



كلية الصيدلة – جامعة دمشق

قسم الكيمياء الصيدلانية والمراقبة الدوائية

المراقبة الدوائية

الجزء النظري

المحاضرة الرابعة

المراقبة الميكروبيولوجية

للمستحضرات الصيدلانية



د. باسمه عروس

Microbiological Quality Control of Pharmaceutical Preparations

- ☐ العضويات الدقيقة في كل مكان.
- ☐ الانجازات العلمية.
- ☐ المحاليل الحقنية وأخطار التلوث.
- ☐ حوادث مختلفة في العالم.
- ☐ التوصيات المختلفة GMP و IPC.
- ☐ هيئة التفتيش الصيدلاني PIC.

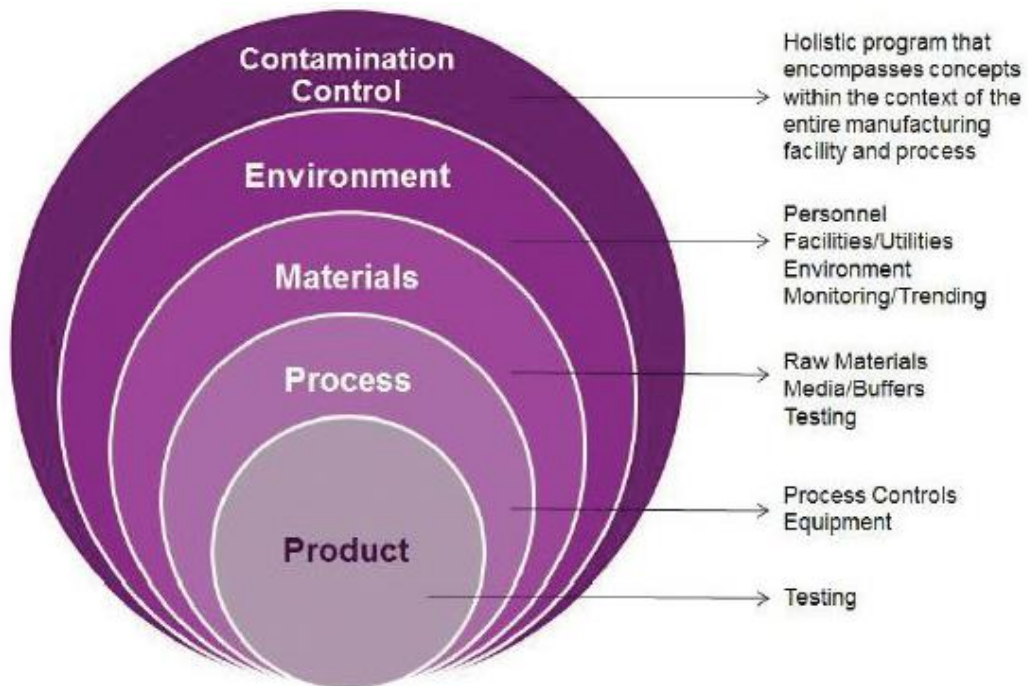
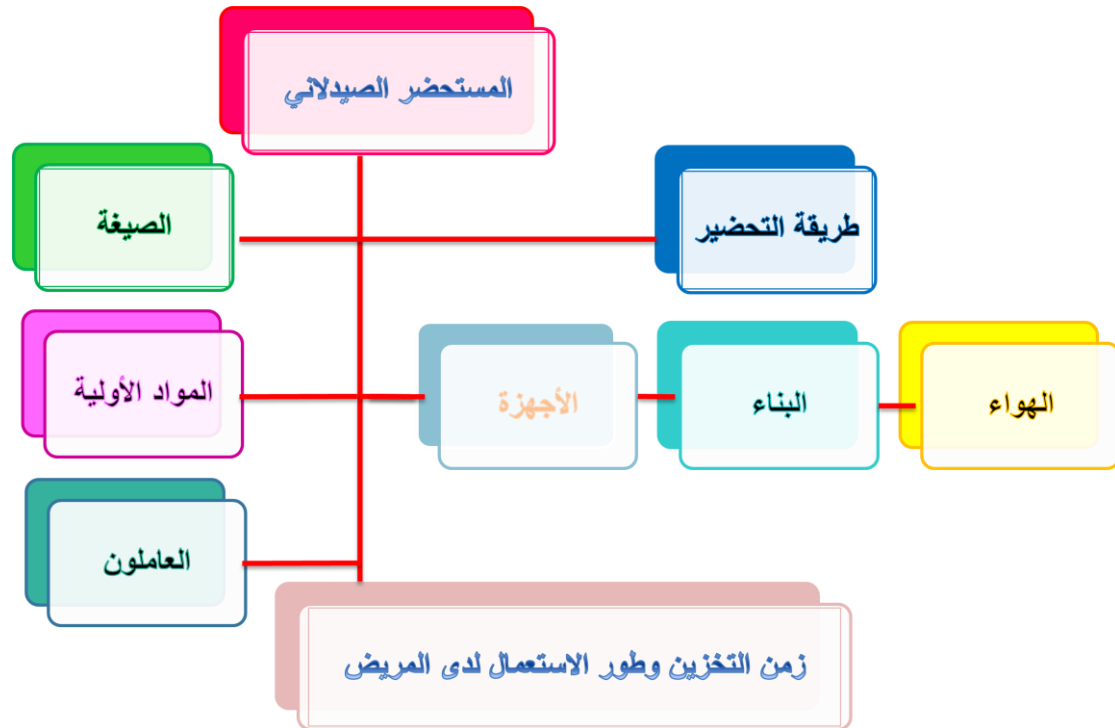
تلوث المستحضرات الصيدلانية بالمكروبات

1- المخاطر الناجمة عن تلوث الأشكال الصيدلانية ميكروبيولوجياً



- على المريض: انتانات مختلفة، حالات تحسسية.
- على المستحضر الصيدلاني:
 - تخرب كيميائي.
 - تغير pH.
 - تخرب فيزيائي.
 - * تغيير اللون.
 - * تغيير الطعم.
 - * تغيير الرائحة.
 - * تخريب قوام المستحضر الصيدلاني.
- * تثبيط فعالية العوامل الفعالة على السطح ومن ثم تخرب المستحلبات.
- على الشركة: الإساءة إلى السمعة، فقدان الثقة وبالتالي الخسائر فادحة.

2- الأسباب الكامنة وراء تلوث المستحضرات الصيدلانية بالمكروبات



الاختبارات الميكروبيولوجية للمستحضرات الصيدلانية

Microbiological Tests for Pharmaceutical preparations

- عدم توحيد الاتفاقيات بشأن العدد الميكروبيولوجي.
- تحديد الحدود بحسب طبيعة المستحضر الصيدلاني أو المواد الفعالة وغير الفعالة وبحسب مكان تطبيقه والأخطار المتوقعة من استخدامه ملوثاً.
- أعلى حد من النقاوة الميكروبيولوجية هو العقامة Sterility.
- الحدود المسموح بها في المستحضرات الصيدلانية غير المطلوب أن تكون عقيمة والمواد الأولية الداخلة في تركيبها فهي تشمل:

Total Aerobic Microbial Count (TAMC)

و Total Combined Molds and Yeast Count (TCMY)

- إضافة إلى خلوها من نوع أو أكثر من الجراثيم التالية:
 - الإشيريكيات القولونية *Escherichia coli*
 - العنقوديات الذهبية *Staphylococcus Aureus*
 - أنواع السلمونيلا *Salmonella Species*
 - الزوائف الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa*
- التعداد العام للمكروبات الهوائية أو للخمائر والعفونات:
هو عدد المستعمرات Colonies النامية على المستنبتات Culture Media الصلبة في الغرام أو الميليتر من المادة أو المستحضر الصيدلاني.
- **عدم ظهور أي مستعمرة في اختبار التعداد العام لا يعني أن المستحضر الصيدلاني عقيم لاختلاف طريقة الزرع.**
- تعتمد الاختبارات الميكروبيولوجية بشكل عام على الزرع باستخدام مستنبتات خاصة، ثم يجري الكشف عن تلوث المستحضرات الصيدلانية وعد المستعمرات بالعين المجردة أو بوسائل بسيطة.
- يترافق التلوث الميكروبيولوجي غالباً مع تغير في pH أو لون أو قوام المستحضر الصيدلاني، أو إنتاج روائح ناتجة عن الغازات التي تنتجها المكروبات المسببة للتلوث.

يصنف دستور الأدوية البريطاني المعايير المطلوبة للنقاوة الميكروبيولوجية في المستحضرات الصيدلانية على النحو التالي:

□ الفئة الأولى Category 1

وتشمل المستحضرات التي تتطلب العقامة Sterility

□ الفئة الثانية Category 2

وتشمل المستحضرات المعدة للاستخدام الموضعي وللجهاز التنفسي عدا المستحضرات المطلوب منها أن تكون عقيمة, وكذلك اللصقات الجلدية. والحدود المسموحة هي:

- العدد الإجمالي من المكروبات الهوائية: ليس أكثر من 10^2 مكروبات (جراثيم هوائية وفطريات) لكل غرام أو ميليلتر من المستحضر الصيدلاني أو في لصاقة واحدة.
- اللصقات الجلدية: الخلو من الإمعائيات Enterobacteriaceae وبعض الجراثيم سلبية الغرام في اللصاقة الواحدة.
- المستحضرات الأخرى: ليس أكثر من 10^1 إمعائيات وبعض الجراثيم سلبية الغرام في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- الخلو من الزوائف الزنجارية في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني أو لصاقة.
- الخلو من العنقوديات الذهبية في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني أو لصاقة.

□ الفئة الثالثة Category 3

وتشمل مستحضرات الإعطاء الفموي Oral والمستقيمي Rectal والحدود المسموحة هي:

- العدد الإجمالي من المكروبات الهوائية: ليس أكثر من 10^3 جراثيم وليس أكثر من 10^2 فطريات في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني مع الخلو من الإيشيريكيات القولونية Escherichia Coli
- مستحضرات الإعطاء الفموي الحاوية على مواد أولية من مصادر طبيعية (حيواني، نباتي، معدني): العدد الإجمالي من المكروبات الهوائية 10^4 جراثيم و 10^2 فطريات في غرام واحد أو ميليلتر واحد، وليس أكثر من 10^2 إمعائيات وبعض الجراثيم سلبية الغرام.
- الخلو من أنواع السلمونيلا في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- الخلو من الإيشيريكيات القولونية في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- الخلو من العنقوديات الذهبية في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.

□ الفئة الرابعة Category 4

وتشمل المستحضرات العقاقيرية العشبية:

أ- المستحضرات العشبية التي تتطلب إضافة الماء المغلي قبل استخدامها:

- العدد الإجمالي من المكروبات الهوائية: ليس أكثر من 10^7 جراثيم و 10^5 فطريات في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- ليس أكثر من 10^2 إيشيريكيات قولونية في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.

ب- المستحضرات العشبية التي لا تتطلب إضافة الماء المغلي قبل استخدامها:

- العدد الإجمالي من المكروبات الهوائية: ليس أكثر من 10^5 جراثيم و 10^4 فطريات في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- ليس أكثر من 10^3 إمعائيات وبعض الجراثيم سلبية الغرام في غرام واحد أو ميليلتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- الخلو من الإيشيريكيات القولونية .
- الخلو من أنواع السلمونيلا .

اختبار العقامة Sterility Test

- اقتطاع العينات واقتصاديات التحليل
- الأخذ بالحسبان كيفية تحضير الوجبة، وكيفية تعقيمها.
- فحص الأشكال السائلة: زرع مباشر.
- فحص الأشكال الصلبة: إذابة أو تعليق بسائل عقيم مناسب ثم الزرع.
- فحص الأشكال نصف الصلبة: تعليق أو استخلاص بمذيب مناسب ثم الزرع.
- طرائق اختبار العقامة للمستحضرات الصيدلانية:
- طريقة الزرع المباشر.
- طريقة الترشيح الغشائي.

□ طريقة الزرع المباشر Direct Transfer Method:

يلجأ إلى طريقة الزرع المباشر عندما يكون عدد العينات قليلاً، أو حجم العبوة أو الحاوية صغيراً.

يجرى بزرع 1 مل من المحلول المراد اختبار عقامته على كل من:

1- وسط ثيوغليكولات السائل Fluid Thioglycollate ويستخدم شروط الحضانة الهوائي بدرجة حرارة $(32.5 \pm 2.5)^\circ\text{C}$.

2- وسط ثيوغليكولات البديل Alternative Thioglycollate ويستخدم شروط الحضانة اللاهوائية بدرجة الحرارة والمدة نفسها في مستنبت ثيوغليكولات السائل،

والذي له تركيب مستنبت ثيوغليكولات السائل نفسه باستثناء الأغار ومادة Resazurin Sodium.

3- وسط Soyabean- Casein Digest بدرجة حرارة $(22.5 \pm 2.5)^\circ\text{C}$ لكشف الفطريات والجراثيم الهوائية، بحيث تكون فترة الحضانة لجميع المستنبتات 14 يوم.

□ طريقة الترشيح الغشائي Membrane Filtration Method:

تستخدم فيها مرشح غشائية مكونة من نترات أو أسيتات السللوز بمسامات (0.2-0.4) ميكرون. ويلجأ إلى هذه الطريقة عندما يكون عدد العينات أكثر من 20 عينة، أو حجم العبوة أو الحاوية أكبر من 10 مل.

- ترشح العينة على مرشحة عقيمة.
- تقسم المرشحة إلى قسمين ويزرع كل قسم على أحد المستنبتات.
- بعد فترة الحضانة يجب أن تبقى هذه المستنبتات خالية من أي عكر أو تلوث، وهذا دليل على أن المستحضر المختبر عقيم.
- لاختبار عقامة المستحضرات الحيوية (لقاحات، مصول) تستخدم لها مستنبتات خاصة أو إضافية أثناء العمل.
- يجب عند إجراء اختبار العقامة التأكد من أن المستحضر نفسه لا يملك أي قدرة خاصة لصد الميكروبات، وذلك تجنباً للتقدير الخاطئ للنتائج. يجري ذلك باستخدام تقانات معينة من شواهد جرثومية وفطرية، أو بتعطيل القدرة الصادة للمستحضر (إضافة خميرة البنسيليناز إلى مستحضرات البنسيلين)، أو بالتمديد.
- يجب التأكد من فعالية المستنبتات المستخدمة وذلك من خلال إجراء اختبارات الملاءمة Suitability Tests وهي:

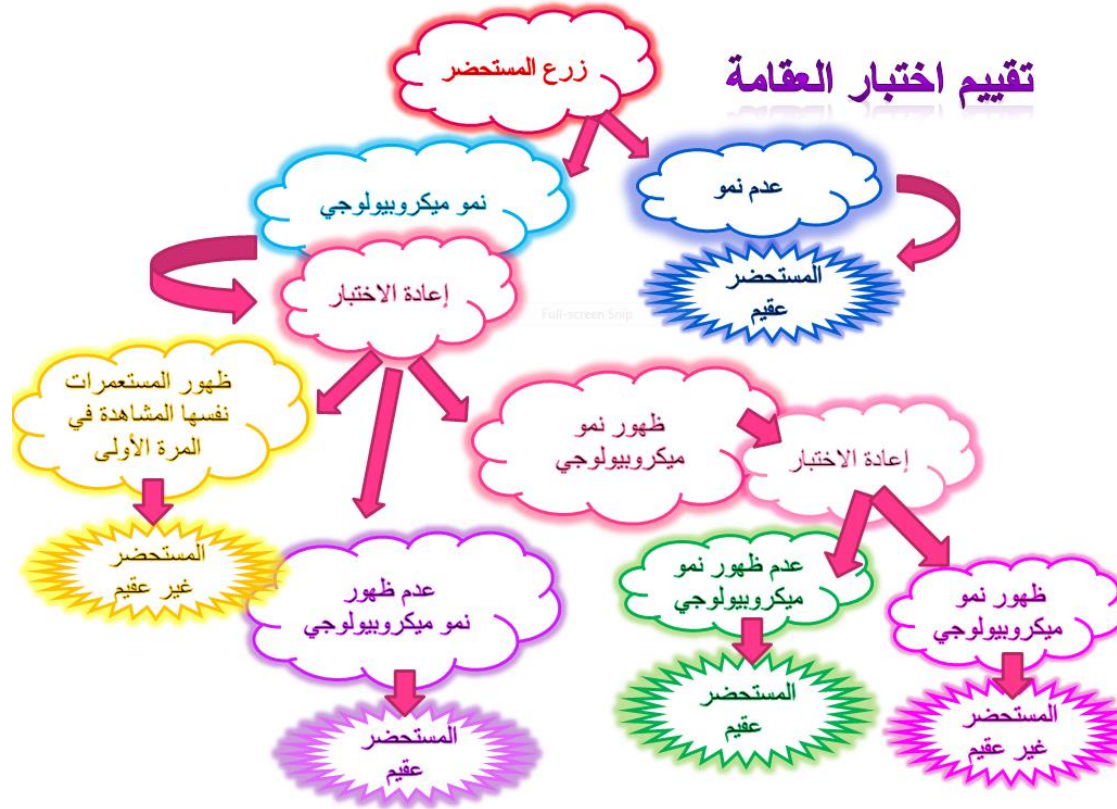
○ **عقامة المستنبتات:** يجري التأكد من عقامة كل وجبة أو تحضير معقمة من المستنبتات، وذلك بحضن جزء من هذه التحضير بدرجة الحرارة المحددة مدة 14 يوم، أو بحضن عبوات أو حاويات دون مستحضر على شكل شواهد سلبية أثناء إجراء اختبار العقامة للعينات المفحوصة.

○ **تحفيز النمو:** يجري على كل وجبة أو تحضير من المستنبت الجاهز، وذلك بتطعيم عدة عبوات من المستنبت بشكل منفصل بنوع من أنواع الميكروبات التالية:

Staphylococcus Aureus	Aerobic Bacteria
Bacillus Subtilis	(البكتريا الهوائية)
Pseudomonas Aeruginosa	
Clostridium Sporogenes	Anaerobic Bacteria
	(البكتريا اللاهوائية)
Candida Albicans	Fungi
Aspergillus Niger	(الفطريات)

- يكون الاختبار مقبولاً إذا لم تبد أي عبوة من العبوات المطعمة نمواً خلال 5 أيام.
- يجب التقيد بدرجة الحرارة المثالية لنمو مجموعتي المكروبات، كما يجب التقيد التام بعدد أيام الحضان لإعطاء نتيجة دقيقة. أما عند التعقيم بالأشعة فإن الحضان يستمر مدة أكثر من 14 يوماً نظراً لاحتمال وجود بعض المكروبات التي يمكن أن تكون أصيبت بالأشعة ولكنها لم تقتل نهائياً، حيث تعود لفعاليتها عندما تجد الوسط المناسب لنموها.
- يجب الانتباه أثناء عملية الزرع إلى عدة نقاط:
- إذا كان المستحضر يحوي مواد حافظة يجب غسل المرشحة بعد ترشيح المستحضر بالماء المقطر العقيم قبل وضعها على المستنبت.
 - يجب تحضير شواهد معيارية للمستنبتات وهي:
 - شاهد من كل مستنبت يترك مفتوحاً.
 - شاهد من كل مستنبت يترك مغلقاً.
 - شاهد من كل مستنبت يجري فيه زرع الماء المقطر العقيم.
 - يجب أن يجري العمل في بيئة عقيمة.

تقييم اختبار العقامة

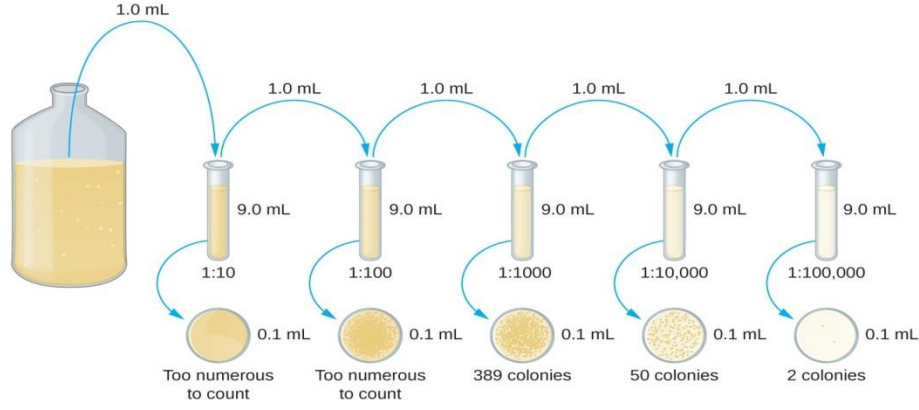


اختبار العقامة للمضادات الحيوية Sterility Testing of Antibiotics

- يجرى هذا الاختبار على المضادات الحيوية المعدة للإعطاء حقناً التي يحتمل تلوثها ميكروبولوجياً.
- تستخدم في هذا الاختبار المستنبتات المستعملة لاختبار العقامة وشروط درجة الحرارة.
- تستعمل الذراري من المكروبات المرجعية.
- تحضن بشروط هوائية ولا هوائية.
- تذاب المادة المطلوب اختبارها بالماء العقيم أو بمحلول الببتون العقيم Sterile Peptone.
- ترشح عبر مرشحة غشائية.
- يجرى الغسل بمحلول الببتون المضاف له مادة معطلة لفعالية المضاد الحيوي (كإضافة البنسيلين إلى البنسيلين والسيفالوسبورين).
- تقسم المرشحة إلى قسمين متساويين يوضع أحدهما في وسط ثيوغليكولات سائل، والآخر في وسط كازئين-صويا.
- تحضن المستنبتات بدرجة الحرارة الموصوفة (تيوغليكولات 30-32 °C وكازئين صويا 22-25 °C) لمدة 7 أيام.
- إذا لم يلاحظ أي نمو ميكروبولوجي في المستنبتات المختبرة تعد المادة مطابقة، أما إذا لوحظ فيعاد الاختبار.

اختبار الحد الميكروبي Microbial Limit Test

- تذاب أو تُمزج المستحضرات مع دارة فوسفاتية $pH = 7$ أو تُمدد بالماء المقطر العقيم، أو بسائل الببتون العقيم.
- آليات الزرع:
 - تقانة الصب بالأطباق Pour Plate Technique
 - تقانة الفرش على السطح Spread Plate Technique
 - تقانة الترشيح Filtration Technique
 - تقانة العدد الأكثر احتمالاً Most Probable Number Technique



- تستخدم طريقة الزرع المباشر عندما لا يتوقع أن يكون عدد المستعمرات كبيراً (أكثر من 300 مستعمرة).
- حيث يمزج حجم محدد من المستحضر المراد اختباره مع حجم مناسب من المستنبت المصهور المبرد لدرجة حرارة 45°C في حال الجراثيم، ويصب في علبه بتري ثم يحضن.
- يفرش حجم محدد من المستحضر المراد مباشرة على السطح الصلب في حال الفطريات والخمائر، ثم يحضن.
- المستنبتان المستخدمان هما:
 - وسط تريبتون صويا آغار Trypton Soya Agar لكشف الجراثيم، يحضن 48-72 ساعة بدرجة حرارة $30-35^{\circ}\text{C}$.
 - وسط سابورو ديكستروز آغار Sabouraud Dextrose Agar لكشف وعد الفطريات، يحضن 5-7 أيام بدرجة حرارة $20-25^{\circ}\text{C}$.
- عند الحصول على تعداد عالٍ من المستعمرات بشكل يمنع تحديد العدد بدقة يلجأ للتمديد.
- يجب إجراء شواهد معيارية من المستنبتات الزرعية.
- يجب التأكد عند إجراء اختبار الحد الميكروبي أن المادة المختبرة لا تملك قدرة صادة للنمو الميكروبيولوجي، لذلك لا بد من استعمال شواهد جرثومية وفطرية. وإجراء إزالة القدرة الصادة إما بالتعطيل أو التمديد.
- يجرى حساب العدد الميكروبي بتطبيق القانون:

$$\frac{Y}{x.n}$$

حيث:
 Y : مجموع عدد المستعمرات في كل علبه من علب البتري
 x : نسبة التمديد
 n : عدد علب البتري

- يستخدم للعد جهاز خاص موصول بمكبسة عينية يمكن من خلالها تحديد عدد المستعمرات في كل ملم²



اختبارات غياب بعض المكروبات النوعية

Tests for Absence Specified Microorganisms

- **تطبق اختبارات غياب بعض المكروبات الممرضة تبعاً لنوع المستحضر الصيدلاني:**
 - المستحضرات ذات المنشأ الحيواني أو النباتي يتحرى فيها عن أنواع السلمونيلا.
 - المحاليل والمستعلقات القموية يتحرى فيها عن الإشريكيات القولونية.
 - المستحضرات الموضعية يتحرى عن وجود العقنوديات الذهبية أو الزوائف الزنجارية.
 - المستحضرات الصيدلانية المعدة للاستعمال الشرجي أو المهلي يتحرى فيها عن وجود الخمائر والفطريات .
- إجراء عمليات التكاثر في أوساط خاصة.
- وضع بعض المواد لمنع النمو المتطفل.
- يجري تحضير الجراثيم على أوساط سائلة عادية مغذية Enrichment Liquid Culture Medium
- يجري الحقن بالواخر الحلقي على أوساط انتقائية صلبة.
- إجراء عمليات تطعيم أوساط مختلفة لزيادة التكاثر للجراثيم النوعية المراد فحصها.
- إضافة الوقاءات إلى الأوساط للجم الحموضة الناشئة من العمليات الاستقلابية للساكن على نحو خاص التي تضاف إلى الأوساط.
- إضافة المشعرات المختلفة التي تتغير ألوانها في الوسط نتيجة تغير الـ pH.

❖ الإيمعائيات Enterobacteriaceae

وتضم:

- أنواع السلمونيلا (ومنها: العصيات التيفية Typhi, نظيرة التيفية Paratyphi، الشيغللات Shigella، المتقلبات Proteus، الكلبسيلا Klebsiella).
- الإشيريكيات القولونية.
- يجري اختبار وجودها بعملية تطعيم المستنبتات حيث يجري:
 - التكاثر على وسط المرق المغذي Broth Medium.
 - النقل إلى مستنبت انتقائي يحوي مثلاً آغار، غلوكوز، لاكتوز، البنفسجية المبلورة، أملاح الصفراء، الأخضر اللماع، التي يفيد وجودها في تثبيط نمو الجراثيم الإيجابية الغرام المرافقة.
 - أو النقل إلى مستنبتات انتقائية سائلة لإغناء الجراثيم، وهي عبارة عن سائل مدروء من الغلوكوز. يفيد وجود الدارئة في تجنب انخفاض pH الناتج عن استقلاب الغلوكوز.

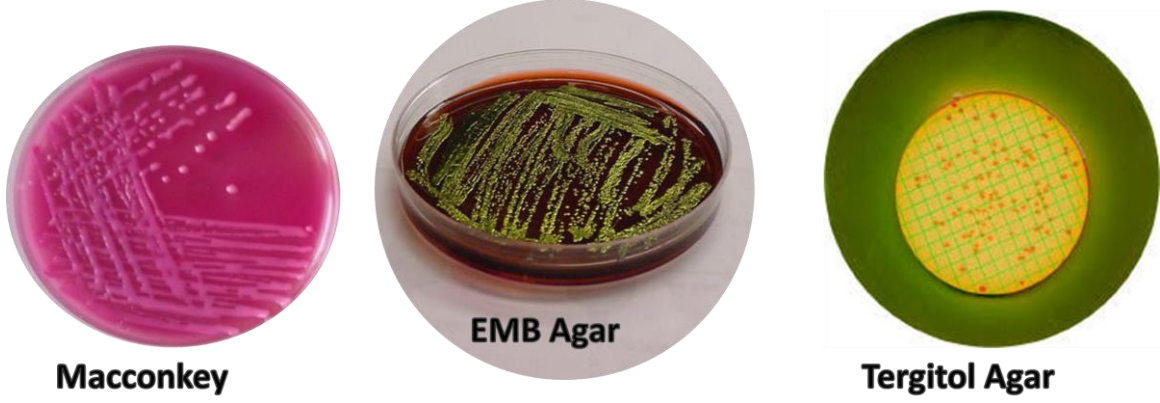


E. Coly

لكشف الإشيريكيات القولونية:

- يجري التكاثر على مستنبت لاكتوز مع مرق اللحم.
- يجري تكثير إضافي على وسط سائل (ماكونكي مع مرق اللحم).
- يجري الزرع على مستنبت ماكونكي.
- ظهور مستعمرات حمراء قرمزية غير مخاطية Won-Mucoid أو تلون زهري هو دليل إيجابي.

- يحدث التلون من جراء الاستقلاب الخمائري لسكر اللاكتوز متحولاً إلى حمض وهذا يؤدي إلى تحول في قيمة pH، مما يؤدي لانقلاب لون المؤشر من الأحمر المعتدل إلى الأحمر.
- هناك مستنبتات معروفة في دساتير الأدوية مثل مستنبت EMB Agar ومستنبت Tergitol Agar.



لنفني وجود أنواع السلمونيلا:

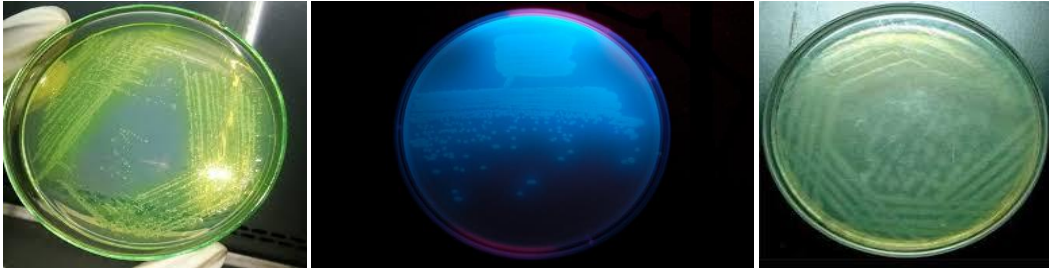
- تؤخذ كمية من المادة أو المستحضر.
- تترك للإغناء في مستنبت سائل مدروء من الغلوكوز أو من اللاكتوز مع مرق اللحم Broth.
- يضاف إلى وسط سيلينيت سائل Fluid Selenite مع اللاكتوز، ومستنبت Tetrathionate سائل مع أملاح الصفراء والأخضر اللماع.
- تؤخذ لقيحة Inoculum وتفرش على السطح أو تحقن ضمن مستنبت آغار، سيترات، ديزوكسي كوليات مع مستنبت آغار، سكروز، لاكتوز، أحمر الفنول، والاختضر اللماع (مستنبت XLD).
- عندما لا يتأكد بالزرع من وجود أنواع السلمونيلا، فإن ذلك لا ينفي وجودها قطعاً، بل يلجأ إلى طرائق حيوية مصلية.
- يفحص وجود أنواع السلمونيلا عادة عند استخدام مواد مساعدة من أصل حيواني.



❖ الزوائف الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa*

تؤدي هذه العصيات دوراً مهماً في إصابات العين والجلد والحروق، كما أنها تسبب التهابات معوية حادة عند الرضع. اكتشفت لأول مرة في بعض إنتانات الأذن الوسطى، ولونها آت من الصباغ الأزرق الذي تنتجه.

- يطلب كشف وجودها في حال الأشكال المطبقة موضعياً.
- يجري تكثير الزوائف الزنجارية على مستنبت تريبتون صويا سائل.
- تكشف على وسط آغار مع الستريميد Cetrimide Agar 0.3% الذي له تأثير انتقائي جيد، حيث يقضي على أغلب أنواع الجراثيم التي يمكن أن تخفي ظهور الزوائف.
- يمكن إضافة حمض النالديكسيك Nalidixic Acid مع الستريميد بتركيز 0.1% للستريميد. حيث أن الكليبيسلات والمتقلبات من الإمعائيات تقاوم الستريميد ما يتطلب مشاركة.
- للزوائف الزنجارية رائحة كريهة، ولون أخضر في مستنبت الستريميد، ويصبح لونها أزرق عند تألقها بأشعة UV.
- تعرف مستعمرات الزوائف من تلونها بالأزرق الشديد بإضافة كاشف فينيلين دي أمين دي كلوريد.



❖ العنقوديات الذهبية *Staphylococcus Aureus*

- قد تكون الإصابة بهذه المكورات خطيرة جداً وخاصة إذا كانت من النوع المقاوم.
- يطلب كشف وجودها في حال الأشكال المطبقة موضعياً.
 - يجري تكثير العنقوديات الذهبية على مستنبت تريبتون صويا سائل.
 - ثم يجري الزرع على مستنبت: آغار، ملح الطعام، مانيتول.
 - يكون الكشف إيجابي عند ظهور مستعمرات إيجابية الغرام وحول محيطها لون أحمر مؤشر أحمر الفنول، الذي يتحول من الأحمر إلى الأصفر،
 - ملح الطعام له دور انتقائي لنمو العنقوديات لأنها من الجراثيم المحبة للملوحة، تتحمل تراكيز عالية منه 75%.
 - سبب اختلاف لون المؤشر هو تخمير المانيتول الذي تقوم به العنقوديات الممرضة، الذي يؤدي إلى انخفاض قيمة pH الوسط ومن ثم تغير اللون.
 - يمكن استخدام مستنبت Vogel Johnson أو مستنبت Baird-Parker Agar اللذين يحويان مادة Potassium Tellurites التي يجري إرجاعها بواسطة العنقوديات

المرضة، وهذا يؤدي لتشكل راسب اسود، وبالتالي تظهر المستعمرات بلون اسود ويتحول لون المستنبت إلى الأصفر، كما أن لهذه المادة دوراً في تثبيط المكروبات المرافقة.



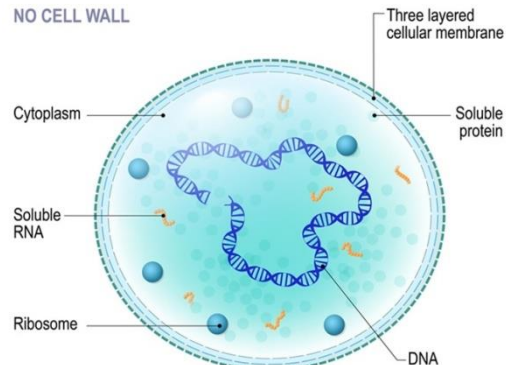
❖ المفطورات (الميكوبلازما) Mycoplasma

وهي أصغر المكروبات، هي أحياء دقيقة وسطى بين الجراثيم والفيروسات، ويمكن اعتبارها جراثيم لأنها لا تملك جدار خلوي وترشح من مرشحة شامبرلاين، ولها القدرة على الحياة ضمن شروط مناسبة في المستحضرات الحيوية مثل اللقاحات الفيروسية المحضرة من النسيج الحيوانية أو المستنبتات الخلوية، النوع الوحيد الممرض للإنسان هو الميكوبلازما الرئوية المسببة لمرض ذات الرئة البدئية.

- يستخدم لاختبارها مستنبت خاص مكون من رئة جنين الدجاج، أو مستنبت غني بالمصل يحوي على بنسيلين صودي لمنع نمو الجراثيم المرافقة، فالميكوبلازما ممنعة على البنسيلين.
- يستمر الحضان 15 يوم مع وضع 50% من المستنبتات في شروط حضان لاهوائية، و50% في شروط حضان هوائية بدرجة حرارة 35-37 °C لأن بعضها هوائية مجبرة وبعضها الآخر لاهوائية مجبرة أو مخيرة.
- إثبات وجودها الفعلي يجري مجهرياً.



Mycoplasma



المقاييسات البيولوجية واختبارات الفعالية

Biological Assays & Potency Tests

1- المقاييسات الميكروبيولوجية للمضادات الحيوية Antibiotics Microbial Assay

يعبر عن فاعلية Potency المضاد الحيوي على شكل نسبة بين التركيز المثبط لنمو ميكروبات حساسة لهذا المضاد الحيوي، وبين التركيز نفسه من المادة المرجعية. تتطلب أغلب دساتير الأدوية مقاييسات ميكروبيولوجية للمضادات الحيوية، حيث تقدر فاعلية المضاد الحيوي تجاه نوع محدد من الميكروبات في الزجاج على شكل مقاييسات بإحدى طريقتين:

- طريقة الانتشار Diffusion Method
- طريقة مقياس العكر Turbidimetric Method

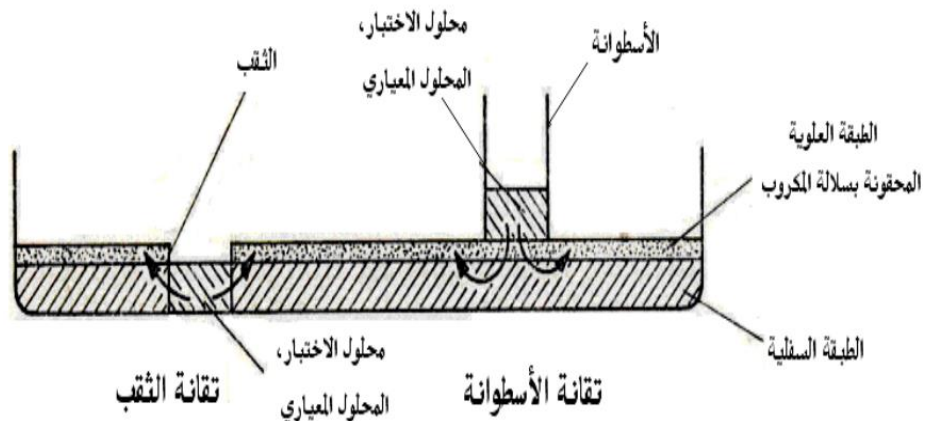
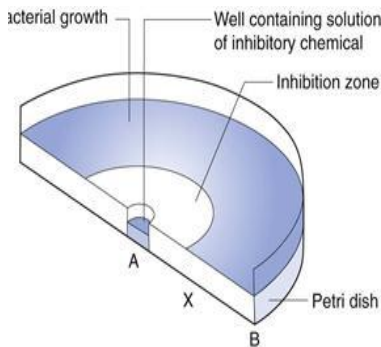
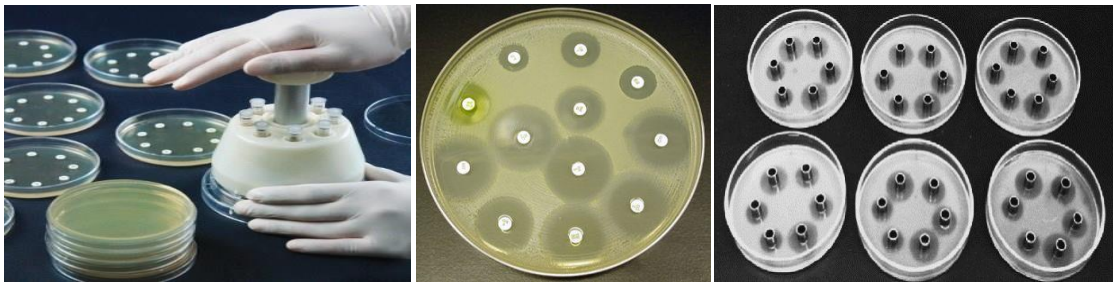
□ طريقة الانتشار Diffusion Method

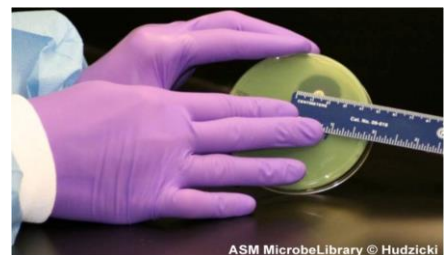
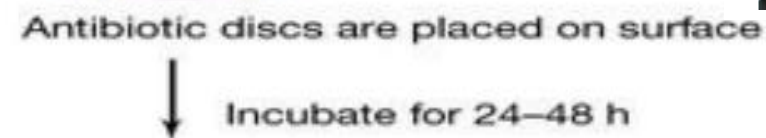
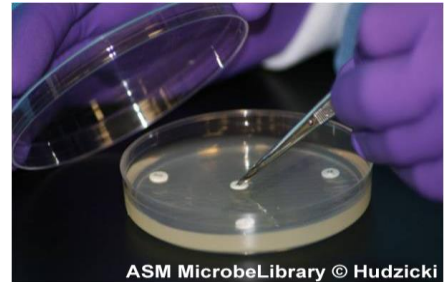
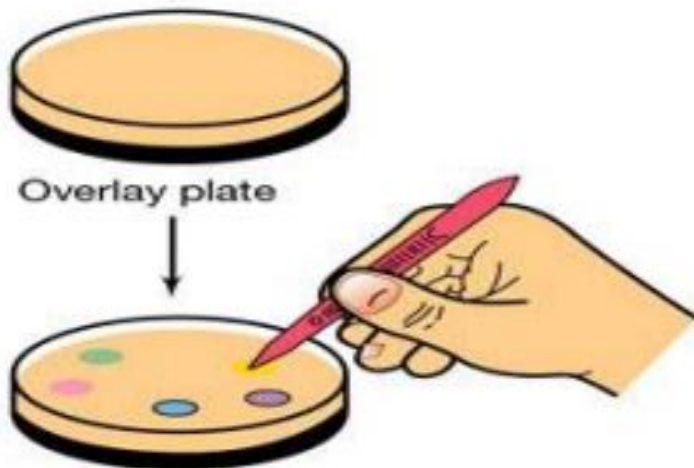
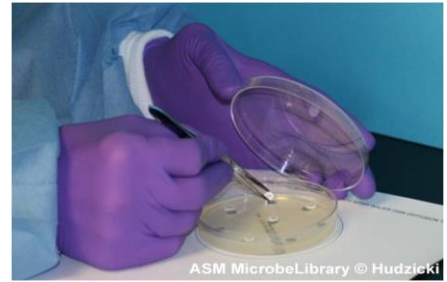
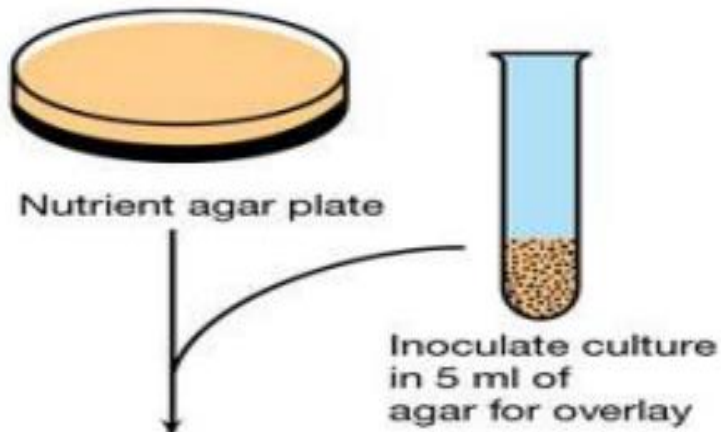
- تعني منع نمو الميكروبات ضمن مستنبت مغذ صلب على مستوى انتشار المضاد الحيوي.
- يجري اختيار شروط الاختبار بحيث تنشأ علاقة شبه خطية بين قطر بقعة الصد مع لوغاريتم التركيز الأصغري للمضاد الحيوي، ومن ثم فإن قطر بقعة الصد يعبر عن مدى فاعلية المضاد الحيوي.
- تقانات المقاييسات: تستخدم فيها مستنبتات مختلفة الملقحة بليقحة من ذرية جراثيم أو فطريات معيارية مناسبة.

- تقانة الثقب Cavity Technique

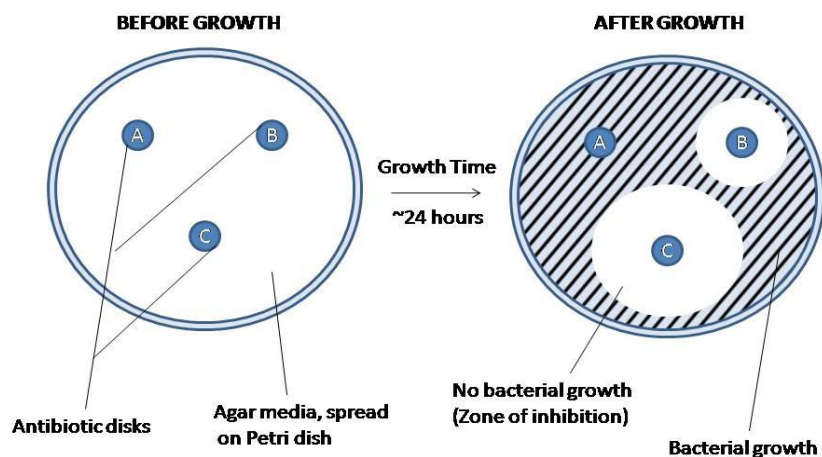
- تقانة الأسطوانة Cylinder Technique

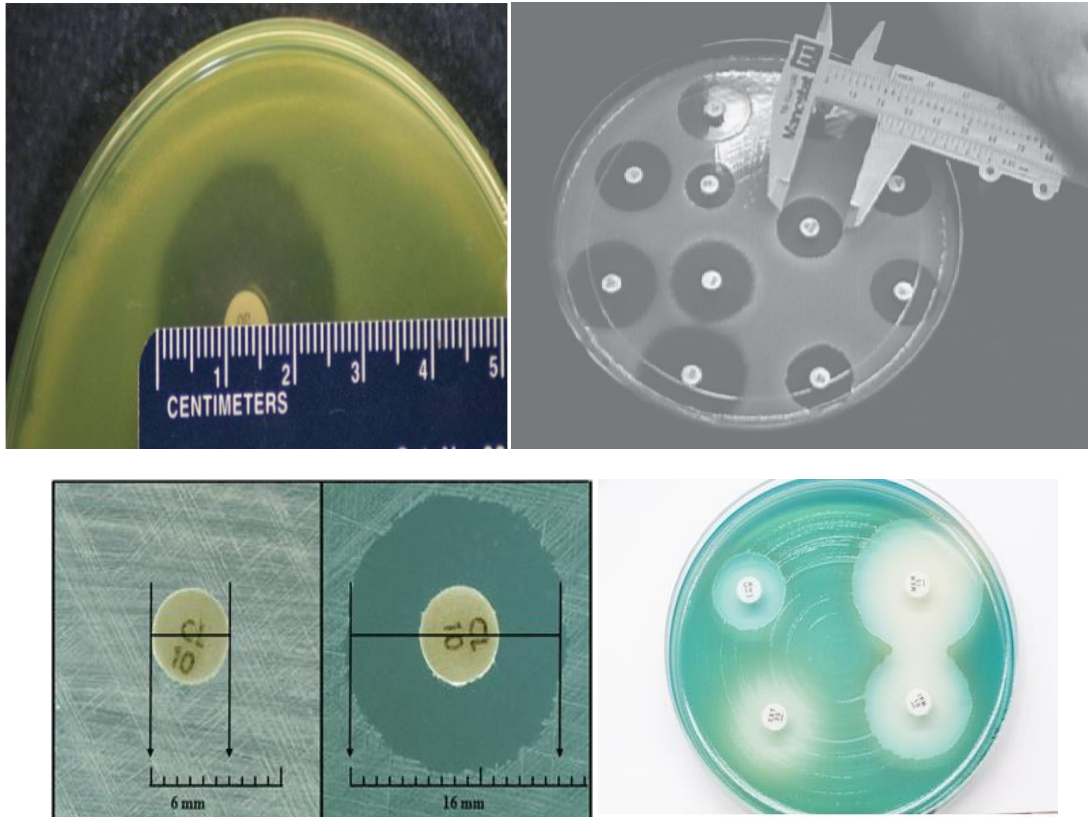
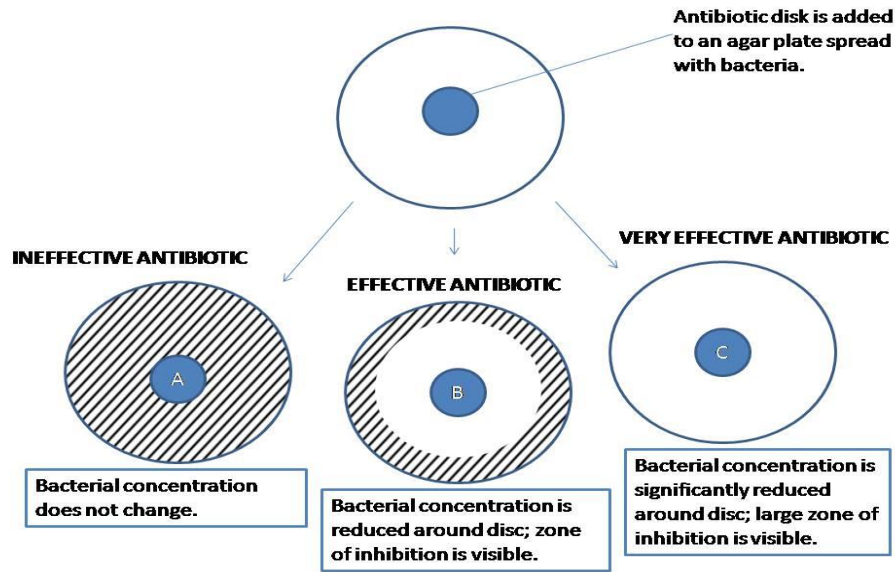
تقارن أقطار بقع الصد الناتجة عن سلسلة تراكيز المضاد الحيوي المراد اختباره مع أقطار بقع الصد الناتجة عن سلسلة المعياري المرجعي للمضاد الحيوي.





Test organism shows sensitivity to some antibiotics, indicated by inhibition of bacterial growth around discs (zones of inhibition) after incubation

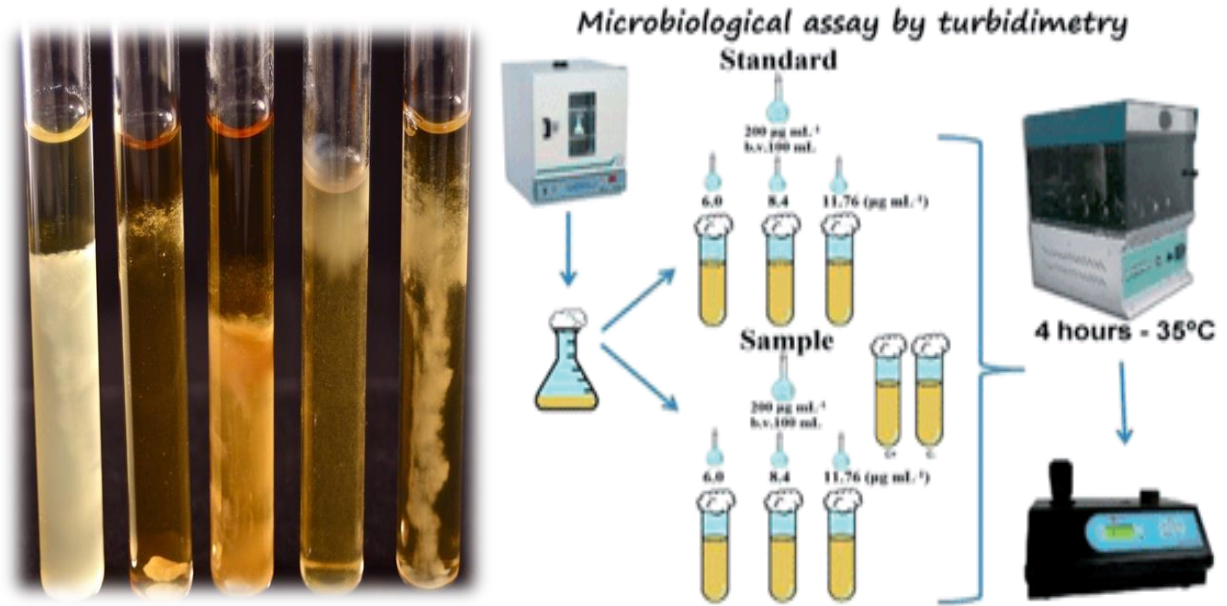




طريقة مقياس العكر Turbidimetric Method

- يمكن إجراء المقايسة الميكروبيولوجية للمضادات الحيوية في المستنبتات السائلة المغذية ضمن مجموعة من أنابيب الاختبار مملوءة بمسعلق المكروبات المعيارية وبتراكيز متدرجة من المضاد الحيوي.

- يحدد التركيز باستخدام مقياس العكر Turbidimeter وبالمقارنة مع تراكيز من المعياري المرجعي للمضاد الحيوي.



2- مقايصة الفعالية في الفيتامينات ميكروبيولوجياً Microbial Activity Assay of Vitamins

- تعتمد مقايصة بعض الفيتامينات على مبدأ أن المكروبات لا تنمو طبيعياً إلا بوجود بعض الفيتامينات.
- مبدأ الاختبار: هو زرع ميكروبي على مستنبت مبدع عنه الفيتامين المراد مقايسته والمهم لنمو ذرية محددة من المكروبات.
- تضاف المادة المعيارية والمادة المراد مقايستها بتركيز مختلفة إلى المستنبتات الحاوية على الذرية الميكروبية المحددة.
- معيار الفعالية الفيتامينية هو شدة نمو المكروب.
- هذه الطرائق تعتبر نوعية جداً وتطبق عادة في حال مقايصة كميات صغيرة جداً من الفيتامين.
- مثال : Vit B12 ، حمض الفوليك ، بانتوتينات الكالسيوم.

المقاييسات البيولوجية Biological Assays

تشمل طرائق كيميائية حيوية أو مناعية كيميائية لتعيين فاعلية المادة المراد اختبارها أو مستحضراتها الدوائية عندما لا يمكن اختبارها كيميائياً أو فيزيائياً لسبب ما.

1- المقاييسات البيولوجية للفيتامين D المضاد للرخد (الكساح):

تحدد فعالية Vit D مقارنة مع الفعالية المضادة للرخد لمعياري من Cholecalciferol.

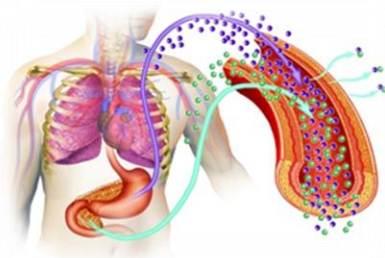
- يستخدم عدد معين من الجرذان ذات مواصفات خاصة.
- يجري قطعها عن الرضاعة، وتخضع لنظام غذائي مسبب للكساح يستمر 3 أسابيع.
- يحدد تطور الكساح عند كل جرذ بأخذ صورة شعاعية للنهايات المحورية لعظم الساق الأكبر.
- تعطى جرعة كاملة أو جرعات من المستحضر المعياري لـ Vit D أو المراد مقياسه.
- تقتل الجرذان وتقدر النسبة التي شفي بها الكساح بواسطة الصور الشعاعية، وتحسب نتائج المقاييسات بطرائق إحصائية.

2- المقاييسات البيولوجية للهرمونات Hormones Biological Assays

- مبدأ هذا النوع من المقاييسات هو:
 - مقارنة فعالية الهرمون المفحوص على أعضاء حيوية سواء مباشرة في حيوانات التجربة أو في أعضاء حيوية معزولة.
 - تجري المعايرة من خلال معرفة زيادة كتلة أو حجم العضو الذي يستقر فيه الهرمون.
 - أو من خلال تأثيره في وظائف العضوية كسكر الدم أو الضغط الدموي.
- مثال:

المقاييسات البيولوجية للأنسولين Biological Assay of Insulin

- حقن الأنسولين في الأرنب وملاحظة التأثير الخافض لسكر الدم مقارنة بعياري.
- يستخدم 24 أرنباً، وزن لا يقل عن 1.8 كغ تخضع لنظام غذائي قبل إجراء التجربة، تمنع الإثارة، تقسم لمجموعات.
- تعطى جرعات بتراكيز معينة تحت الجلد لكل مجموعة.
- تجرى تقاطعات بين الأرانب.
- تؤخذ عينات الدم بعد زمن محدد من الوريد الهامشي.
- تثقل ويعاير الغلوكوز في البلازما 510nm.
- تعامل النتائج إحصائياً.



الاختبارات البيولوجية Biological Tests

❖ المأمونية أو السلامة Safety

- يجرى هذا الاختبار في الأحياء In Vivo، لكشف أي ردود فعل Reactions بيولوجية غير متوقعة أو غير مقبولة.
- يطلب على المنتجات المصنعة بطرائق التقانة الحيوية أو المستحضرات البيولوجية، كما يشمل بعض المضادات الحيوية مثل الستربتومايسين، ومضادات الفطريات مثل النيسيتاتين و Griseofulvin.
- تستخدم الفئران في اختبار المنتجات المصنعة بطرائق التقانة الحيوية، بينما تستخدم الفئران وخنازير غينيا لأجل المستحضرات البيولوجية كالمصول واللقاحات.
- له مسميات مختلفة على حسب دساتير الأدوية منها : السمية المفرطة، السمية الشاذة Abnormal Toxicity.



- تجرى على فئران ذات مواصفات محددة (17-23 غ) USP.
- نظام حماية خاص.
- حقن وريدي.
- مراقبة 48 ساعة.
- نجاة الحيوانات وعدم ظهور على أكثر من فأر أعراض جانبية أكثر من مستوى السمية العائد للمادة نفسها فالمادة مقبولة.
- إعادة الفحص عند موت حيوان أو أكثر باستخدام ضعف عدد الفئران.

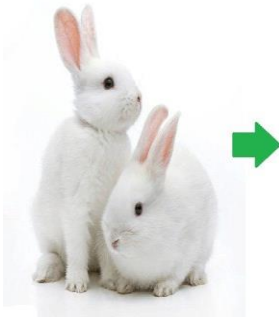
❖ المواد المسببة للإعياء أو الهمود Depressor Substances

- يدعى أيضاً باختبار المواد المشابهة للهيستامين، أو المواد المخدرة للأوعية التي لها قدرة على خفض التوتر الوعائي.
- يجرى الفحص على قطط ذات مواصفات دستورية محددة (بالغة، ذكور أو إناث غير حوامل).
- تخدير، كشف الشريان السباتي، ربط بجهاز قياس ضغط الدم.
- كشف الوريد الفخدي.
- حقن بتركيز محدد من الهيستامين العياري 0.1مكغ/كغ.
- تحديد انخفاض ضغط الدم الحاصل.
- حقن محلول الفحص بالتناوب مع العياري.
- يقبل محلول الفحص إذا كان نقص ضغط الدم الحاصل في المحلول المفحوص أقل من العياري.

❖ مولدات الحمى (البيروجين) Pyrogen

- مولدات الحمى هي ذيفانات داخلية Indotoxin تنشأ غالباً من وجود الجراثيم سلبية الغرام، أو هي أشلاء جرثومية تأتي غالباً بعد عمليات التعقيم.

- الأعراض:
- تسبب مولدات الحرارة أعراضاً مثل ضيق التنفس والحمى، وقد تؤدي في بعض الأحيان إلى موت المريض، كذلك قد تسبب أعراض نقص تروية، برودة أطراف، آلام في الرأس، ووهن عضلي عام.
- البنية: عبارة عن معقدات كبيرة الوزن الجزيئي، مكونة من دسم وبروتين وعديد سكاريد.
- الحيوانات: أرناب ذات مواصفات دستورية محددة 1.5-3.5 كغ تتبع لنظام غذائي محدد.
- الأدوات: ميزان حرارة خاص، جهاز تثبيت، أدوات زجاجية ومحاقن خالية من البيروجين.
- فحص تمهيدي بفحص استجابة الأرناب:
- حقن في الوريد الهامشي 10 مل محلول معادل للتوتر / كغ.
- استبعاد الحيوان الذي يبدي تغير أعلى من 0.6 درجة.
- منع الغذاء والماء خلال ليلة كاملة.
- الاختبار النهائي:
- تحقق العينة، وتحدد درجة الحرارة البدئية والعظمى.
- تقاس الحرارة خلال 90 دقيقة قبل الحقن ، وخلال الثلاث ساعات التي تلي الحقن، بفترات محددة 60-90-120-180 دقيقة.
- تسجل النتائج وتقارن مع المعطيات الدستورية.



PYROGEN TESTING



❖ الـذيفانات الداخلية الجرثومية LAL Test – Bacterial Endotoxins

- وجد أن حلالة Lysate أحد الحيوانات المائية المسمى سرطعان نعل الفرس أو Limulus Polyphaemus تحوي أنزيمياً وبروتينات قابلة للتخثر بوجود مولدات الحمى.
- جرى تطوير اختبار للذيفانات الداخلية الجرثومية دعي Limulus Amebocyte Lysate

"LAL"



- هناك ثلاث تقانات للاختبار:
 - 1- تخثر الهلام Gel-Clot: تقوم على تشكيل الهلام.
 - 2- العكر Turbidimetry: تقوم على تطور عكر بعد انشطار ركيزة داخلية النمو.
 - 3- مولد الصبغ Chromogenic: تقوم على تطور لون بعد تفكك معقد صناعي بين الببتيد ومولد الصبغ.

Thank you