جَـامعة
المَـنارة
MANARA UNIVERSITY

علم الميكروبيولوجيا الصيدلانية

Pharmaceutical Microbiology

المحاضرة الخامسة

الاختبارات الميكروبيولوجية في الصناعة الصيدلانية

د. سلاف الوسوف

العام الدراسي ٢٠٢٠ – ٢٠٢١

قواعد GMP لمنع التلوث الميكروبي للأشكال الصيدلانية النهائية:

- عند استخدام المواد والمنتجات الجافة في الإنتاج، يجب اتخاذ احتياطات خاصة لمنع تولد وانتشار الغبار، كما يجب توفير نظام للتحكم المناسب في الهواء.
- يجب تجنب التلوث الانتقالي أو المتصالب عن طريق اتخاذ التدابير الفنية أو التنظيمية اللازمة.
- القيام بعمليات الإنتاج في المناطق المخصصة (البنسيلين، اللقاحات الحية، والمستحضرات الجرثومية الحية وبعض المستحضرات البيولوجية الأخرى).
- إجراء دورة للإنتاج مع فاصل زمني ثم يليها التنظيف المناسب وفقاً لإجراءات التنظيف المصدق عليها.
- توفير المحابس الهوائية المصممة بطريقة ملائمة، ودرجات الضغط المتفاوتة، ونظم إمداد واستخلاص الهواء.
- التقليل من مخاطر التلوث التي يسببها إعادة توزيع أو إعادة إدخال الهواء غير المعالج أو المعالج بشكل غير كاف.
- ارتداء الملابس الواقية عند التعامل مع المنتجات أو المواد.
- استخدام الإجراءات المعروف فعاليتها للتنظيف وإزالة التلوث.
- استخدام" النظم المغلقة "في الإنتاج.
- إجراء اختبارات الكشف عن البقايا.
- استخدام بطاقات تعريف للدلالة على حالة النظافة على المعدات.

مخاطر التلوث الميكروبي للأشكال الصيدلانية النهائية:

- يؤدي التلوث الجرثومي في الأشكال الصيدلانية إلى خفض أو حتى فقد الفعالية العلاجية للدواء من خلال:
  - احداث السمية الخمجية.
  - تغيير الخصائص الكيميائية والفيزيائية والحسية للدواء.

- ❖ تغيير المحتوى من المكونات الفعالة.

- ❑ مراقبة التلوث للأحياء الدقيقة هو من مهام قسم مراقبة الجودة في معمل الأدوية.
- ❑ يتضمن اختبار التلوث الجرثومي إجراء:
  - التعداد العام لمجمل الجراثيم الهوائية Total aerobic microbial counts (**TAMC**).
  - التعداد العام لمجمل الخمائر والفطور Total yeast and mold counts (**TYMC**).
  - إجراء اختبارات نوعية لبعض الاحياء الدقيقة :

Candida albicans، Salmonella، E. coli، Pseudomonas aeroginosa،Staphylococcus aureus ،

Aspergillus brasiliensis

- ❑ يقاس التعداد اعتماداً على قيمة Colony forming unit (**CFU**): عدد المستعمرات الجرثومية أو الفطرية المتشكلة من خلية واحدة في العينة المفحوصة.

الاختبارات الميكروبيولوجية في الصناعة الصيدلانية:

- ❑ تهدف إلى تحديد كمية ونوعية الأحياء الدقيقة الموجودة في العينة المختبرة.
- ❑ تتضمن :
  - ❖ طرق تقليدية تعتمد بشكل أساسي على الزرع والحضن (MPN، ...) .
  - ❖ طرق حديثة تعطي نتائج أكثر دقة وبفترة زمنية أقل (PCR، .....).
- ❑ تلعب عدة عوامل دوراً في اختيار طريقة الاختبار الأنسب:
  - نوع المادة المختبرة وخصائصها الفيزيائية والكيميائية.
  - طريقة التحضير والتصنيع.
  - المواصفات النهائية للمنتج، وغيرها.
- ❑ تشمل جميع الاختبارات ثلاث مراحل:
  - جمع ومعالجة العينات.

https://manara.edu.sy/

- التعداد الميكروبي.
- التشخيص.

طرق جمع العينات Sampling Process ومعالجتها:

- ❑ تعتبر أهم مرحلة في الاختبارات الميكروبيولوجية.
- ❑ تكون العينة المأخوذة جزء صغير من الطبخة الكاملة.
- ❑ ليس من الضروري أن تكون العينة المأخوذة حاوية على نمو ميكروبي.
- ❑ وضع قواعد لتحديد كيفية أخذ العينات مثال تؤخذ عينات الماء من مخارجها في غرف التصنيع ومن خزانات التجميع ومناطق أخرى.
- ❑ بعد تحديد مكان أخذ العينة (العنصر الأهم) يتم تحديد طريقة اقتطاع العينة تبعاً لنوع العينة:

a. العينات السائلة.

b. العينات الصلبة..

c. عينات البيئة المحيطة.

a. العينات السائلة Liquid samples:

- ❑ الصناعة الصيدلانية: الشرابات، المستحضرات المائية، المعلقات والمستحلبات.
- ❑ الصناعة الغذائية: الماء، العصائر، الحليب، القهوة والشاي.
- ❑ الصناعة التجميلية: الشامبو والصوابين السائلة.
- ❑ يتم جمع العينات كما يلي:
  - ❖ انتقاء العينات.
  - ❖ جمع العينات بعبوات عقيمة ونقلها إلى المختبر.
  - ❖ مزج العينات جيداً إما يدوياً أو آلياً حتى الحصول على عينات متجانسة.
  - ❖ تمديد العينات بشكل عقيم باستخدام محلول ممدد عقيم.

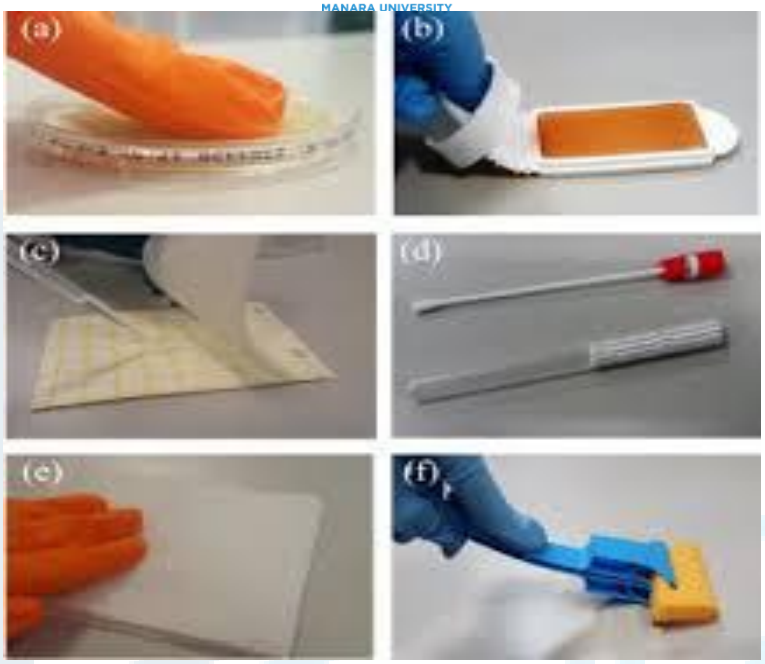
❖ يسمح بإضافة بعض المواد الفعالة على السطح مثل الليستين أو البولي سوربات 80 للحصول على عينة متجانسة.

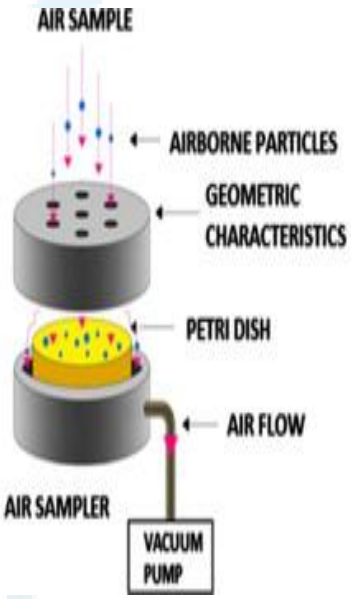
b. العينات الصلبة Solid samples:

- ❑ المضغوطات والكبسولات.
- ❑ تعتبر معرضة للتلف أو التحلل نتيجة التلوث الميكروبيولوجي.
- ❑ جمع العينات يتم باستخدام تقنيات عقيمة.
- ❑ يتم نقل العينات بشكل سريع (أقل من 24 ساعة).
- ❑ إزالة العينات الثانوية بشكل عقيم.
- ❑ تمديد العينات بمحلول ممدد عقيم مناسب.
- ❑ مجانسة العينات باستخدام الخلاط مثلاً أو باستخدام المواد الفعالة على السطح أو الحرارة.

c. عينات البيئة المحيطة Environmental samples:

- ❑ عينات السطح Surface samples:
  - ❖ تتم غالباً بأخذ مسحة باستخدام ماسحة قطنية.
  - ❖ توضع الماسحة في محلول ممدد وترج وتوزع على طبق آغار
  - ❖ يمكن استخدام سكين أو شفرة معقمة أو شرائط لاصقة أو الاسفنج العقيم.
- ❑ عينات الهواء:
  - ❖ Passive sampling: وضع طبق بتري الحاوي على وسط مغذ مفتوحاً في الهواء لفترة زمنية محددة.
  - ❖ Active sampling: باستخدام مخلية هواء أو جهاز جمع الجزيئات.





معالجة وتحضير العينات:

❑ المركبات المنحلة بالماء:

- يحل المركب المراد اختباره في وقاء فوسفاتي بتمديد 1:10 (pH 7.2).
- يتم إجراء تمديدات أخرى عند الضرورة بنفس الوقاء لضمان أن التعداد العام الميكروبي TAMC لا يتجاوز 250 CFU/Plate و TYMC لا يتجاوز 50 CFU/Plate.

- المواد الأولية غير المنحلة بشكل كامل يجب طحنها بداية بالهاون بشروط عقيمة إلى مسحوق ناعم ثم حلها.

❑ **المركبات غير الدسمة غير المنحلة بالماء:**

- يحل المركب المراد اختباره في وقاء فوسفاتي.
- يضاف عامل فعال على السطح مثل بولي سوربات 80 بتركيز 1 g/L.
- يتم إجراء تمديدات أخرى عند الضرورة بنفس الوقاء لضمان أن التعداد العام الميكروبي TAMC لا يتجاوز 250 CFU/Plate و TYMC لا يتجاوز 50 CFU/Plate.

❑ **المركبات الدسمة:**

- يحل المركب في Isopropyl myristate المعقمة بالترشيح.
- يمكن إضافة بولي سوربات 80 ولكن بالحد الأدنى الضروري للحل.
- يتم التسخين عند الضرورة لدرجة حرارة 40 درجة مئوية لا أكثر.وفي بعض الحالات الخاصة إلى حرارة ٤٥ درجة، بعد المزج يمكن عند الضرورة استخدام حمام مائي للحفاظ على درجة حرارة المزيج
- تضاف كمية من محلل ممدد مناسب مسخن سابقاً بتمديد 1:10.
- يتم المزج حتى الحصول على مستحلب.

طرق التعداد الميكروبي Enumeration methods:

❑ تعتبر الخطوة الأهم في تقييم أمان الدواء من الناحية الميكروبيولوجية.

❑ يعبر عن النتائج بواحدة CFU في حجم محدد باستخدام:

❖ الطرق التقليدية :

➢ التعداد على السطح.

- طريقة الصب.
- العدد الأكثر احتمالية.
- الترشيح الغشائي.

❖ الطرق الحديثة:

- تحديد الـ ATP في الخلايا الحية المثبتة على غشاء.
- قياس المقاومة الميكروبية.
- الكشف عن ثاني أوكسيد الكربون.

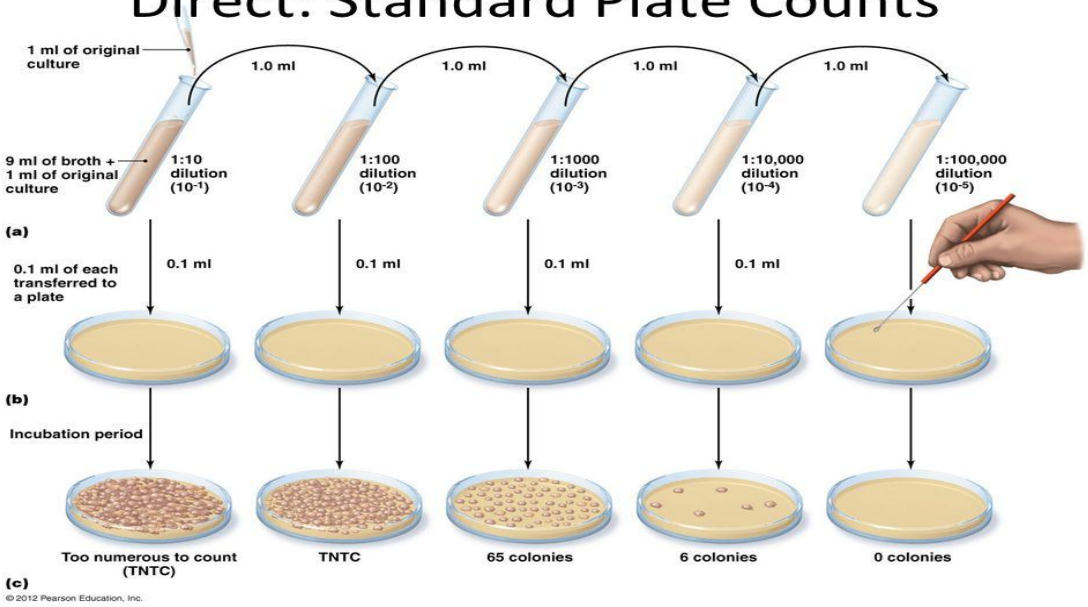
أولاً. الطرق التقليدية:

I. التعداد على السطح Standard plate count:

- ❑ بعد تحضير وتمديد العينة تمزج مع وسط آغار عام محضون بحرارة 25- 35 درجة مئوية.
- ❑ يصب الآغار والعينة في طبق بتري ويحضن لمدة 48 ساعة وبعدها يتم عد المستعمرات.
- ❑ مساوئ الطريقة: مستهلكة للوقت، كميات كبيرة من الأوساط الزرعية والمواد العقيمة، مكان حضن كبير.
- ❑ تم تطوير بعض الخطوات إلى نصف أوتوماتيكية:
  - ❖ التوزيع الميكانيكي للعينة على السطح.
  - ❖ استخدام أغشية لجمع الأحياء الدقيقة.
  - ❖ استخدام أشرطة حاوية على مواد مغذية لجمع الأحياء الدقيقة.

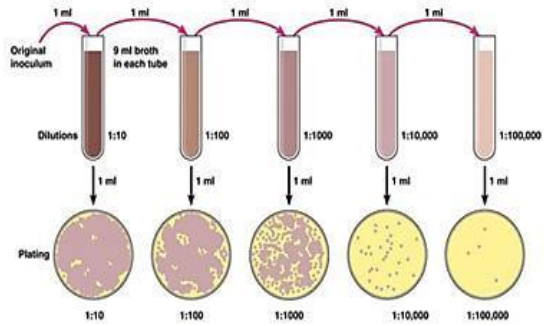
https://manara.edu.sy/

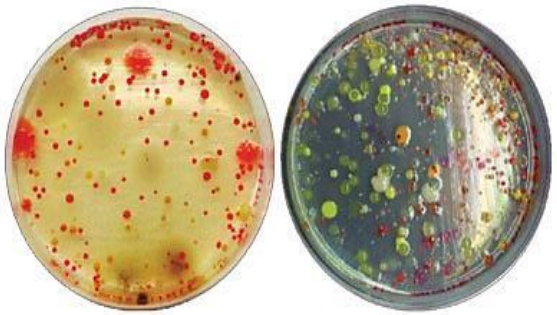
Direct: Standard Plate Counts

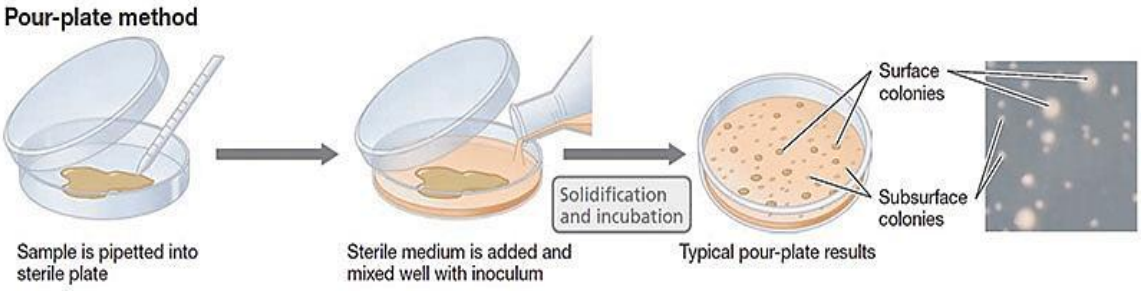


II. طريقة الصب Pour Plate Method :

- يوضع 1مل من المعلق الجرثومي المراد عد الجراثيم فيه .

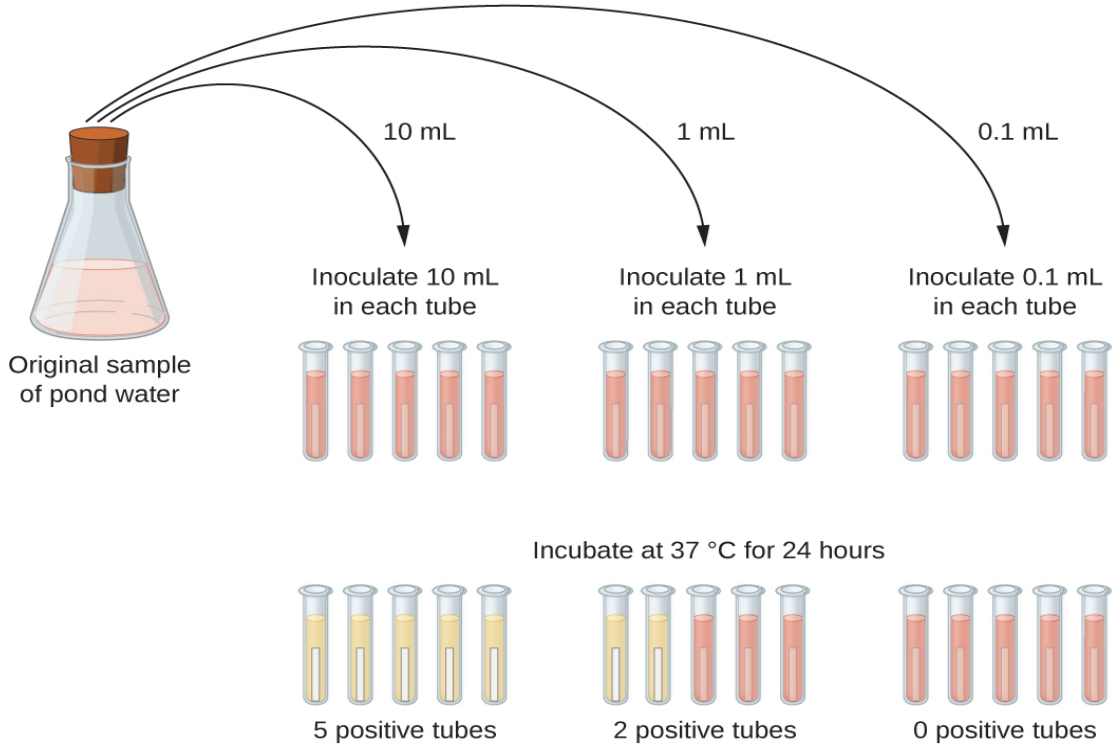






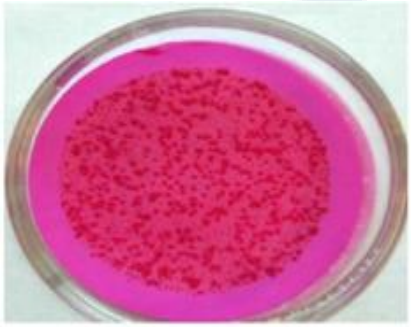
III. العدد الأكثر احتمالاً Most probable number (MNP):

- فعالة في التراكيز المنخفضة من الأحياء الدقيقة (< 100 g/L).
- تسمح فقط بتعداد الميكروبات الحية.
- تتم بأخذ حجم معين من العينة الأم المراد دراستها ثم تمدد بواسطة وسط زرعي بشكل عشري في عدة أنابيب، ثم تحضن أوساط الزرع بالشروط المناسبة ثم يلاحظ عدد الأنابيب التي ظهرت فيها الخواص المدروسة (عكر، إنتاج حموض، إنتاج غازات...)، ثم الرجوع إلى جداول مرجعية لمعرفة العدد التقريبي للجراثيم في كل أنبوب.
- يعتمد الاختبار على الفرضيات التالية:
  - تتوزع الميكروبات بشكل عشوائي في العينة.
  - الميكروبات تكون منفصلة عن بعضها ولا تتجمع بشكل عنقودي.
  - كل أنبوب حاوٍ على خلية حية واحدة سينتج فيه نمو قابل للكشف.
  - تعتبر الأنابيب الحاوية على عينات مختلفة بنفس التراكيز مستقلة.



IV. طريقة الترشيح للغشاء:

- ❑ تمرر العينة عبر فلتر قطر ثقوبه 0.45 ميكرون.
- ❑ تغسل ثلاث مرات وكل مرة بـ 100 مل بالمحلول الذي استخدم لتمديد العينة.
- ❑ في حال احتواء العينة على ليبيدات يضاف بولي سوربات 80 أو مادة ممحلبة أثناء الغسل.
- ❑ يقسم الفيلتر إلى نصفين ويوضع أحدها على وسط نوعي للجراثيم (غالباً TSB) والنصف الثاني على وسط خاص للفطور (ساوبورو دكستروز آغار بعد إضافة صاد حيوي لمنع نمو الجراثيم). ويتم الحضن لمدة 14 يوم بدرجتي الحرارة 30°- 35° للجراثيم و 20°- 25° للفطور.

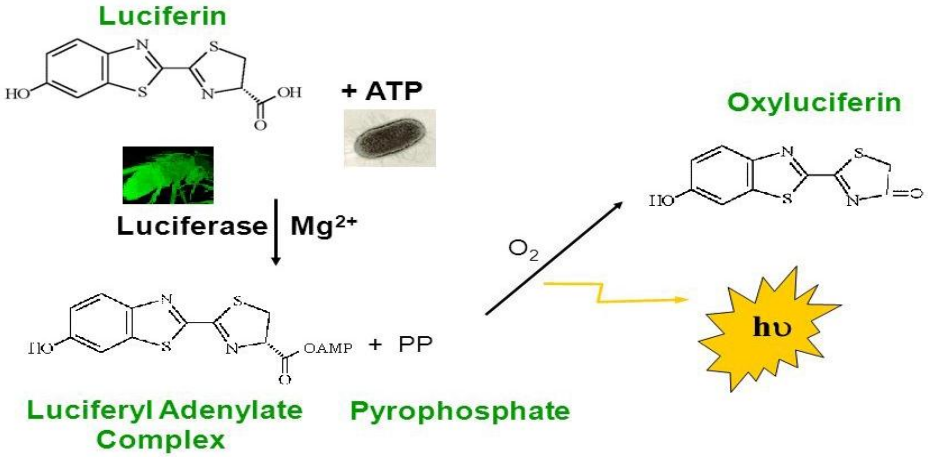


ثانياً. الطرق الحديثة:

I. تحديد الـ ATP في الخلايا الحية المثبتة على غشاء ATP bioluminescence:

- يتواجد الـ ATP في جميع الخلايا الحية يعتبر مشعراً ممتازاً للتلوث الحيوي.
- تعتمد هذه الطريقة على تفاعل ضوئي أنزيمي ينجم عنه تحرير ضوء يمكن قياس شدته.
- يتم الحصول على النتائج خلال عدة ساعات.

Luciferin +ATP +Luciferase ⟶ Visible Light (Intensity detected by luminometer)

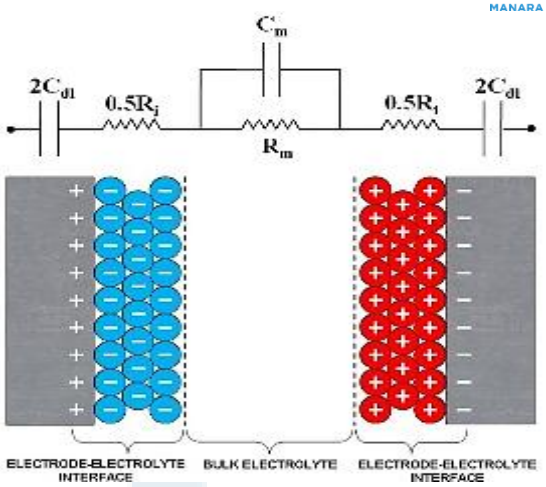


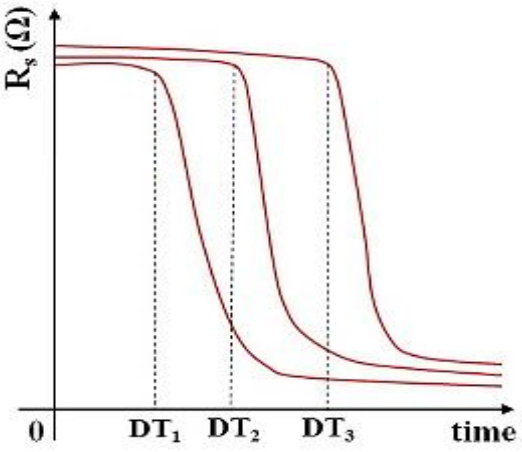
II. قياس المقاومة الميكروبية Impedance microbiology

- تعتمد على قياس التغير في القدرة على توصيل الكهرباء في وسط مغذٍ سائل مما يدل على وجود ميكروبي.
- أو بعبارة أخرى هي مقاومة تدفق تيار متناوب يمر عبر وسط نمو ميكروبي موصل. أثناء النمو الميكروبي ، تُنتج عمليات التمثيل الغذائي تغييرات قابلة للقياس كهربائيًا في وسط النمو بسبب استقلاب العناصر الغذائية عالية الوزن الجزيئي إلى مكونات أيونية أصغر مشحونة تزيد من التوصيل الكهربائي للوسط. إن التباين في التوصيل الكهربائي ، الذي يتم رصده خلال الوقت يتناسب مع التغير في عدد الكائنات الحية الدقيقة وبالتالي يمكن قياس نمو الميكروبات.
- تعتبر الطريقة الأكثر فعالية في كشف وتحديد كل من:

Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeroginosa, Aspergillus niger, Candida albicans

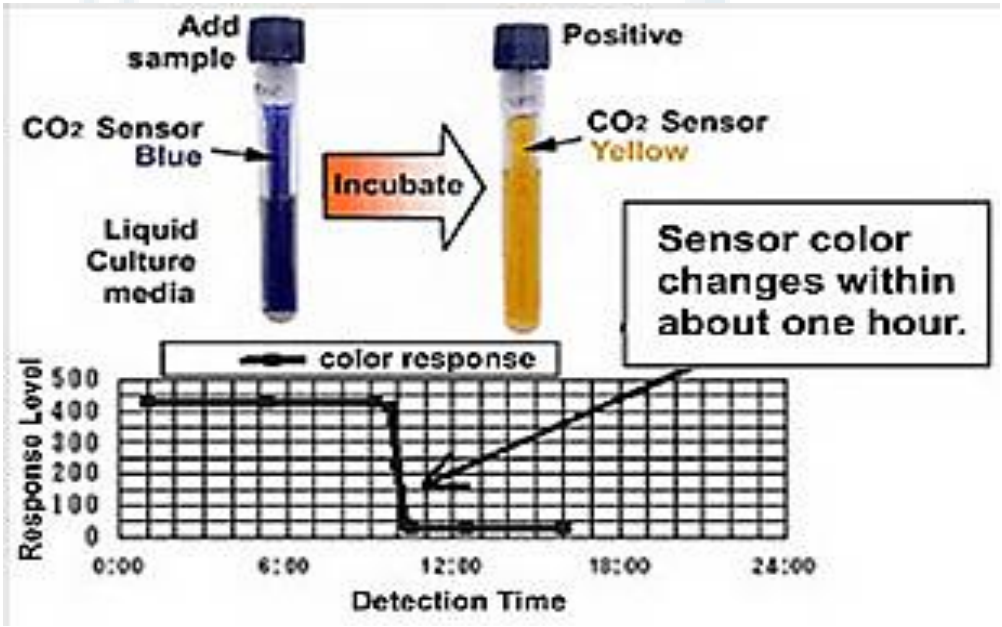
https://manara.edu.sy/





III. الكشف عن ثاني أوكسيد الكربون CO2 Sensor:

- تعتمد هذه الطريقة على وجود حساس لوني لثاني أكسيد الكربون.
- يوضع الحساس داخل الوسط بعد إحاطته بغشاء نصف نفوذ.
- ينتشر CO2 الناتج عن عمليات الاستقلاب الميكروبية عبر الغشاء الذي يسمح فقط للغازات بعبوره وينحل في الماء المحيط بالحساس وينتج أيونات هيدروجين تسبب تغيراً لونياً يعتبر دليلاً على وجود الميكروبات.



الطرق التشخيصية Diagnostic methods

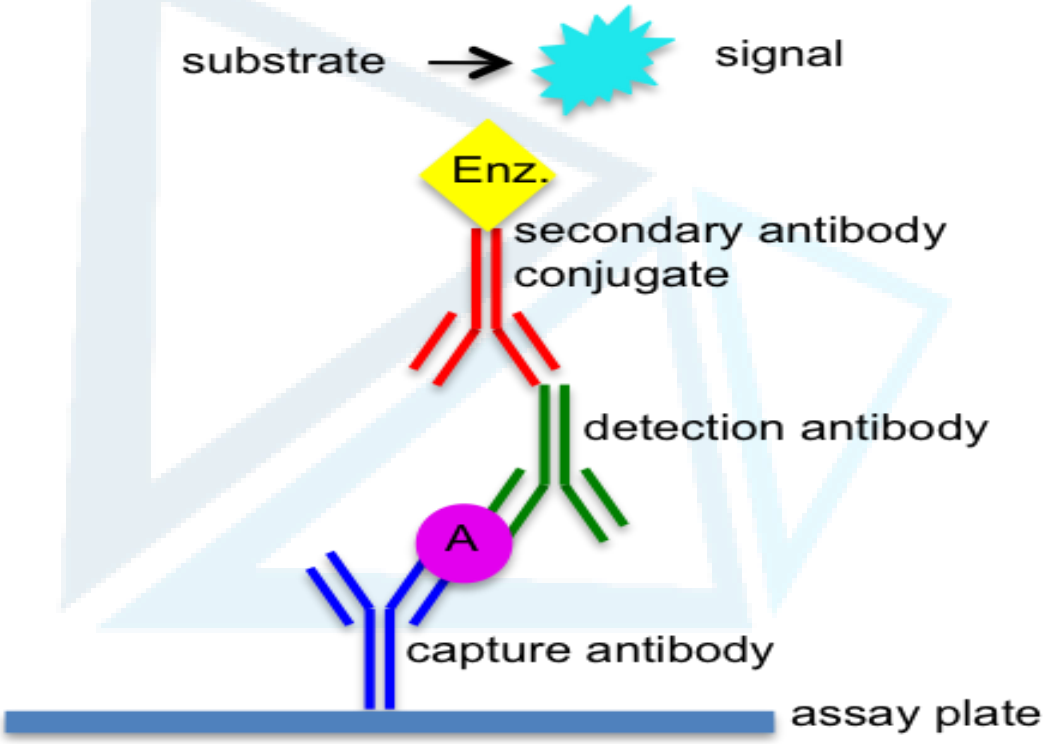
- مرحلة تحديد الهوية.
- تتم باستخدام عدة طرق:
  - ELISA
  - الكيت التشخيصي المصغر Miniaturized diagnostic kit
  - الفصل المغناطيسي المناعي Immuno-magnetic separation (IMS)
  - PCR
  - Microarray

A. الكيت التشخيصي المصغر Miniaturized diagnostic kit:

- تفاعل لوني يجري في صفائح معايرة دقيقة.
- في كل أنبوب دقيق ينتج لون يمكن قياسه.
- يمكن تحديد نوع الميكروبات باستخدام شيفرة محددة.
- هناك كيتات نوعية لأنواع سلالات جرثومية مثل: الشيغلا، السالمونيلا، المتقلبات، المعويات والجراثيم إيجابية الغرام اللاهوائية والخمائر والفطور.

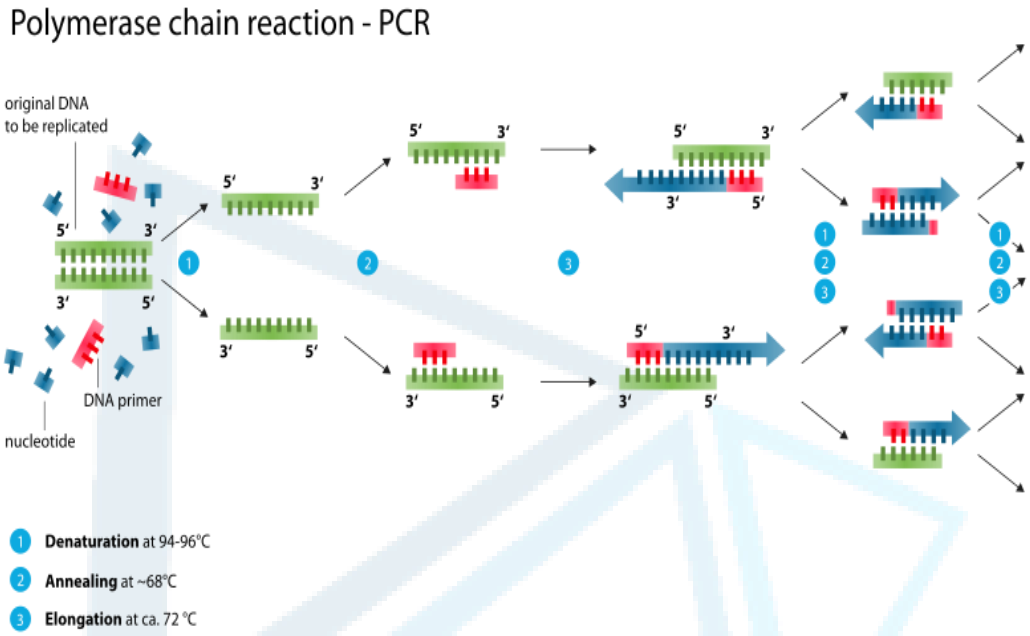
B. enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa):

- تفاعل مناعي يعتمد على ارتباط مستضد بالضد الموافق له الذي يكون مرتبطاً بدوره بأنزيم
- الأنزيم يشارك في تفاعل لوني واللون الناتج يتم قياسه.
- تعتبر الطريقة النوعية للكشف عن السالمونيلا والـ *E. coli* والليستريا.



C. تفاعل البلمرة التسلسلي PCR:

- يستخدم للكشف عن طيف واسع من الاحياء الدقيقة بمدة زمنية قصيرة قياساً مع الطرق الأخرى وهي طريقة واسعة الانتشار عالمياً.



قياس نسبة الاسترداد Recover rate:

- يتم التأكد من فاعلية طريقة العد المستخدمة من خلال ما يعرف بقياس نسبة الاسترداد Recover rate، إذ يجب ألا تقل هذه النسبة عن 50 %.
- يجرى هذا الاختبار بإضافة معلق جرثومي معلوم العدد إلى عبوة من الشكل الصيدلاني المراد قياس المحتوى الجرثومي فيه ثم إعادة زرعه وعده.
- يجب هنا تحقيق شرطين:
  - ألا يزيد حجم المعلق الجرثومي المضاف عن 5% من حجم السائل الموجود في عبوة الشكل الصيدلاني.
  - ألا يخرج التركيز النهائي للجراثيم المضافة إلى عبوة الشكل الصيدلاني عن المجال 10-100 CFU/ml.
- ثم تعامل هذه العبوة بنفس الطريقة التي تعامل بها عبوات العينة من الشكل الصيدلاني المختبر، وبعد عد الجراثيم في العبوة التي أضيف لها المعلق الجرثومي المعلوم العدد.

- ينسب العدد الناتج إلى العدد المعلوم المضاف، فإذا كانت النسبة أكبر أو تساوي 50 % تعتبر طريقة العد المستخدمة صحيحة وتعد النتائج مقبولة. أما إذا كانت غير ذلك فيجب اختيار طريقة عد أخرى لتقييم المحتوى الجرثومي للشكل الصيدلاني المختبر.

نهاية المحاضرة الخامسة

https://manara.edu.sy/