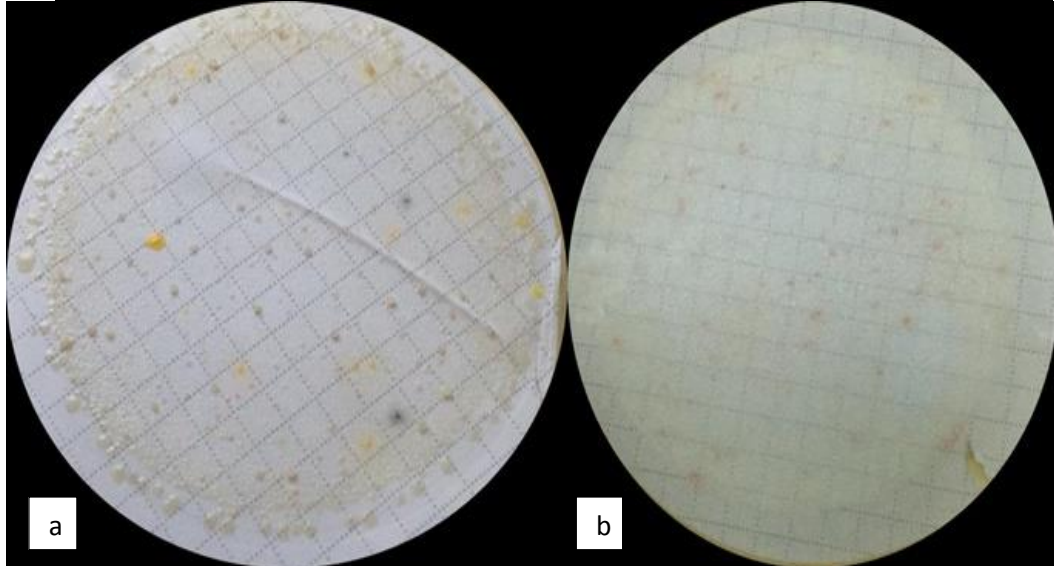
Şekil 4.5. Membran Filtrasyon ile ekim yöntemi + penaz (*S.aureus* üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu

4.6. Laktamator Kullanılarak Gerçekleştirilen Membran Filtrasyon Ekim Yöntemi Sonuçları

Laktamator kullanılarak yapılan membran filtrasyon ekim yöntemi testlerinden elde edilen verilerin ortalaması, çalışılan bakteriler ve çalışma grupları Tablo 4.6.'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre % verim değerleri %72- %92 arasında olduğu için yöntem verimli kabul edilmiştir. Bakterilerde daha yüksek verim elde edilmiştir.

Tablo 4.6. Laktamator kullanarak yapılan membran filtrasyon ekim yöntemi analizlerinin ortalamaları

Çalışma Grupları	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
test grubu	48	60	56	19	16
pepton grubu	50	62	60	23	21
inokulum grubu	52	65	63	25	22
% verim(cfu)	92	92	88	76	72



Şekil 4.6. Membran Filtrasyon ile ekim yöntemi + laktamator (*S.aureus* üzerinde) a)test grubu b)inokulum grubu

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotik içeren ürünlerin mikrobiyolojik kontaminasyonu günümüzde ilaç endüstrisinin karşılaştığı ciddi bir sorundur. Bu durumun, kirleticilerin tespitinde standardize edilmiş yöntemlerin kullanılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Üretim aşamasında personelin hijyene dikkat etmemesi, ekipmanın yetersiz temizliği, çevresel faktörler gibi nedenlerle ürünler kontamine olmuş olabilir. Bu nedenle ürünlerin kalite kontrollerinde kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. (Mackel ve ark., 1975; Maki ve Martin, 1975).

Çalışmamızda; sefpodoksim proksetil içeren antibiyotiklerin mikrobiyolojik analizlerinde kullanılan yöntemlerin nötralize edici ajan eklemeleri yapılarak en verimli yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada sefpodoksim proksetil içerikli 20 kutu antibiyotikle yöntem validasyonu yapılmıştır. Mikrobiyolojik ekim yöntemlerinden membran filtrasyon ekim yöntemi ve dökme ekim yöntemi kullanılarak % verim bakımından karşılaştırma yapılmıştır. Her bir yöntem için penaz veya laktamator kullanılmıştır. Nötralize edici ajanların sefpodoksim proksetilin üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Penaz ve laktamatorun antibiyotik üzerindeki inhibe edici etkisini test edebilmek için *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* suşları kullanılmıştır.

Pepton grubu antibiyotik eklenmeden yalnızca nötralize edici ajan (blank olarak) kullanılarak hazırlanmış ve test mikroorganizmaları üzerinde nötralize edici ajanların toksik etkilerinin olmadığı görülmüştür. Sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotikler ile yaptığımız çalışmada nötralize edici ajan kullanılmadan yapılan ekim yöntemlerinin ikisinde üreme gözlenmemiştir. Bu nedenle verim hesaplanamadığı için çalışmalar verimsiz kabul edilmiştir. Avrupa

Farmakopesi'nde antibiyotiklerin analiz yöntemlerinde mutlaka bir nötralize edici ajan kullanılması gerektiği açıkça yazmaktadır (EP. 2009). Buna rağmen çalışmanın bütünlüğü açısından bir kez daha test edilmiş ve Avrupa Farmakopesi ile aynı bilgilere ulaşılmıştır.

Laktamotor enzim bazlı bir üründür ve β -laktam türevi antibiyotiklerin etkisizleştirilmesi için kullanılır. Penaz konsantresi de β -laktam ve Penisilin türevli antibiyotiklerin inaktivasyonunda sıkça kullanılmaktadır (Drawz ve Bonomo, 2010).

Çalışmamızda nötralize edici ajan olarak penazın kullanıldığı dökme ekim yönteminden verim alınamazken, yine penaz kullanılarak yapılan membran filtrasyon yönteminde verimin %3-8 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Avrupa Farmakopesi'ne göre $< \%60$ olan sonuçlar verimli kabul edildiğinden bu yöntem verimsiz olarak değerlendirilmiştir. Bu durum penazın sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiğin etkisini inhibe etmede yeterli etki gösteremediğini düşündürmektedir. Nötralize edici ajan olarak laktamotorun kullanıldığı direk ekim yönteminden verim alınamamıştır.

Nötralize edici ajan olarak laktamotorun 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 hesaplanmıştır. Nötralize edici ajan olarak laktamotorun kullanıldığı membran filtrasyon ekim yönteminde test grubundaki koloni sayısı ile inokulum grubundaki koloni sayısının birbiriyle uyumlu olduğu gözlemlenmiş ve verim %92-72 aralığında hesaplanmıştır.

Sri Agung ve ark. (2018) β -laktamaz içeren laktamotorun, 3. Kuşak sefalosporinler üzerindeki inhibe edici etkisini incelemişler ve β -laktamaz nötralize edici ajanın enjektale 3. Kuşak sefalosporinlerin antibakteriyel aktivitesini yüksek oranda inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da laktamotorun sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiği inhibe ettiği görülmüştür.

Mshref ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada, laktamator enziminin sefpodoksim proksetilin aktif olan β -laktam halkasını hidroliz ederek antibakteriyel özelliğini inibe ettiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da sefpodoksim proksetil içeren antibiyotiğe karşı laktamatorun etkili olduğu görülmüştür. Mshref ve ark.(2017) çalışmalarının bizim çalışmamızla benzerlik gösterdiği gözlenmiştir.

Sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotiklerde membran filtrasyon ekim yönteminin dökme ekim yönteminden daha iyi sonuçlar ortaya koyduğu görülmüştür. Bu yöntemin nötralize edici ajanlardan laktamator ile tam uyum gösterdiği ve penazdan daha iyi sonuçlar verdiği de ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızla elde edilen bulguları aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz:

- a. Nötralize edici ajan kullanmadan yapılan çalışmaların tümünde üreme gözlenmemiştir.
- b. Ekim yöntemi olarak membran filtrasyon ekim yöntemi daha iyi sonuçlar vermiştir.
- c. Sefpodoksim proksetil içerikli antibiyotikler için spesifik nötralize edici ajan laktamatorudur.
- d. En iyi sonuçlar membran filtrasyon yöntemi ve laktamator kullanılarak yapılan çalışmada elde edilmiştir. Bu çalışmanın amacına uygun olan yöntemin de bu olduğu belirlenmiştir.
- e. Laktamator kullanılarak yapılan membran filtrasyon yöntemi sefpodoksim proksetil içeren antibiyotikler için mikrobiyolojik test yöntemi olarak kullanılabilir.

KAYNAKÇA

- Ağaçfıdan, A., Anđ, Ö., Bal, Ç., Bertigen, R., Boskaya, E., Búget, E., Küçúker, M., Yeęenođlu, Y., Tıbbi Mikrobiyoloji. Nobel Kitabevleri, İstanbul. 2005.
- Akın, A., İlaçların Mikrobiyolojik Standardizasyonu, 1981.
- Aktaş, Z., Satana, D., Kayaca, Ç., Can, B., Gönüllü, N., Küçükbasmacı, Ö., Pseudomonas aeruginosa suşlarında antibiyotik duyarlılık oranları ve beta laktam direnç mekanizmalarının tiplendirilmesi. Mikrobiyoloji Bül.46(3):386-397, 2012.
- Aktuyulu, Y., Pratikte Antibiyotik Kullanımı, Sempozyum Dizisi Yayın No: 1, S;11-53, 1997.
- AVMA (American Veterinary Medical Association), Veterinary Compounding, 2006.
- Baguley D., Lim E., Bevan A., Pallet A., Prescribing for children – taste and palatability affect adherence to antibiotics, Arch Dis Child:12, 2012.
- Bilgehan, H., Klinik mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 9. Baskı Barış Yayınları, İzmir, 1995.
- Bucak, Ö., Koçođlu, E., Taş, T., Tekin, D., Mengelođlu, F.Z., *Staphylococcus aureus* izolatlarında agar tarama ve mikrodilasyon yöntemleri ile vankomisin direncinin araştırılması, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 44(1):28-32, 2014.
- Çevik, M.A., Uygun Antibiyotik Seçiminde Farmakokinetik ve Farmakodinamik Parametrelerin Önemi, ANKEM Derg, 266-273, 2007.
- Chambers, F.H., 2001. Antimicrobial contaminated infusion products. IV. Growth of microbial pathogens in Agents. Ed: Goodman LS., Gilman A., Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics 10th edition, 1143-1169.
- Dony, J., Memoires de l'Academie Royale de Belgique, 131 (6-7-8), 323-335, 1976.

- Dony, J., Dufaux-Fauville, M., et Devleeschouwer, Microbiologie et Hygiene, Seminaires et Travaux Pratiques, Pul Presses Universitaires de Bruxelles, P: 28, 1978.
- Drawz, S.M., Bonomo, R.A., three decades of β -lactamase inhibitors, Clinical Microbiology Reviews, 23(1):160-201, 2010.
- FEDESA, Antibiotic Use in Farm Animals does not Threaten Human Health. Press release. Visby, Sweden, 2001.
- Gündođdu E, Bařınar Y., Köksal C., karasullu E. 2011. Evaluation of cefpodoxime proxetil complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the presence of a water soluble polymer: Characterization and permeability studies, FABAD J. Pharm. Sci., 36, 137-148.
- İçin, S.,2006 İyi İmalat Uygulaması, 2006.<http://www.bornova.vet.gov.tr/GMP.ppt>. Erişim Tarihi: 26 şubat 2017.
- IOM. Antibiotic resistance: İmplications for global health and novel intervention strategies. Washington DC:The National Academies Press, 2010.
- Mond,J., Comite des Laboratoires et Services Officiels de Controle des medicaments et de la Section des Pharmaciens de L'industrie, 88-96, 1972.
- Mond,J. Comite des Laboratoires et Services Officiels de Controle des medicaments et de la Section des Pharmaciens de L'industrie F.I.P 'Purete Microbiologique des Formes Pharmaceutiques Non Obligatoirement Steriles', 285-292, 1975.
- Kingsbury, D., Wagner, G., Mikrobiyoloji, Saray Kitabevi, İzmir, 1990.
- Kireççi, E., Ođuz, M.T., Aral, M., Kahramanmarař ilindeki içme kullanma ve çevresel suların mikrobiyolojik niteliđinin membran filtrasyon sistemiyle belirlenmesi.KSÜ Dođa Bilimleri Derg.,20(1) 20-24, 2017.
- Köksal, F., Samastı, M., İstanbul'da polikarbonat damacanalarda satılan içme sularının bakteriyolojik incelenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cem. Derg. 37(4):221-224, 2007.
- Korten V. Antibiyotiklerin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri, Solunum Sistemi Enfeksiyonları. Toraks Kitapları. S; 165-172, 2010.
- Kusuma, S.A.F., Yus Hargono C.Y., Hendro Winarno, Betalactamase Enzyme Role in Minimizing False-Positive Result of Cefotaxime Injection End-Product SterilitySri Agung Fitri Kusuma et al /J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 10(5), 2018.

- Liarrul, L.İ., Testero, S.A., Fisher, J.F., The Future of B-lactams. *Curr Opin in Microbiol* :13, 2010.
- Mackel, D.C., Maki, D.G., Anderson, R.L., Rhame, F.S., Bennet, J.V. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products: mechanisms of intrinsic contamination. *J Clin Microbiol* ; 2(6): 486-97, 1975.
- Maki, D.G., Martin, M.T. Nationwide epidemic of septicemia caused by fluids for intravenous infusion, 131:267-72, 1975.
- Martinko, J., mikroorganizmaların biyolojisi kitabı, S; 345-346-469-471-472.
- Mshref, M.F., Ghonemy, H.M., Ali, A.H., determination of beta-lactamase inactivation of cephalexin by validated RP-HPLC method. *World Journal of Applied Chemistry*-2:120-128,2017.
- Öztürk, Ş., Yıldız, S., Türkiye’de Üretilen Bazı Veteriner Enjektabl Vitamin Preparatlarının Mikrobiyolojik Kalite Kontrolleri, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 40(3):41-46, 2016.
- 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 Micr Infect Dis* 17: 143-150, 199
- Sarıçay, N.S., Türkiye’de ve İzmir’de İlaç Sanayi, Sektörel, Arge, 15-16, 2009.
- Sri Agung F.K., Hargono C.Y, Winarno H. 2018. Betalactamase Enzyme Role in Minimizing False-Positive Result of Cefotaxime Injection End-Product Sterility *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 10(5), 1036-1040
- Topal, M., Şenel, G., Topal, I., Öbek, E., 2015. Antibiyotikler ve Kullanım Alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31.
- Ulutan, F., Ampirik Antibiyotik Kullanımı ve Genel Prensipler. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* ,2004.
- url.1:<https://www.researchgate.net/figure/Staphylococcus-aureus-seen-undermicroscope-after-Grams->, Erişim Tarihi: 20 Haziran 2017.
- url.2:<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-positive/bacillus-subtilis.html>, Erişim Tarihi: 20 Haziran 2017.
- url.3:<http://meapunya.blogspot.com/2012/11/makhluk-kecil-yang-dahsyat-we-called-it.html>, Erişim Tarihi: 20 Haziran 2017.
- url.4: <http://www.jinekolog.ws/vajinal-mantar.asp>, Erişim Tarihi: 20 Haziran 2017.

url.5:<http://traffic-club.info/2018/image-labelled-aspergillus-niger-under-microscope.awp>,Erişim Tarihi: 20 Haziran 2017.

url.6: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cephalosporin>,Erişim Tarihi: 10 Kasım 2018.

url.7: http://chemistry.berea.edu/~biochemistry/2013/uo_at/, 11 Aralık 2018.

url.8: <https://www.pnas.org/content/98/19/10886>,18 Aralık 2018.

Gökçe, T., 2012. Birinci basamak sağlık kuruluşuna başvuran hastaların antibiyotik kullanımını konusundaki davranış ve bilgi düzeylerinin araştırılması.

Varga, J., Frizsvad, J.C., Kocsube, S., Brankovics, B., Toth, B., Samson, R.A. New and Revisited species in aspergillus section nigri, studies in mycology, 69:1-17, 2011.

Veteriner İspençiyarı ve Tıbbi Müstahzarlar Ruhsat Yönetmeliđi Yetki Kanunu.(2002) Veteriner İlaçların Kontrolü ve İlgili Mevzuat Taşra teşkilatı için Hizmet İçi Eğitim Programı gazete 23.10.2002/ 24915,2002.

WHO(World Health Organization),2002. Steril Pharmaceutical Pruducts. Basic Principles of GMP. Annex 6. TRS 902. Revised: 2006

Yıldız, İ., Varkal M., Ünüvar E., Günümüzde Sefalosporinler ve Antibiyotik Direnci. Çocuk Dergisi sayı-14. 2014

EP.(2009) Biological Test Sterilty, European Pharmacopea Supplement Chapler 2.6.1 p. 46

ÖZGEÇMİŞ

Şenay GÜLŞEN VAROL, 26.08.1990'da Sakarya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2008 yılında Mithatpaşa Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2014 yılında bitirdi. 2019 yılında Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ndeki yüksek lisans eğitimini bitirdi. Bir çocuk annesi, sigara ve alkol kullanmaz, Yeşilay destekçisidir.