المحاضرة

12

الاختبارات المايكروبيولوجية للمستحضرات الصيدلانية

د. شعيب الأحمد

لم تتوحّد بعد الاتفاقيات بشأن العدد المايكروبيولوجي المسموح به في كل مستحضر صيدلاني، حيث يجري تحديد هذه الحدود بحسب طبيعة المستحضر أو المواد الفعّالة وغير الفعّالة، بحسب مكان تطبيقه والأخطار المتوقعة من استخدامه ملوّثاً.

ولكن ما هو متفق عليه:

أعلى حد من النقاوة الماكروبيولوجية هو العقامة Sterility

الحدود المسموح بها في المستحضرات الصيدلانية غير المطلوب أن تكون عقيمة والمواد الأولية الداخلة في تركيبها تشمل:

- التعداد الإجمالي للميكروبات الهوائية

Total aerobic microbial count (TAMC)

- التعداد الإجمالي للخمائر والعفنات

Total combined molds and yeast count (TCMY)

- إضافة إلى خلوها من نوع أو أكثر من الجراثيم التالية:

✓الزوائف الزنجارية Pseudomonas aeruginosa

✓أنواع السالمونيلا Salmonella species

✓الإشريشيا القولونية Escherichia coli

✓العنقوديات الذهبية Staphylococcus aureus

التعداد العام للميكروبات الهوائية أو الخمائر والعفنات:

هو عدد المستعمرات Colonies النامية على المستنبتات culture media الصلبة في الغرام أو المليلتر من المادة أو المستحضر الصيدلاني.

مبادئ الاختبارات المايكروبيولوجية:

تعتمد الاختبارات المايكروبيولوجية بشكل عام على الزرع باستخدام مستنبتات خاصة، ثم يجري الكشف عن تلوث المستحضرات الصيدلانية وعدّ المستعمرات بالعين المجردة أو بوسائل بسيطة.

- ✓ التلوث المايكروبيولوجي يترافق غالباً مع تغيّر في ال pH أو اللون أو قوام المستحضر الصيدلاني أو إنتاج روائح ناتجة عن الغازات التي تنتجها الميكروبات المسببة للتلوث (وهذا قد يساعد في استعراف النوع الملوّث).

❖ عدم ظهور أية مستعمرة في اختبار التعداد العام لا يعني أن المستحضر الصيدلاني عقيم لاختلاف طريقة الزرع.

تصنيف دستور الأدوية الأوروبي للحدود الميكروبية:

- المستحضرات العقيمة
- المستحضرات المعدة للاستخدام الموضعي
- المستحضرات الفموية Oral والمستقيمية Rectal
- المستحضرات العشبية Herbal

الفئة 1: وتشمل المستحضرات العقيمة

الفئة 2: وتشمل المستحضرات المعدة للاستخدام الموضعي

(موضعياً للجهاز التنفسي واللصوقات الجلدية)، حيث يجب ألا يتجاوز التعداد الإجمالي للميكروبات الهوائية 10^2 مستعمرة/غ (TAMC NMT 10^2 CFU/gm)، بالإضافة إلى متطلبات خاصة تتضمن خلوّها من الزوائف الزنجارية والعنقوديات الذهبية.

- اللصوقات الجلدية

يجب أن تكون خالية من الإمعائيات.

- المستحضرات الأخرى:

ليس أكثر من 10إمعائيات في غ أو مل من المستحضر.

الفئة 3: وتشمل المستحضرات الفموية والمستقيمية:

حيث يجب ألا يتجاوز التعداد الإجمالي للميكروبات الهوائية 10^3 مستعمرة/غ

(TAMC NMT 10^3 CFU/gm) وليس أكثر من 10^2 فطريات في 1غ أو 1مل من المستحضر الصيدلاني، مع تأكيد خلوها من E. Coli

مستحضرات الإعطاء الفموية الحاوية على مواد أولية من مصادر طبيعية (حيواني- نباتي- معدني):

العدد الإجمالي من الميكروبات الهوائية 10^4 جراثيم و 10^2 فطريات وليس أكثر من 10^2 إمعائيات.

- بالإضافة إلى متطلبات خاصة تتضمن خلوها من السالمونيلا والإشريشيا القولونية والعنقوديات الذهبية.

الفئة 4: وتشمل المستحضرات العشبية Herbals:

حيث يعتمد TAMC على نوع العقاقير وعلى إضافة الماء المغلي أم لا:

1- المستحضرات العشبية التي تتطب إضافة ماء مغلي لها قبل استخدامها:

العدد الإجمالي من الميكروبات الهوائية ليس أكثر من 10^7 جراثيم و 10^5 فطريات في 1غ أو 1 مل من المستحضر الصيدلاني.

ليس أكثر من 10^2 إيشريكيات قولونية في 1غ أو 1مل من المستحضر.

2- المستحضرات العشبية التي لا تتطب إضافة ماء مغلي لها قبل استخدامها:

العدد الإجمالي من الميكروبات الهوائية ليس أكثر من 10^5 جراثيم و 10^4 فطريات في 1غ أو 1مل من المستحضر الصيدلاني.

ليس أكثر من 10^2 إمعائيات وبعض الجراثيم سلبية غرام في 1غ أو 1مل من المستحضر.

الخلو من الإيشريكيات القولونية والسلمونيلا.

مهام المخبر المايكروبيولوجي

القيام بالاختبارات المايكروبيولوجية

- اختبار العقامة
- اختبار الحد الميكروبي
- اختبار غياب بعض الأنواع الجرثومية الممرضة والمرفوضة

المقايسات البيولجية واختبارات الفعالية

- المقايسات البيولوجية
- المقايسات المايكروبيولوجية
- الاختبارات البيولوجية

اختبار العقامة Sterility Test

- يجرى اختبار العقامة على مستحضرات يفترض خلوّها التام من جميع الميكروبات (المستحضرات الحقنية، العينية، اللقاحات..)، أما إمكانية القول إن المستحضر عقيم فيتعلق ذلك بالعينة المختبرة وطريقة الاختبار المتبعة.
- إن الحكم على وجبة كاملة بأنها عقيمة هو أمر نسبي، حيث لا يمكن إجراء اختبار العقامة على كامل هذه الوجبة لذا تُختبر عينات منها، فيراعى في اقتطاع العينات اقتصاديات التحليل، فاختبار العقامة مكلف وغال.
- بحسب بعض المراجع تقتطع عينة لإجراء اختبار العقامة بحسب برامج الاعتيان المتبعة، على ألا يقل عدد العينات المختبرة عن 3 ولا يزيد عن 30 عينة.

مع العلم أنه يجب الأخذ بالحسبان كيفية تحضير الوجبة وكيفية تعقيمها (بالبخار- بالأشعة) أو أن تحضيرها جرى بطريقة الترشيح، وهو الأمر الواجب الانتباه إليه باعتبار أن التعقيم يفترض أن يعطي عقامة تامة.

- ✓ لفحص عقامة الأشكال الصيدلانية السائلة يتم زرعها بشكل مباشر على المستنبت.
- ✓ لفحص عقامة الاشكال الصلبة ونصف الصلبة تتم إذابة الشكل أو تعليقه ثم زرعه.

تتضمن طرائق الفحص:

1- الزرع المباشر:

نأخذ 1 مل من المحلول المراد اختبار عقامته على كل من:

✓ وسط ثيوغليكولات السائل Fluid thioglycolate (FTG) medium

ويتم الزرع فيه 7 أيام بدرجة حرارة 32.5 مئوية في وسط هوائي (فإذاً لا يمكن إعطاء نتيجة اختبار العقامة قبل 7 أيام).

✓ وسط ثيوغليكولات البديل Alternative thioglycolate medium

ويتم الزرع فيه 7 أيام بدرجة حرارة 32.5 مئوية في وسط لا هوائي، وتركيب هذا الوسط هو نفس تركيب الوسط السائل باستثناء الآغار ومادة ريسازورين الصوديوم Resazurin Sodium

✓ وسط كازئين الصويا المهضوم Soybean- casein digest medium

ويتم الزرع فيه 14 يوماً برجة حرارة 22.5 مئوية، لكشف الفطريات والجراثيم الهوائية.

2- الترشيح بمراشح من نترات السيللوز(0.2-0.4مكم):

يتم الحضن لفترة كافية وبدرجة حرارة مناسبة

ثم تقسم المرشحة إلى قسمين ويزرع كل قسم على أحد المستنبتات

ترشح العينة على مرشحة عقيمة

بعد فترة الحضن يجب أن تبقى هذه المستنبتات خالية من أي عكر أو تلوث

حيث أن خلوها من العكر أو التلوث دليل على أن المستحضر المختبر عقيم

لابد من بعض الملاحظات حول اختبار العقامة:

- لا بد من التأكد من عدم امتلاك المستحضر قدرة صادة للنمو الميكروبي ،أو مواد حافظة، فإذا كانت موجدة فلا بد من تعطيلها (بالغسل بماء عقيم مثلاً).
- كما يجب أن يجري التأكد من فعالية المستنبتات المستخدمة و ذلك من خلال إجراء الاختبارات الملائمة suitability tests وهي:

عقامة المستنبتات

Sterility of media

ويجري التأكد من عقامة كل وجبة أو تحضيرة معقمة من المستنبتات، وذلك بحضن جزء من هذه التحضيرة بدرجة الحرارة المحددة مدة 14 يوم، أو بحضن عبوات أو حاويات دون مستحضر على شكل شواهد سلبية Negative أثناء إجراء اختبار العقامة للعينات المفحوصة.

تحفيز النمو

Growth promotion

يجري على كل وجبة أو تحضيرة من المستنبت الجاهز، وذلك بتطعيم عدة عبوات من المستنبت بشكل منفصل بنوع من أنواع الميكروبات التالية بحسب الجدول↓.

Staphylococcus aurous	**Aerobic Bacteria** **البكتريا الهوائية**
Bacillus subtilis	
Pseudomonas aeruginosa	
Clostridium sporogenes	**Anaerobic Bacteria** **البكتريا اللاهوائية**
Candida Albicans	**Fungi** **الفطريات**
Aspergillus Niger	

يجب التقيد بدرجة الحرارة وفترة الحضن، ويجب أن تمتد فترة الحضن إلى 14 يوماً عند التعقيم بالأشعة نظراً لاحتمال وجود بعض الميكروبات التي ممكن أن تكون أصيبت بالأشعة لكن لم تقتل نهائياً، فتعود لفاعليتها عندما تجد الوسط المناسب لنموها.

- يجب إجراء الزرع ضمن جهاز جريان الهواء الصفائحي Laminar air flow

والذي يسمح للهواء بالجريان بجهة واحدة ويحافظ على الوسط عقيماً.

- يجب استخدام الأدوات المعقمة واللباس العقيم

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:

أ- شاهد من كل مستنبت يترك مفتوحاً ضمن داخون جريان الهواء الصفائحي Laminar air flow hood، خلال كامل فترة العمل، ثم يخضع إلى شروط الحضن نفسها، إن خلوه من العكر دليل أن البيئة التي يجري فيها العمل غير ملوثة.

ب- شاهد من كل مستنبت يترك مغلقاً، ويخضع لشروط الحضن نفسها، إن خلوه من العكر دليل على أن المستنبت خال من التلوث.

ج- شاهد من كل مستنبت يجري فيه زرع الماء المقطر العقيم الذي استعمل لإذابة المواد الصلبة أو نصف الصلبة، أو الذي استعمل في عملية غسل المرشحة، ويخضع إلى شروط الحضن نفسها، إن خلوه من العكر دليل على أن الماء عقيم.

تقييم اختبار العقامة

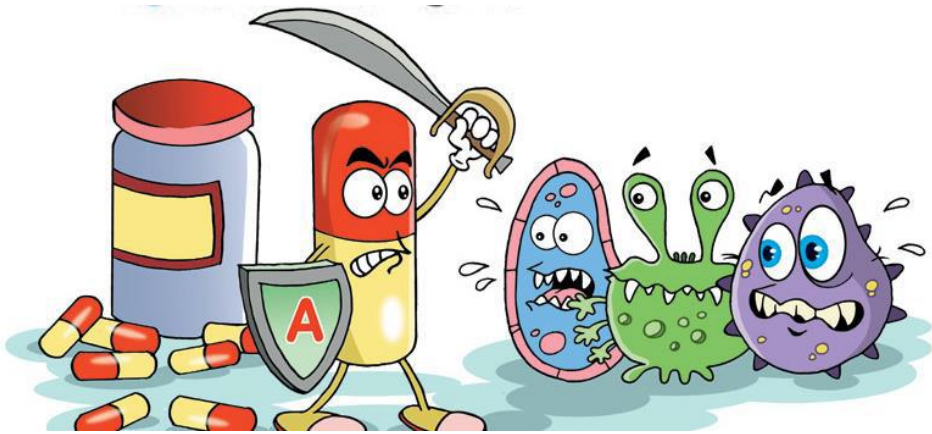
لا يُحكم بسهولة على مستحضر ما أنه غير عقيم، خصوصاً إذا كان قد عُبّأ ضمن أمبولات أو غيرها، إذ يعني هذا رفض الوجبة كلّها .

تابع المخطط التالي لمعرفة كيفية تقييم فحص العقامة.

زرع المستحضر
نمو ميكروبيولوجي
عدم نمو
إعادة الاختبار
المستحضر عقيم
ظهور نمو ميكروبيولوجي
عدم ظهور نمو ميكروبيولوجي
ظهور المستعمرات نفسها المشاهدة في المرة الأولى
إعاد الاختبار
المستحضر عقيم
المستحضر غير عقيم
ظهور نمو ميكروبيولوجي
عدم ظهور نمو ميكروبيولوجي
المستحضر غير عقيم
المستحضر عقيم

اختبار العقامة للصادات الحيوية
Sterility testing of antibiotic

- يجرى هذا الاختبار على المضادات الحيوية المعدة للإعطاء حقناً والتي يحتمل تلوثها ميكروبيولوجياً.
- يستخدم في هذا الاختبار المستنبتات المستعملة لاختبار العقامة وشروط درجة الحرارة نفسها، وتحضن بشروط هوائية ولاهوائية.



يجري العمل بإذابة المادة المطلوبة اختبارها بالماء العقيم، أو بمحلول الببتون العقيم Sterile peptone
ويجري ترشيحها عبر مرشحة غشائية

كما يجري الغسل أيضا بمحلول الببتون المضاف له مادة معطلة لفعالية المضاد الحيوي
كإضافة البنسليناز إلى البنسلين والسيفالوسبورين

ثم تقسم المرشحة لقسمين متساويين يوضع احدهما في وسط ثيوغليكولات سائل
والأخر في وسط كازئين-صويا، ويجري أيضا اختبار شاهد

تحضن المستنبتات بدرجة الحرارة الموصوفة لمدة 7 أيام
(ثيوغليكولات 30 - 32 درجة مئوية)، (الكازئين-صويا 22 - 25 درجة مئوية)

النتيجة

إذا لم يلاحظ أي نمو ميكروبيولوجي في المستنبتات المختبرة تعد المادة مطابقة اما إذا لوحظ أي نمو فيعاد الاختبار ثانية، حيث ترفض المادة إذا تكررت مشاهدة النمو الميكروبيولوجي، أو تقبل المادة إذا لم يلاحظ نمو

إختبار الحد الميكروبيولوجي Microbial limit test

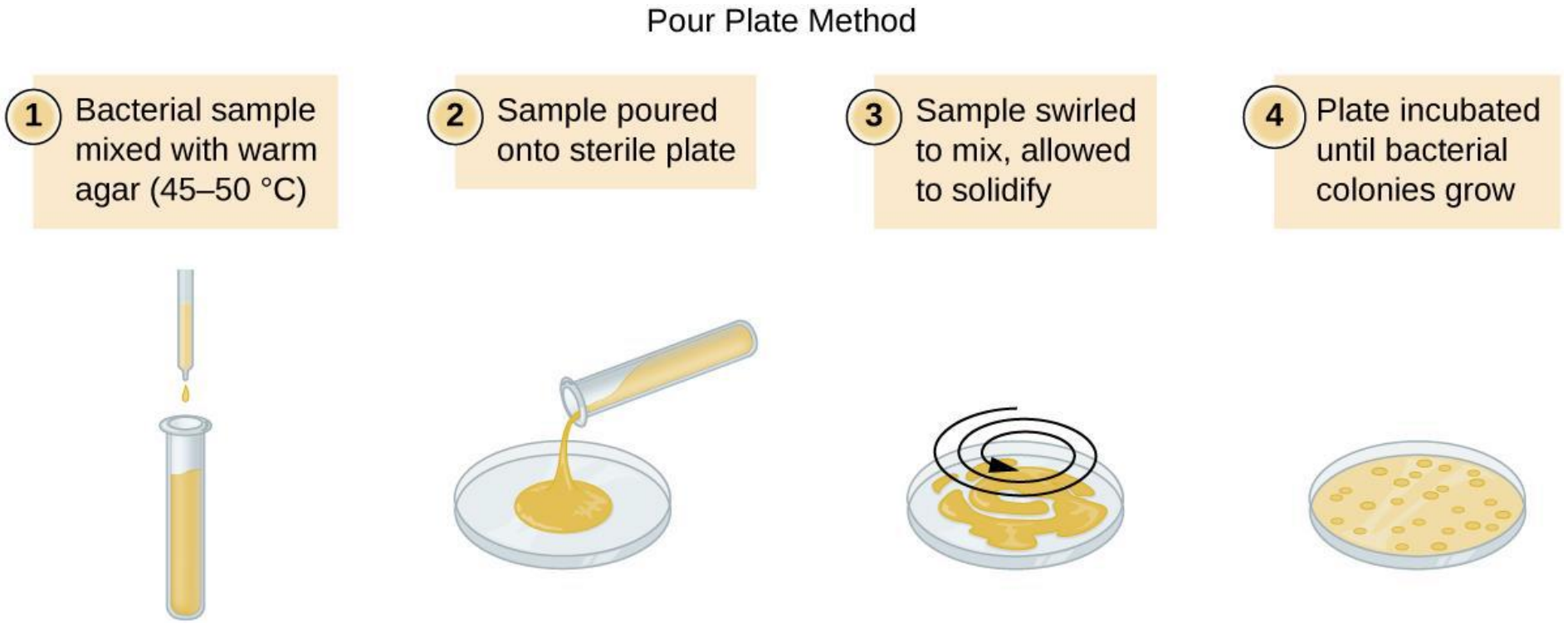
تعريفه : هو اختبار لتحديد العدد الكلي للبكتريا والفطور Total viable count (TVC)

لإجراء هذا الاختبار على المستحضرات الصيدلانية، تذاب المستحضرات ثم تمزج مع دارئة فوسفاتية Ph=7، أو تمدد بالماء المقطر العقيم أو بسائل الببتون العقيم، ويتم إجراء الاختبار بإحدى الطرق التالية:

أ- تقانة الصب بالأطباق pour plate technique:

تطبق في زرع المواد السائلة أو الصلبة ونصف الصلبة بعد إذابتها أو تعليقها في مذيب عقيم مناسب.

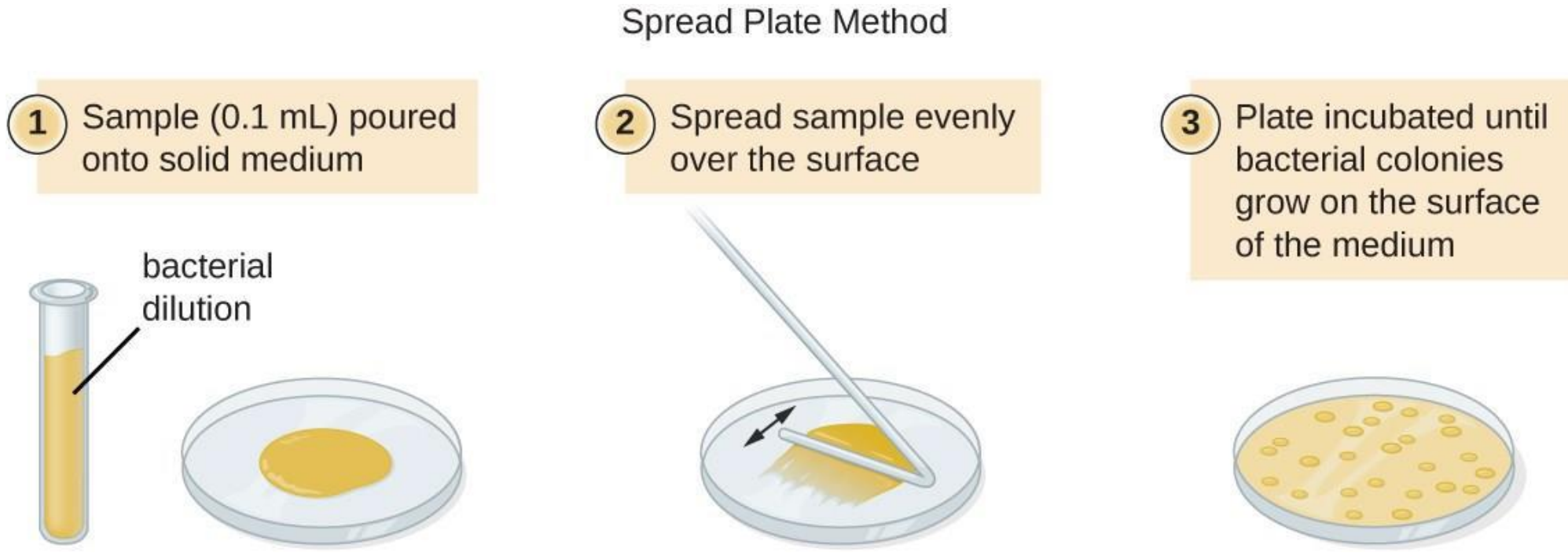
تؤخذ بواسطة ممص معقم عينة (حجم العينة 2-0.5 مل)، وتوضع في طبق بتري، ويصب فوقها المستنبت الصلب المصهور بعد تبريده لدرجة 40-45 مئوية، وتجانس العينة والمستنبت جيداً، ثم تترك الأطباق لتبرد وتتصلب، واخيراً تقلب وتحضن.



ب- تقانة الفرش على السطح Spread plate technique:

تطبق في زرع المواد السائلة أوالصلبة ونصف الصلبة، بعد إذابتها أو تعليقها في مذيب عقيم مناسب، ونستخدم فيها المستنبتات الصلبة مسبقاً في أطباق بتري.

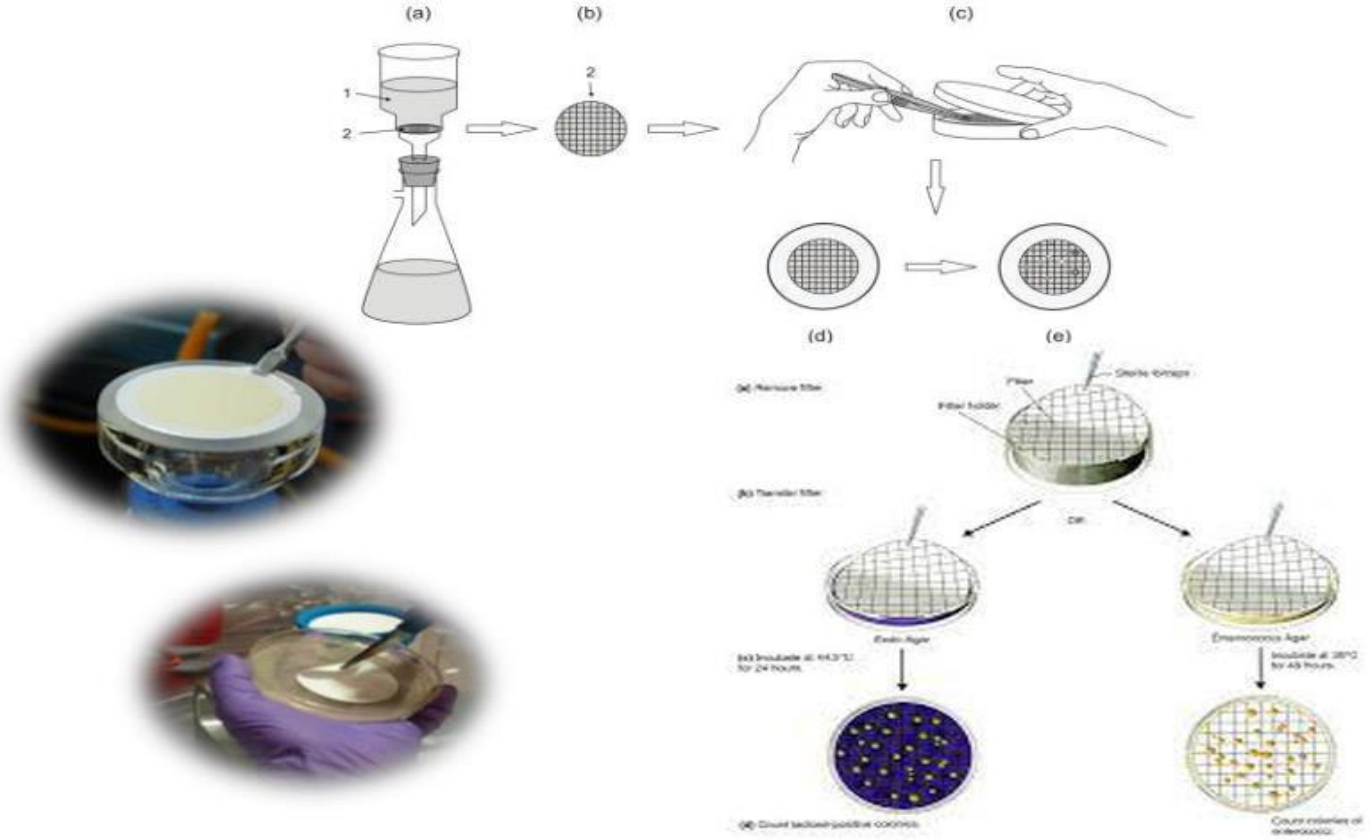
تؤخذ بواسطة ممص عقيم عينة محددة (حجم العينة 0.5-0.1 مل)، وتوضع على سطح المستنبت الصلب الموجود في الطبق، يوزع باستخدام أنبوب معقوف ثم يقلب ويحضن.



ج- تقانة الترشيح Filtration technique:

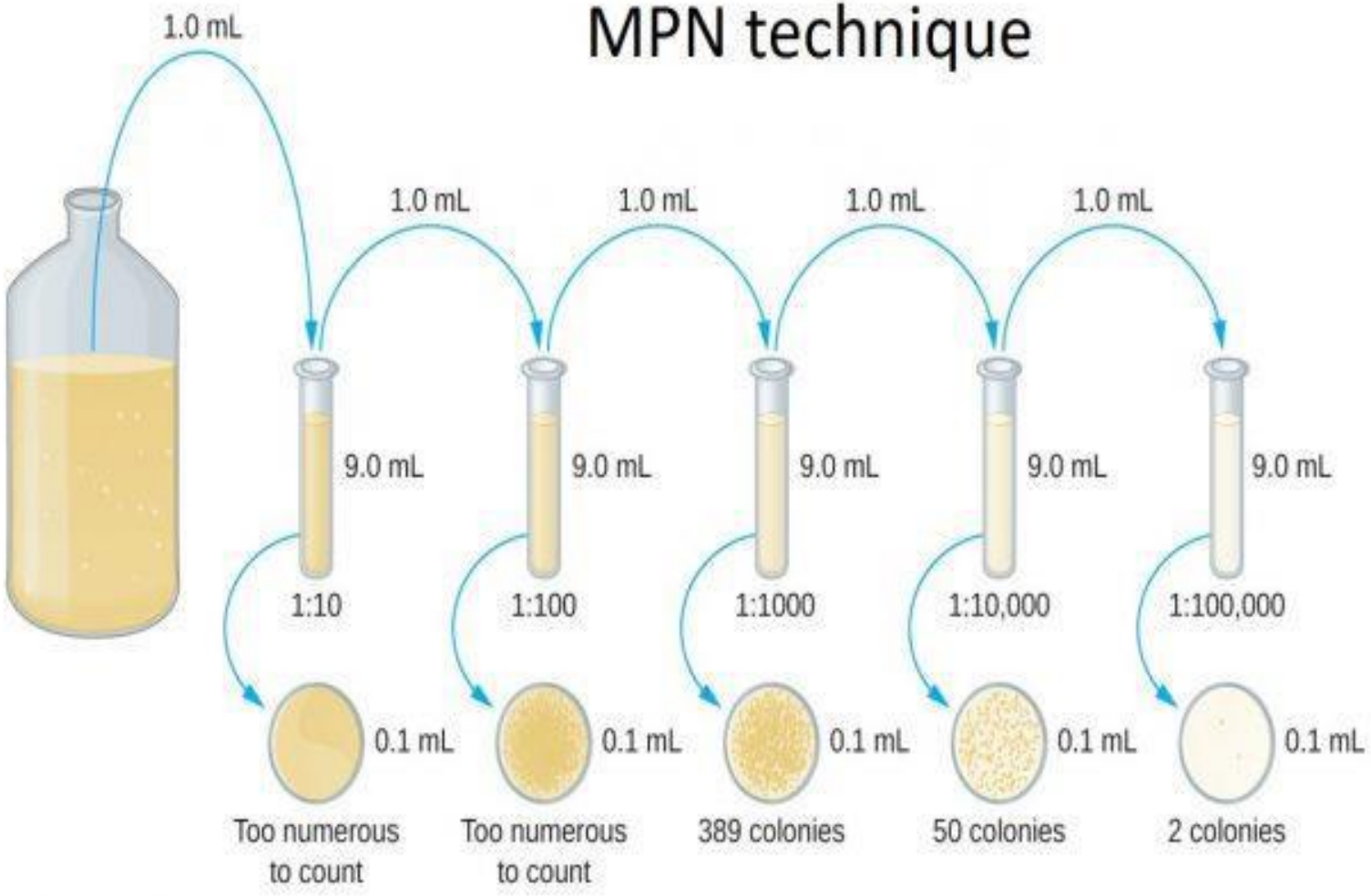
تطبق في زرع المواد السائلة أو الصلبة الذوابة في الماء بعد إذابتها في مذيب عقيم مناسب، ولاسيما في زرع الماء.

ترشح العينة باستخدام قمع خاص عبر مراشح ميكرونية (0.4 مكرومتر) بحيث يكون حجم العينة 50-100مل، وتوضع المرشحة على سطح طبق بتري مصبوب سابقاً، ثم تقلب وتحضن



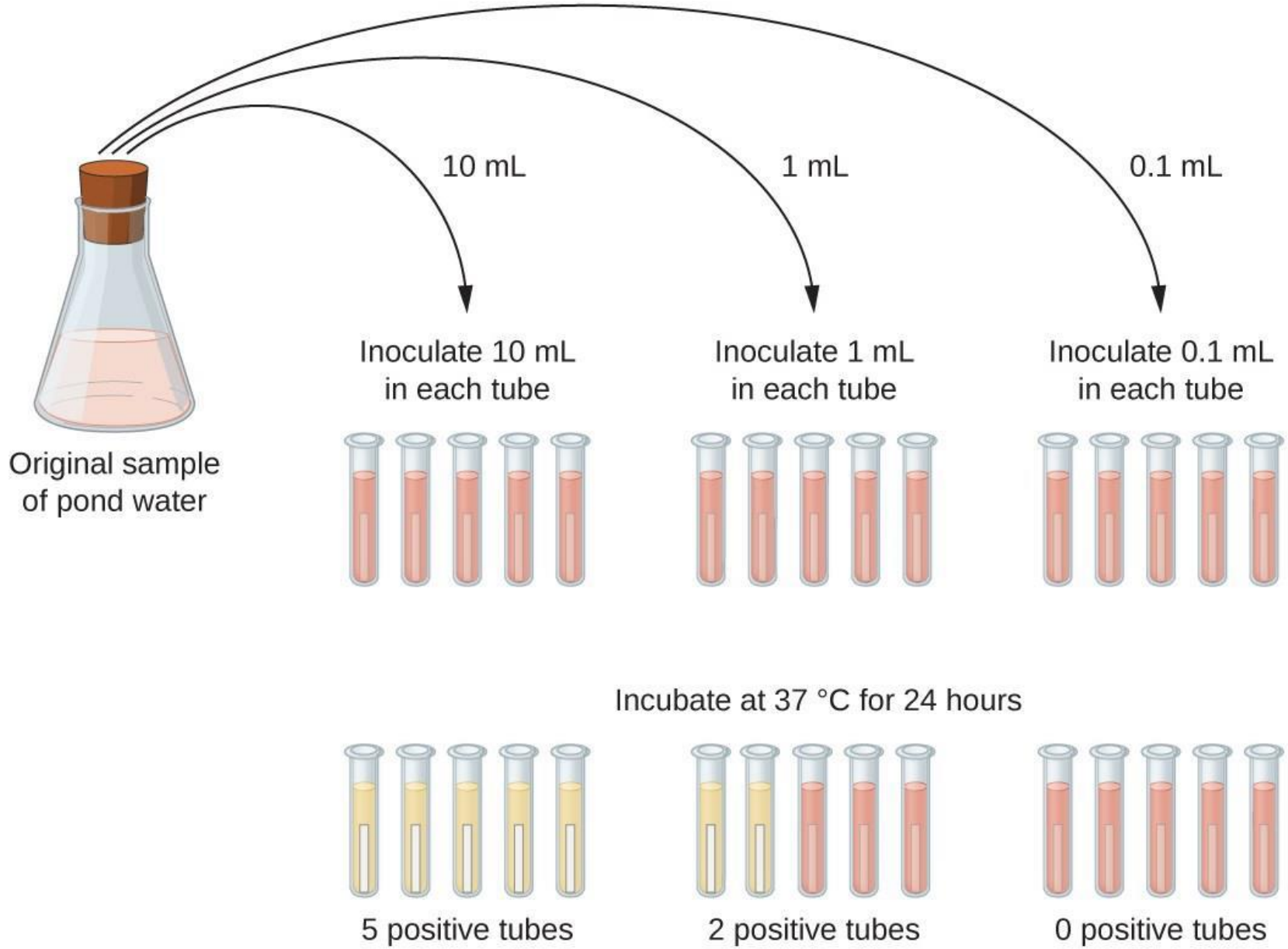
د- تقانة العدد الأكثر احتمالاً Most probable number technique:

في وسط سائل ويستخدم مقياس العكر.



تتم كما يلي:

يتم خلط السائل المفحوص مع الوسط الزرعي السائل بتمديدات مختلفة محددة مسبقاً، ثم تحضن الأنابيب بالفترة الموصوفة لمدة أيام على الأقل وفي درجة حرارة بين 30-35، ثم يلاحظ رقم الأنبوب الذي يظهر معه النمو المايكروبيولوجي .


10 mL
1 mL
0.1 mL
Original sample of pond water
Inoculate 10 mL in each tube
Inoculate 1 mL in each tube
Inoculate 0.1 mL in each tube
Incubate at 37 °C for 24 hours
5 positive tubes
2 positive tubes
0 positive tubes

❖ 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 درجة مئوية) في حال الجراثيم، ويصب في علبة بتري ثم يحضن الفترة المنصوص عنها، بينما يفرش حجم محدد من المستحضر المراد مباشرة على السطح الصلب في حال الفطريات والخمائر، ثم يحضن الفترة المنصوص عنها.

❖ ويستخدم عادة مستنبتان احدهما للجراثيم والأخر للفطريات، والمستنبتان هما:

-وسط تريبتون صويا آغار (Tryptone soya agar) لكشف وعد الجراثيم، يحضن مدة 48-72 ساعة بدرجة حرارة 30-35 مئوية.

- سابورو ديكستروز آغار Sabouraud dextrose agar: لكشف وعد الفطريات، يحضن مدة 5-7 أيام بدرجة 20-25 مئوية.

❖ عند الحصول على تعداد عالي من المستعمرات بشكل يمنع تحديد العدد بالدقة المطلوبة يلجأ للتمديد بأخذ 1 مل من السائل ويمدد أيضاً ل 100 مل بالماء العقيم، أو بسائل الببتون العقيم.

❖ هنا أيضاً يجب إجراء شواهد معيارية من المستنبتات الزرعية تماماً كما في اختبار العقامة.

يجري حساب العدد الميكروبي بتطبيق القانون:

$$y/x.n$$

حيث: y: مجموع عدد المستعمرات في كل علبة من علب البتري.

x: عدد علب البتري.

n: نسبة التمديد.

اختبارات غياب بعض الميكروبات النوعية (الممرضة)
Tests foe absence specified microorganisms

- تطبق اختبارات غياب بعض الميكروبات الممرضة تبعاً لنوع المستحضر الصيدلاني:

فالمستحضرات ذات المنشأ الحيواني أو النباتي

- يتحرى فيها عن نواع السلمونيلا
- Salmonella species

اما المحاليل والمستعلقات الفموية

- فيتحرى فيها عن الإيشريكيات القولونية
- Escherichia coli

وبالنسبة إلى المستحضرات الموضعية

- يتحرى عن وجود العنقوديات الذهبية
- Staphylococcus aureus .
- أو الزوائف الزنجارية
- Pseudomonas aeruginosa

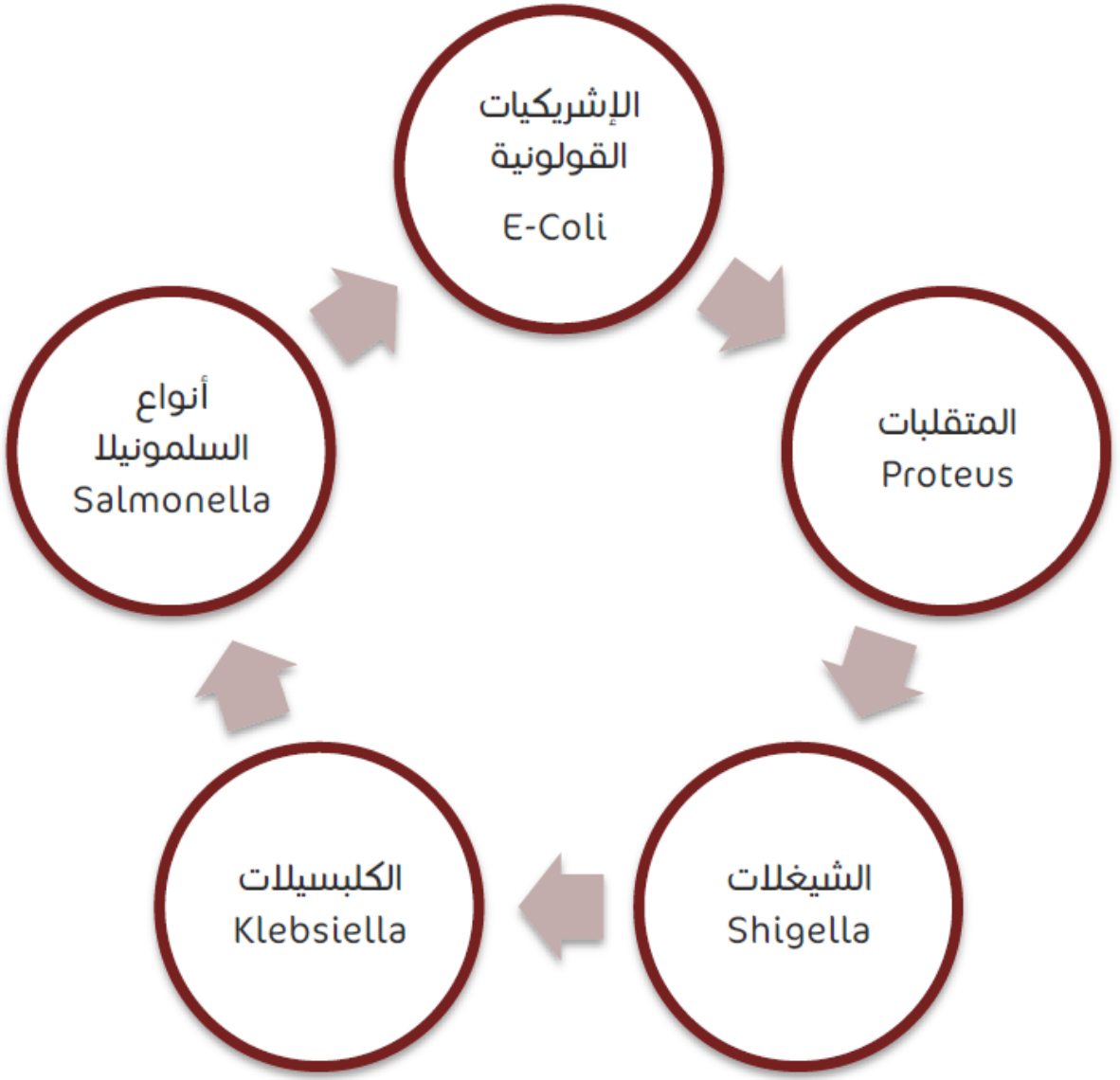
المستحضرات الصيدلانية المعدة للاستعمال الشرجي أو المهبلي

- يتحرى فيها عن
- وجود الخمائر
- والفطريات

❖ لإجراء الكشف عن هذه الميكروبات هناك مستنبتات زرعية خاصة انتقائية تحددها دساتير الأدوية، التي تساعد على نمو ميكروبات نوعية، وذلك من خلال إضافة مواد مساعدة لنموها وأخرى مثبطة لنمو الأنواع الأخرى، للحصول على نتيجة دقيقة يجب تكثير الميكروبات باستخدام مستنبتات إغناء خاصة enrichment media.

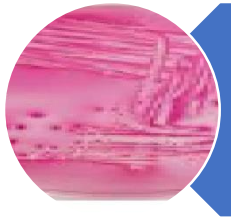
❖ كما تضاف الوقاءات إلى الأوساط للجم الحموضة الناشئة عن العمليات الاستقلابية للسكاكر التي تضاف إلى الأوساط على نحو خاص.

1- الإمعائيات Enterobacteriaceae

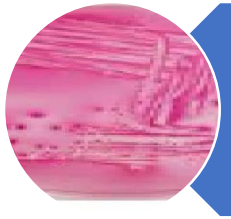


- يتم التكثير على وسط من المرق المغذي Broth medium.
- بعد ذلك يتم النقل إلى مستنبت خلوي يحوي مثلاً الأغار والغلوكوز واللاكتوز، البنفسجية المبلورة crystal violet، أملاح صفراوية Bile salts، الأخضر اللماع Brilliant green التي يفيد وجودها في تثبيط نمو الجراثيم إيجابية الغرام المرافقة.
- أو يتم النقل إلى مستنبتات انتقائية سائلة لإغناء الجراثيم، وهي عبارة عن سائل مدروء (موقّى) من الغلوكوز، يفيد وجود الدارئة في تجنّب انخفاض ال pH الناتج عن استقلاب الغلوكوز.

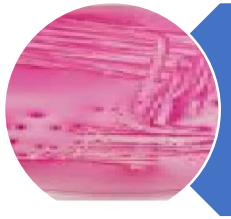
Escherichia coli



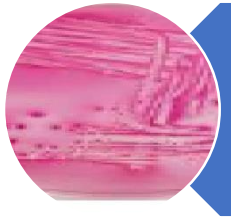
يتم التكثير على مستنبت لاكتوز مع مرق اللحم



يتم التكثير الإضافي على وسط ماكونكي مع
مرق اللحم السائل



بعد ذلك يتم الزرع على مستنبت ماكونكي
الصلب



ظهور مستعمرات حمراء قرمزية غير مخاطية
Won –mucoidأو تلون زهري هو دليل إيجابي

- يحدث التلوّن من جراء الاستقلاب الخمائري لسكّر اللاكتوز متحولاً إلى حمض، وهذا يؤدي إلى تحوّل قيمة ال pH مما يؤدي إلى انقلاب لون المشعر إلى الأحمر.
- هناك مستنبتات أخرى معروفة في دساتير الأدوية مثل وسط EMB agar ووسط Tergitol agar

نفي وجود أنواع السالمونيلا:

- يتم إغناء الجراثيم في مستنبت سائل مدروء من الغلوكوز أو اللاكتوز مع مرق اللحم.
- ثم تضاف إلى وسط سيلينيت سائل Fluid selenite مع اللاكتوز ومستنب تيتراتيونات tetrathionate سائل مع أملاح صفراوية وأخضر لماع.
- تؤخذ لقيحة inoculum وتفرش على السطح أو تُحقَن ضمن مستنبت من الأغار والسيترات والديوكسي كولات deoxycholate مع مستنبت من الأغار والسكروز واللاكتوز وأحمر الفينول والأخضر اللماع (ويدعى هذا المستنبت مستنبت XLD).
- يُفحص وجود السالمونيلا عادة عند استخدام مواد مساعدة من أصل حيواني.

العنقوديات الذهبية:

يطلب كشف وجود هذه الجراثيم في المستحضرات المطبّقة موضعياً.

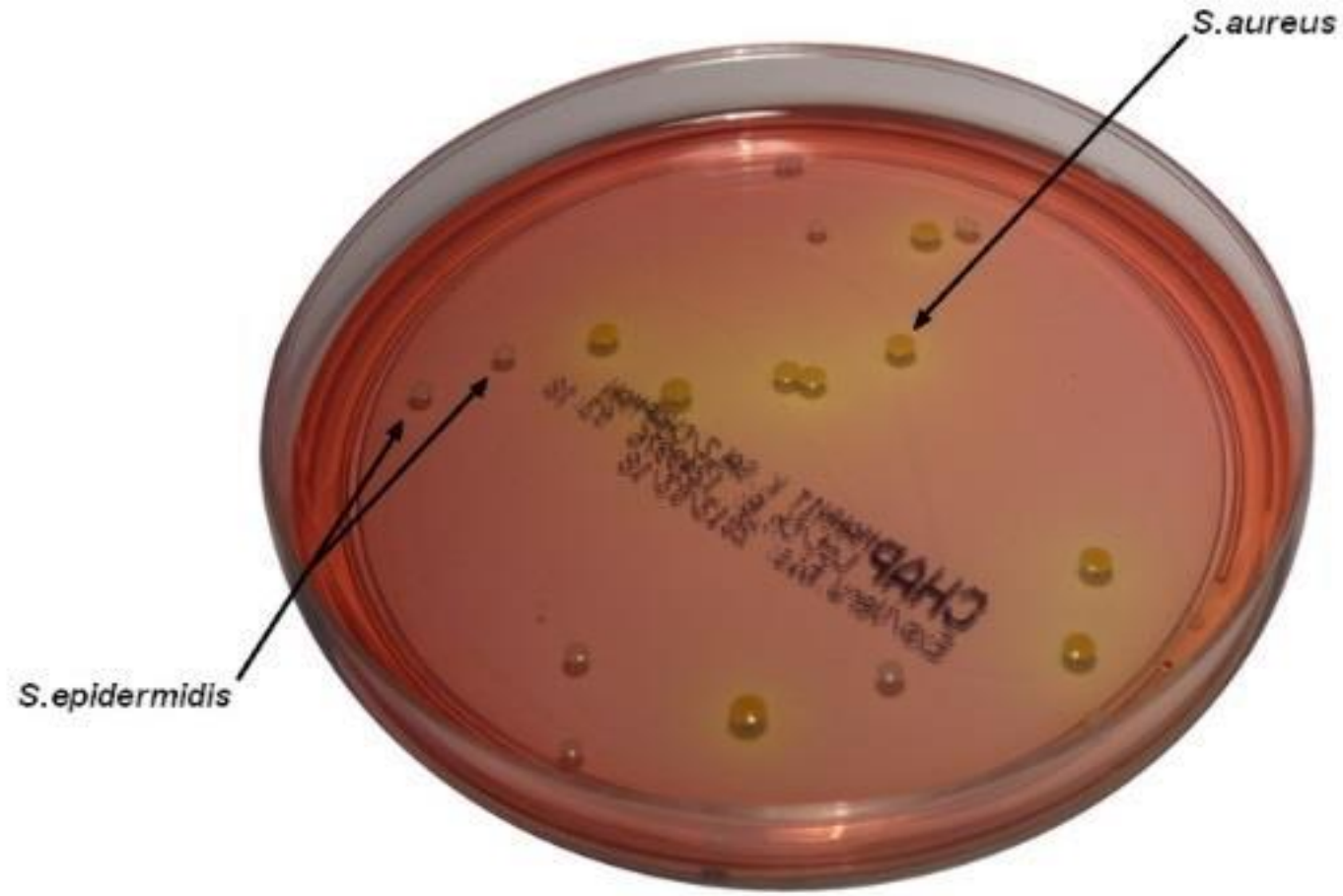
1) يتم تكثيرها على مستنبت التريبتون صويا السائل.

2) بعد ذلك تزرع على مستنبت من الأغار وملح الطعام والمانيتول MSA.

3) يكون الكشف إيجابياً عند ظهور مستعمرات إيجابية الغرام وحول محيطها لون مشعر أحمر الفينول الأصفر متحوّلاً من لونه الأصلي الأحمر.

- ملح الطعام له دور انتقائي لنمو العنقوديات لأنها جراثيم محبة للملوحة تتحمل تراكيز عالية منه تصل إلى 75 %، بينما لا تستطيع الأنواع الأخرى النمو بوجود هذه النسبة من الملح.
- سبب اختلاف لون المشعر هو تخمير المانيتول الذي تقوم به العنقوديات الممرضة، الذي يؤدي إلى انخفاض في قيمة pH الوسط ثم تغير اللون.

www.microbiologyinpictures.com ©



Mannitol Salt Agar

H.m.N.

يمكن استخدام مستنبت فوغل جونسون Vogel johnson أو مستنبت بيرد باركر baird parker agar أغار اللذين يحتويان مادة تيلوريت البوتاسيوم potassium tellurate التي يجري إرجاعها بواسطة العنقوديات الممرضة، وهذا يؤدي إلى تشكّل راسب أسود، وبالتالي تظهر المستعمرات بلون أسود، كما أن لهذه المادة دوراً في تثبيط الميكروبات المرافقة

الزوائف الزنجارية:

يطلب فحص وجود هذه الجراثيم في الأشكال الموضعية.

يتم التكثير على مستنبت تريبتون صويا السائل.

↓

يتم الكشف على وسط السيترامايد أغار Cetrimide agar بتركيز 0.3% .

↓

يمكن إضافة حمض النالديكسيك Naldixic acid مع السيترامايد بتركيز محدد 0.1% .

↓

تظهر المستعمرات للزوائف الزنجارية برائحة كريهة ولون أخضر.

طرق كشف أخرى :

تعطي مستعمرات هذه الجراثيم لوناً أزرق عند تألّقها بالأشعة فوق البنفسجية.

كما تُعرف هذه الجراثيم أيضاً من تلوّنها بالأزرق الشديد عند إضافة كاشف

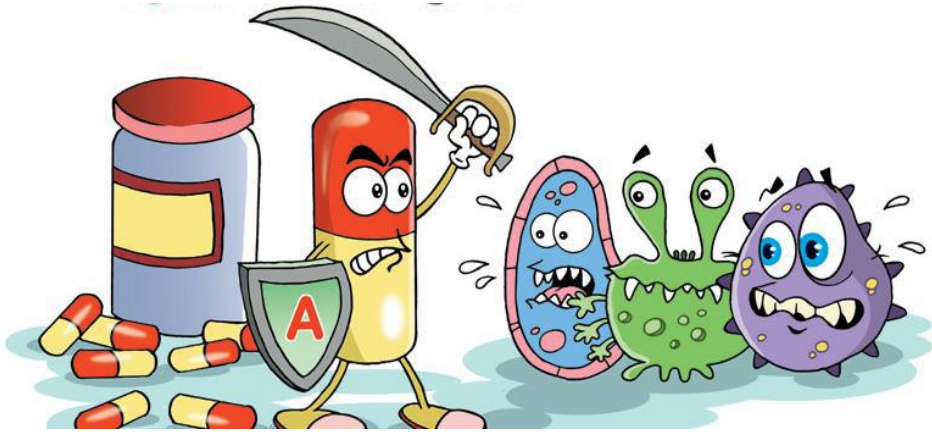
فينيلين دي أمين دي كلوريد.

المفطورات (الميكوبلازما) :

- هي أصغر الميكروبات، وهي أحياء دقيقة وسطى بين الجراثيم والفيروسات.
- يمكن اعتبارها جراثيم وهي لا تمتلك جداراً خلوياً، وترشح من مرشحة شامبرلاين، ولها القدرة على الحياة ضمن شروط مناسبة في المستحضرات الحيوية كاللقاحات الفيروسية المحضّرة من النسج الحيوانية أو المستنبتات الخلوية.
- النوع الوحيد الممرض للإنسان هو المفطورات الرئوية.

✓ يستخدم لاختبارها مستنبت خاص مكوّن من رئة جنين الدجاج، أو مستنبت غني بالمصل يحوي على بينيسلين صودي لمنع نمو الجراثيم المرافقة، فهي مقاومة للبينيسلين.

✓ يستمر الحضن 15 يوماً مع وضع 50% من المستنبتات في شروط حضن لا هوائية و 50% منها في شروط حضن هوائية وبدرجة حرارة 35-37 لأن بعض أنواعها هوائية مجبرة، وبعضها الآخر لا هوائية مجبرة أو مخيّرة.



✓ أما إثبات وجودها الفعلي فيكون مجهرياً.

المقايسات البيولوجية واختبارات الفعالية Biological assays and Potency tests

المقايسات المايكروبيولوجية للصادات الحيوية

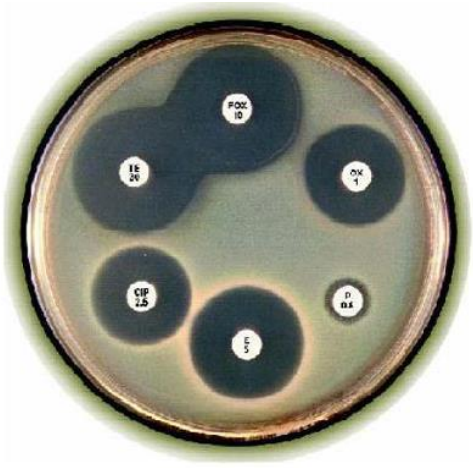
يعبر عن فعالية Potency المضاد الحيوي على شكل نسبة بين التركيز المثبط inhibition growth ميكروبات حساسة لهذا المضاد الحيوي وبين التركيز نفسه المادة المرجعية Reference Standard.

تتم المقايسة بإحدى الطريقتين:

على وسط صلب بطريقة الانتشار:

(وتتم فيها المقايسة إما بتقانة الثقب أو تقانة الأسطوانة).

- حيث تظهر فاعلية الصاد الحيوي بشكل بقع صدء في وسط صلب، ويتم ذلك في أطباق أسطوانية أو معايرات في الأطباق .
- يتم قياس مدى تثبيط النمو لعضوية دقيقة محددة في وسط من الآغار المتصلّب بوجود الصاد الحيوي المختبر، ويجري اختيار شروط الاختبار بحيث تنشأ علاقة شبه خطّية بين قطر بقعة الصد واللوغاريتم الأصغري لتركيز الصاد الحيوي المفحوص، تتم مقارنة قطر بقعة الصد مع معياري، ويقاس القطر بالمسطرة.



على وسط سائل بطريقة مقياس العكر:

حيث يلاحظ تناقص العكر أو توقفه في الوسط باستخدام مقياس العكر.

الأوساط الصلبة:

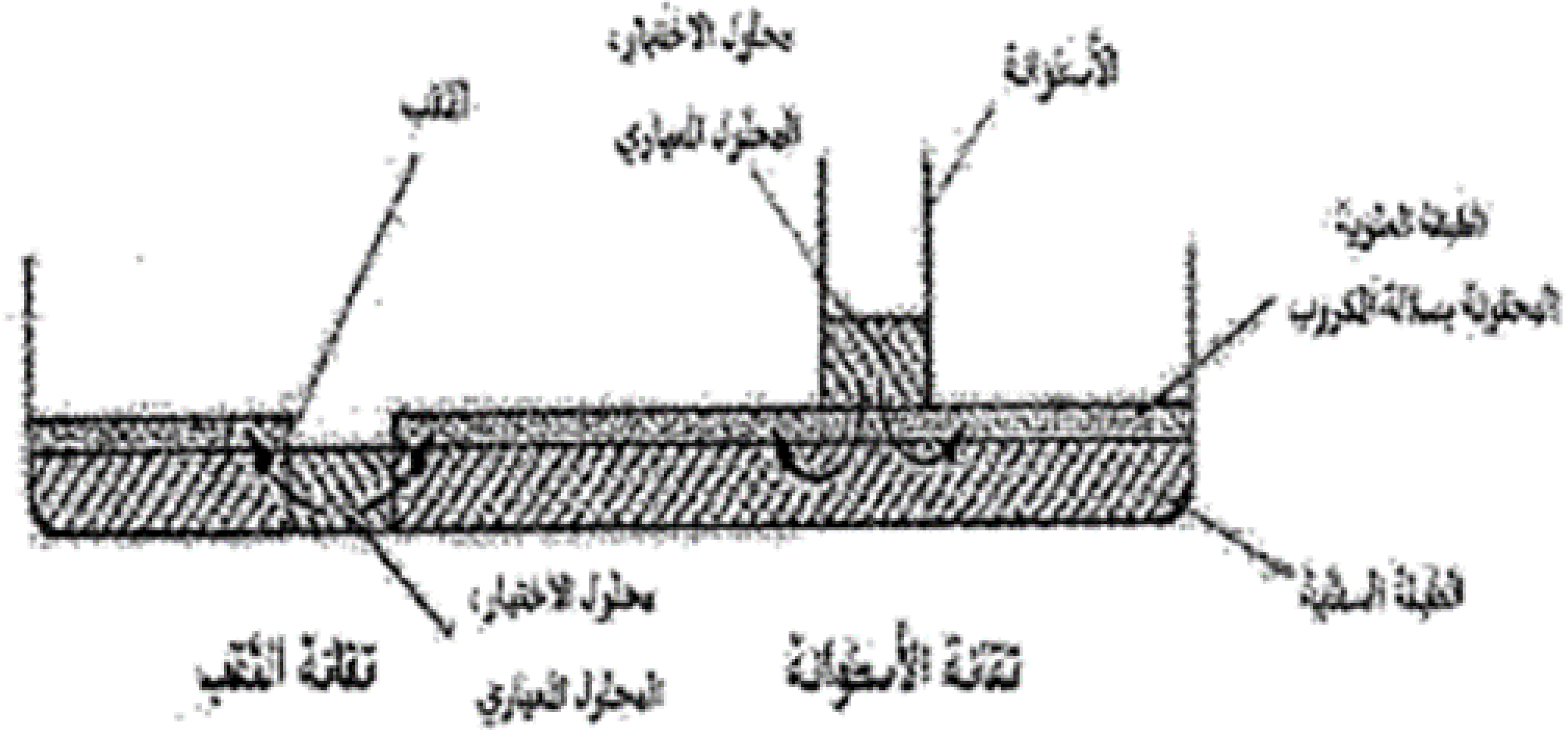
طريقتين: يتم الاختبار على طبقة أغار وحيدة أو طبقة مضاعفة.

1- طريقة الطبقة المضاعفة:

تكون الطبقة العلوية محقونة بالجراثيم والسفلية محتوية على وسط مغذّ فقط، حيث يشكِّل فيها ثقب يوضع فيه محلول الصاد الحيوي الذي ينتشر أفقياً (تقانة الثقب).

2- طريقة الطبقة الوحيدة:

حيث يتم وضع أسطوانة من الستانلس ستيل فوق الطبقة، وتملأ هذه الأسطوانة بمحلول الصاد الحيوي الذي يخرج منها بالانتشار (تقانة الأسطوانة).


محلول الاختبار
الأسطوانة
القلب
المحلول المعياري
الطبقة العلوية
المحفورة بسالة الكروم
الطبقة السفلية
محلول الاختبار
المحلول المعياري
تقانة القلب
تقانة الأسطوانة

معايرة الفاعلية الفيتامينية مايكروبيولوجيا

- المبدأ: لا تنمو الجراثيم نمواً طبيعياً إلا بوجود فيتامينات معينة، فتطلب بعض دساتير الأدوية مقايسة فاعلية بعض الفيتامينات على هذا المبدأ.
- طريقة اجراء الاختبار:

الفاعلية الفيتامينية	تزرع جراثيم معينة على وسط خاص يبعد عنه الفيتامين المراد مقايسته والمهم لنمو هذه الجراثيم.
الفاعلية الفيتامينية	تضاف المادة المعيارية والمادة المراد مقايستها بتراكيز مختلفة إلى المستنبتات الحاوية على الذرية الميكروبية المحددة .
الفاعلية الفيتامينية	تجري المقايسة كما في معايرة المضادات الحيوية بالمقارنة مع معياري من الفيتامين المفحوص بمقياس العكر، ومعيار الفاعلية الفيتامينية هو شدة نمو الميكروب.

يحدد دستور الأدوية معايرات مايكروبيولوجية لعدد من الفيتامينات مثل (بانتوثينات الكالسيوم – الفيتامين (B12)هذا لا ينطبق على جميع الأشكال الصيدلانية بل على بعضها الذي يحوي كميات قليلة من هذه المركبات).

Biological assays

تشمل طرائق كيميائية حيوية أو مناعية كيميائية لتعيين فعالية المادة المراد اختبارها أو مستحضراتها الدوائية عندما لا يمكن اختبارها كيميائياً أو فيزيائياً لسبب ما، نورد فيما يلي بعض الأمثلة الدستورية:

المقايسة البيولوجية لفيتامين D المضاد للرخد (الكساح)

Biological assay of antirachitic Vitamin D

تحدد فعالية الفيتامين D المضاد للرخد مقارنة مع الفعالية المضادة للرخد لمعياري من Cholecalcifrol، أو لمستحضر جرى تحديد فعاليته مسبقاً مقابل المعياري وذلك ضمن شروط مناسبة للمقايسة.

كيفية إجراء الاختبار :

يستخدم عدد من الجرذان ذات مواصفات خاصة، بعد أن يجري قطعها عن الرضاعة، وتخضع لنظام غذائي مسبب للكساح يستمر نحو 3 أسابيع.

- ثم يحدد تطور الدرجة المقابلة من الكساح عند كل جرذ بأخذ صورة شعاعية X-ray للنهايات المحوية لعظم الساق الأكبر، أو النهايات البعيدة لعظم الزند Cubitus وعظم الكعبرة Radius .
- يتم إعطاؤها جرعة كاملة (إذا أعطيت مرة واحدة)، أو إعطاء جرعات متفرقة من المستحضر العياري ل Vit D أو المراد مقايسته
- تقتل الجرذان
- تقدر النسبة التي تشفي فيها الكساح بوساطة صورة شعاعية X-ray
- تحسب نتائج المقايسة بطرائق إحصائية

✓يعتبر Vit D المراد مقايسته فعالاً إذا أعطى نسبة شفاء أكبر من المعياري المستخدم

المقايسات البيولوجية للهرمونات Hormones bioassays

- ❖ يقوم مبدأ هذا النوع من المعايرات على مقارنة فاعلية الهرمون المفحوص على أعضاء حيوية سواء مباشرة في حيوانات التجربة أو في أعضاء حيوية معزولة.
- ❖ تجري المعايرة من خلال معرفة زيادة كتلة العضو الذي يستقر فيه الهرمون أو زيادة حجمه أو من خلال تأثيره في وظائف العضوية كسكر الدم أو الضغط الدموي.
- ❖ من الهرمونات المعايرة بهذه الطريقة الإنسولين وهرمون النمو والغلوكاغون، وقد استعاضت أغلب دساتير الأدوية الحديثة مقايسة هذه الهرمونات بيولوجيا باستخدام HPLC

معايرة الإنسولين

- تتم هذه المعايرة بحقن الإنسولين في الأرنب وملاحظة التأثير الخافض لسكّر الدم مقارنة بعياري.
- يستخدم 24 أرنباً وزن كل منها لا يقل عن 1.8كغ، خاضعاً لنظام غذائي قبل إجراء التجربة، وتمنع إثارتها قبل التجربة (لأنه يؤثرعلى مستويات سكر الدم لديها)، وتقسم إلى مجموعات.
- تعطى جرعات بتراكيز معينة تحت الجلد لكل مجموعة، وتُجرى تقاطعات بين الأرانب (أي الأرنب الذي أعطي تراكيز عالية اليوم يعطى تراكيزاً أخفض غداً).

الاختبارات البيولوجية Biological test

اختبار المادة المسببة للإعياء أو الهمود:

المادة المسببة للإعياء هي مادة تميل إلى إنقاص النشاط لدى الإنسان (فيدعى اختبار المواد المشابهة للهيستامين)، أو إنقاص ضغط الدم (فتدعى المواد المخمدة للأوعية).

- يجري هذا الاختبار على قطط ذات مواصفات دستورية محددة:

مواصفات القطط المستخدمة :

يجب أن تكون بالغة إما ذكور ، أو إناث غير حامل.

حيث يجري تخدير القطة وكشف شريانها السباتي ثم إدخال مسبار فيه موصول إلى جهاز قياس ضغط الدم.

ثم يكشف بعد ذلك الوريد الفخذي ويُحقَن بالهيستامين المعياري0.1 مكغ/كغ، ويتم تحديد انخفاض ضغط الدم الحاصل.

بعد ذلك يحقن محلول الفحص بالتناوب مع العياري.

✓يقبل محلول الفحص إذا كان نقص ضغط الدم الحاصل في المحلول المفحوص أقل من المعياري.

اختبار مولّدات الحمى (البيروجينات أو الإندوتوكسينات)

البيروجينات: هي أشلاء جرثومية تأتي غالباً بعد عملية التعقيم، وبالتالي فإنه عند تعقيم مستحضر يحوي عدداً عالياً من الجراثيم فإن هذا يسبب زيادة في البيروجينات المتشكلة.

يطبق دستور الأدوية الألماني اختبار مولدات الحمى على أرانب :

توضع الحيوانات في الصناديق لمدة ساعة قبل الاختبار وتبقى فيه حتى انتهاء الاختبار.

* قبل اختبار المستحضر بثلاثة أيام يجرى اختبار تمهيدي ينطوي على حقن الأرانب

وريدياً ب 10مل من محلول معادل للتوتر من كلوريد الصوديوم لكل 1كغ من وزن الأرنب، ويستبعد الحيوان الذي يبدي أي تغيّر في درجة الحرارة العليا حتى 0.6 درجة مئوية.

يمنع الغذاء والماء عن الأرانب خلال الليلة السابقة للاختبار حتى نهاية الاختبار.

في الاختبار النهائي: تقاس درجة الحرارة لكل أرنب بعد الحقن بفترات محددة:

60 ثم 90 ثم 120 ثم 180 دقيقة، وتسجّل النتائج وتقارن مع المعطيات الدستورية.

تستبعد من الأرانب التي تظهر تغيراً في درجة الحرارة يتجاوز0.2 بين قراءتين متعاقبتين.

الذيفانات الداخلية الجرثومية (اختبار حلالة سرطعان نعل الفرس LAL Test) :

Limulus: وهو أحد أجناس السلطعون.

Amebocyte: أي خلايا أميبية الشكل، وهي خلايا دم مأخوذة من الحيوان، وهي الخلايا التي ستشتق منها المادة الفعّالة لهذا الاختبار.

Lysate: وتعني الحلالة أي محضّر لخلايا منحلّة، ويتم الحصول عليها بفصل الخلايا الأميبية الشكل من البلازما ثم حلّها.

طُوّر هذا الاختبار في ستينات القرن الماضي من قبل الدكتورين بانغ وليفين، وهو يقوم على تفاعل تخثّر (تحوصب) لدم سرطان نعل الفرس مع الإندوتوكسينات إذ تحوي خلاصة خلايا هذا الحيوان المائي إنزيماً وبروتينات قابلة للتخثر بوجد مستويات منخفضة من عديد السكاريد الشحمي في البيروجينات.

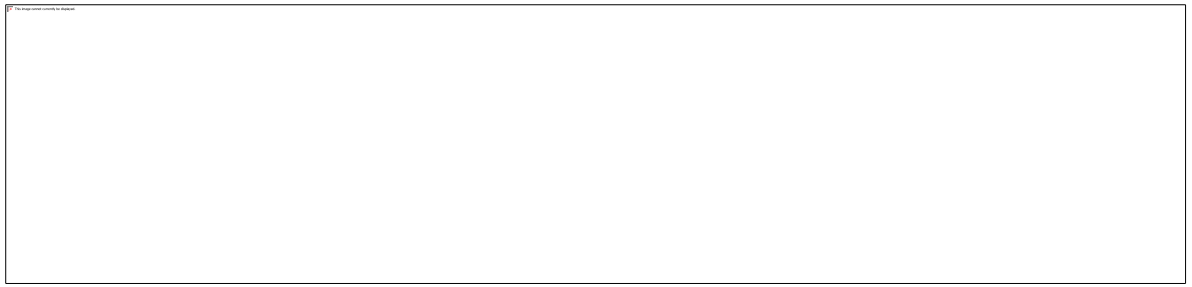
✓ هذا الاختبار أسرع، أكثر اقتصادية، وأكثر حساسية من اختبار الأرانب.

وهناك تقانات لهذا الاختبار:

1– خثر الهلام Gel clot تقوم على تشكيل الهلام.

2– قياس العكر الحاصل Turbidimetric، تقوم على تطور عكر بعد انشطار ركيزة داخلية النمو.

3– مولد الصبغ : Colorimetric تقوم على تطور لون بعد تفكك معقد صنعي بين الببتيد ومولد الصبغ.



Thank You!