كلية: الصيدلة	مقرر: مراقبة الأدوية
الرمز:PHCC927	مدرس المقرر: باسمة عروس

جامعة الشام الخاصة
كلية الصيدلة

المراقبة الدوائية

الجزء النظري

المحاضرة الحادية عشرة

المراقبة المكروبيولوجية للمستحضرات الصيدلانية

د. باسمة عروس

العام الدراسي 2023-2024

Microbiological Quality Control of Pharmaceutical Preparations

- ❑ **العضويات الدقيقة في كل مكان.**
- ❑ **الانجازات العلمية.**
- ❑ **المحاليل الحقنية وأخطارالتلوث.**
- ❑ **حوادث مختلفة في العالم.**
- ❑ **التوصيات المختلفة GMP وIPC.**
- ❑ **هيئة التفتيش الصيدلاني PIC.**

تلوث المستحضرات الصيدلانية بالمكروبات

1- المخاطر الناجمة عن تلوث الأشكال الصيدلانية ميكروبيولوجياً

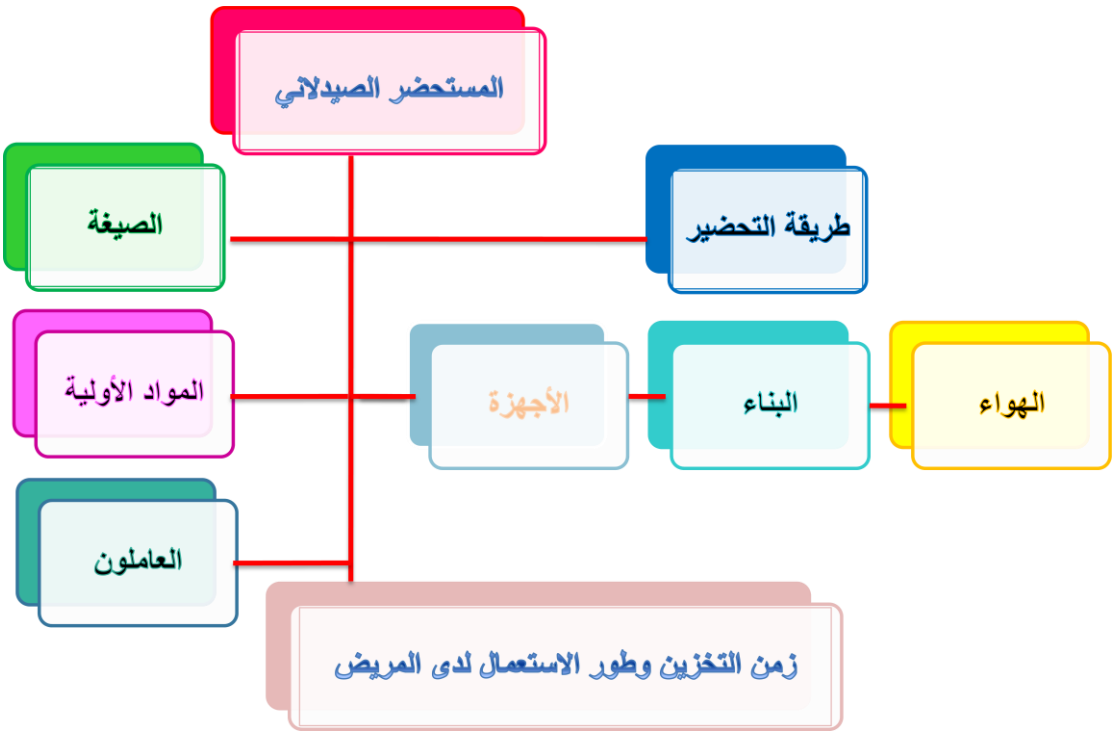
- على المريض: انتانات مختلفة، حالات تحسسية.
- على المستحضرالصيدلاني:

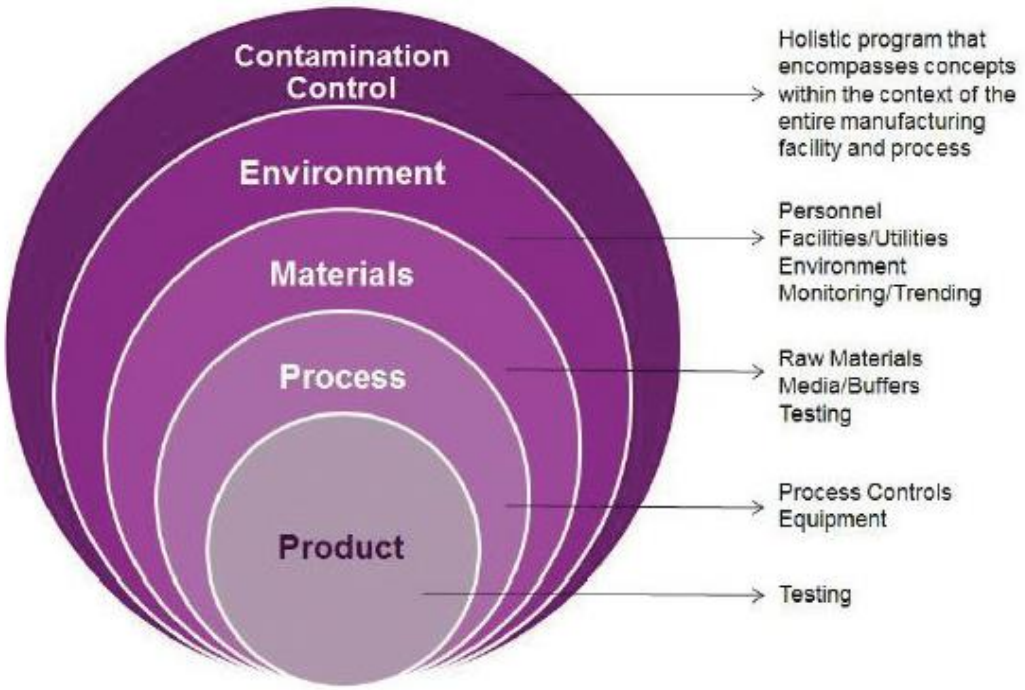
- تخرب كيميائي.
- تغير pH.
- تخرب فيزيائي.

* 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 المكروبيولوجية للمستحضرات الصيدلانية
Microbiological Tests for Pharmaceutical preparations

- عدم توحد الاتفاقيات بشأن العدد المكروبيولوجي.
- 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 فِي 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:
  - الإيشيريكيات القولونية Escherichia coli
  - العنقوديات الذهبية Staphylococcus Aureus
  - أنواع السلمونيلا Salmonella Species
  - الزوائف الزنجارية Pseudomonas Aeruginosa

- التعداد العام للمكروبات الهوائية أو للخمائر والعفنات:

هو عدد المستعمرات Colonies النامية على المستنبتات Culture Media الصلبة فِي الغرام أو الميلليتر من المادة أو المستحضر الصيدلاني.

- **عدم ظهور أي مستعمرة في اختبار التعداد العام لا يعني أن المستحضر الصيدلاني عقيم لاختلاف طريقة الزرع.**
- تعتمد الاختبارات المكروبيولوجية بشكل عام على الزرع باستخدام مستنبتات خاصة، ثم يجري الكشف عن تلوث المستحضرات الصيدلانية وعد المستعمرات بالعين المجردة أو بوسائل بسيطة.
- يترافق التلوث المكروبيولوجي 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 اللصوقات الجلدية.

والحدود المسموحة هي:

- العدد الإجمالي من المكروبات الهوائية: ليس أكثر من 10^2 مكروبات (جراثيم هوائية وفطريات) لكل غرام أو ميلليتر من المستحضر الصيدلاني أو في لصاقة واحدة.
- اللصوقات 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 ميلليتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- الخلو من الزوائف الزنجارية في غرام واحد أو ميلليتر واحد من المستحضر الصيدلاني أو لصاقة.
- الخلو من العنقوديات الذهبية في غرام واحد أو ميلليتر 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 ميلليتر 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 و10^2 فطريات في غرام واحد أو ميلليتر واحد، وليس أكثر من 10^2 إمعائيات وبعض الجراثيم سلبية الغرام.
- الخلو من أنواع السلمونيلا في غرام واحد أو ميلليتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- الخلو من الإيشيريكيات القولونية في غرام واحد أو ميلليتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- الخلو من العنقوديات الذهبية في غرام واحد أو ميلليتر 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 و10^5 فطريات في غرام واحد أو ميلليتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- ليس أكثر من 10^2 إيشيريكيات قولونية في غرام واحد أو ميلليتر 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 و10^4 فطريات في غرام واحد أو ميلليتر واحد من المستحضر الصيدلاني.
- ليس أكثر من 10^3 إمعائيات وبعض الجراثيم سلبية الغرام في غرام واحد أو ميلليتر 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 الحضن الهوائي بدرجة حرارة (2.5±32.5)°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 الآغار ومادة Resazurin Sodium.

3- وسط Soyabean- Casein Digest بدرجة حرارة (22.5 ± 2.5)C° لكشف الفطريات والجراثيم الهوائية، بحيث تكون فترة الحضانة لجميع المستنبتات 14 يوم.

❑ طريقة الترشيح الغشائي Membrane Filtration Method:

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

- ترشح العينة على مرشحة عقيمة.
- تقسم المرشحة إلى قسمين ويزرع كل قسم على أحد المستنبتات.
- بعد فترة الحضن 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 المكروبات، 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:** يجرى 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 أوحاويات دون مستحضر على شكل شواهد سلبية أثناء إجراء اختبار العقامة للعينات المفحوصة.
  - **تحفيز النمو:** يجرى على كل وجبة أو تحضيرة من المستنبت الجاهز، وذلك بتطعيم عدة عبوات من المستنبت بشكل منفصل بنوع من أنواع المكروبات التالية:

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

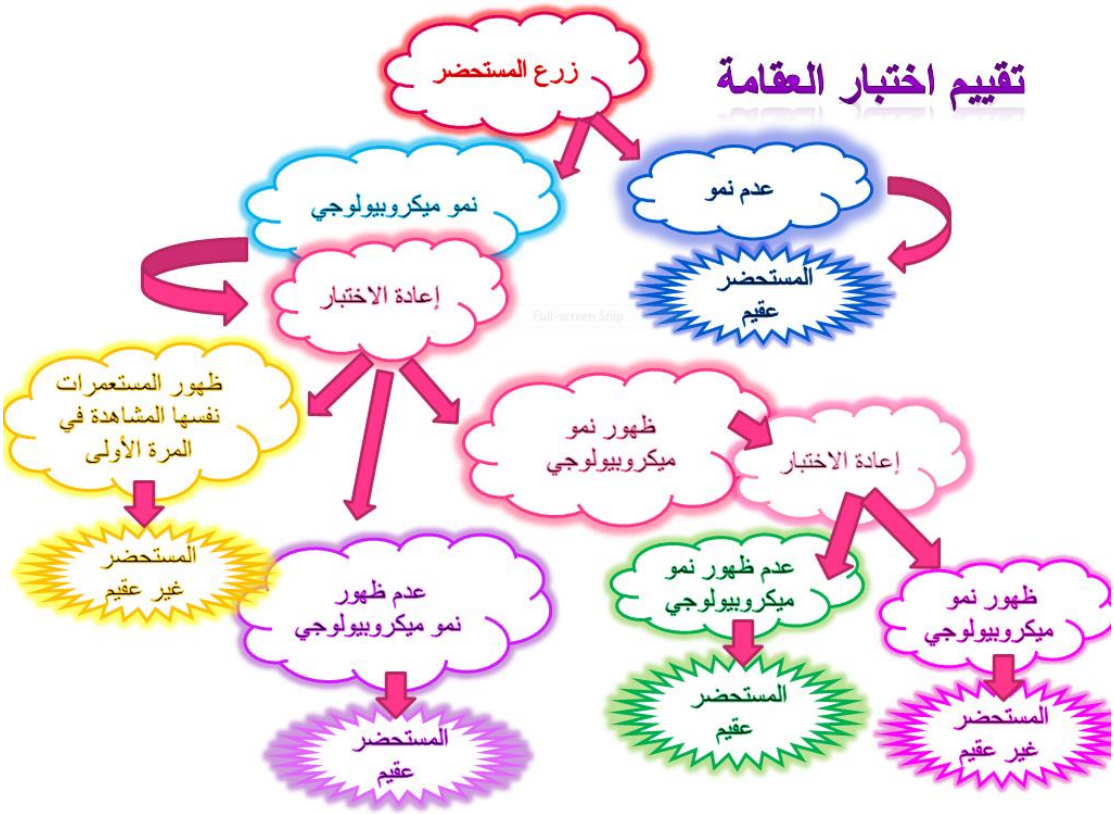
يكون الاختبار مقبولاً إذا لم تبد أي عبوة من العبوات المطعمة نمواً خلال 5 أيام.
يجب التقيد بدرجة الحرارة المثالية لنمو مجموعتي المكروبات، كما يجب التقيد التام بعدد أيام الحضن لإعطاء نتيجة دقيقة. أما عند التعقيم بالأشعة فإن الحضن يستمر مدة أكثر من 14 يوماً نظراً لاحتمال وجود بعض المكروبات التي يمكن أن 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

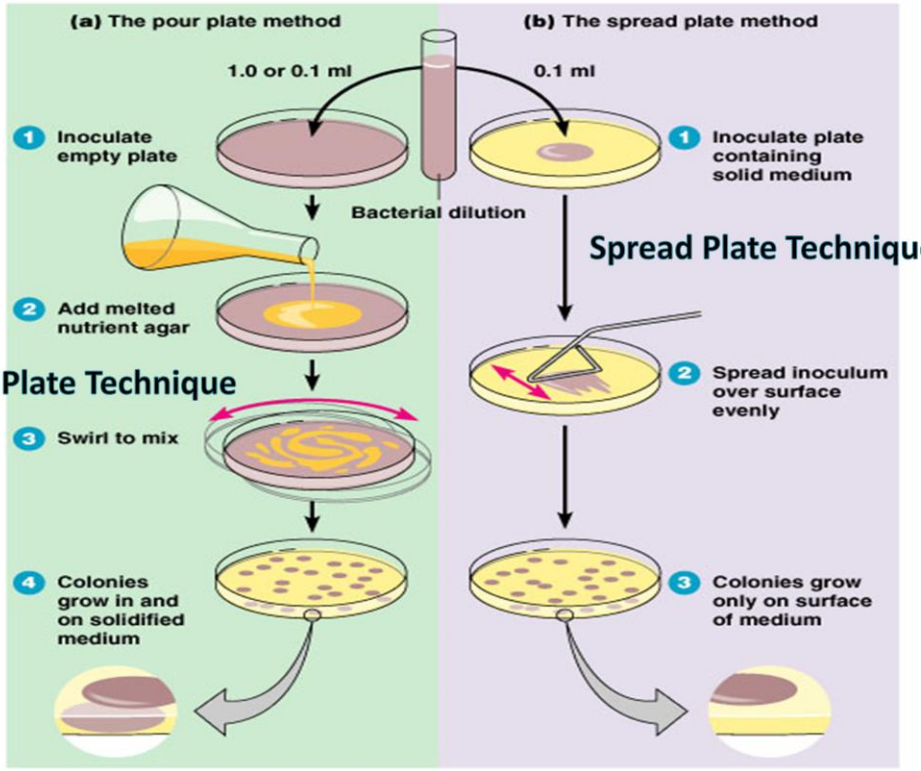


اختبار العقامة للمضادات الحيوية Sterility Testing of Antibiotics

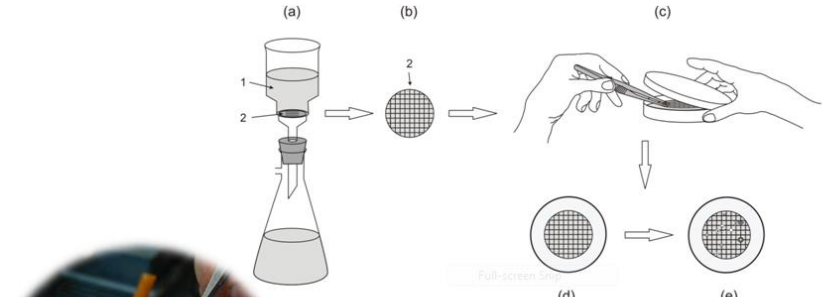
- يجرى هذا الاختبار على المضادات الحيوية المعدة للإعطاء حقناً التي يحتمل تلوثها مكروبيولوجياً.
- تستخدم في هذا الاختبار المستنبتات المستعملة لاختبار العقامة وشروط درجة الحرارة.
- تستعمل الذراري من المكروبات المرجعية.
- تحضن بشروط هوائية ولا هوائية.
- تذاب المادة المطلوب اختبارها بالماء العقيم أو بمحلول الببتون العقيم Sterile Peptone.
- ترشح عبر مرشحة غشائية.
- يجرى الغسل بمحلول الببتون المضاف له مادة معطلة لفعالية المضاد الحيوي (كإضافة البنسيليناز 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 7أيام.
- إذا لم يلاحظ أي نمو مكروبيولوجي في المستنبتات المختبرة تعد المادة مطابقة، أما إذا لوحظ فيعاد الاختبار.

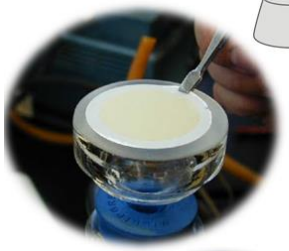
اختبار الحد المكروبي Microbial Limit Test

- تذاب أو تُمزج المستحضرات مع دارئة 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

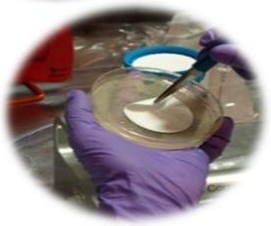


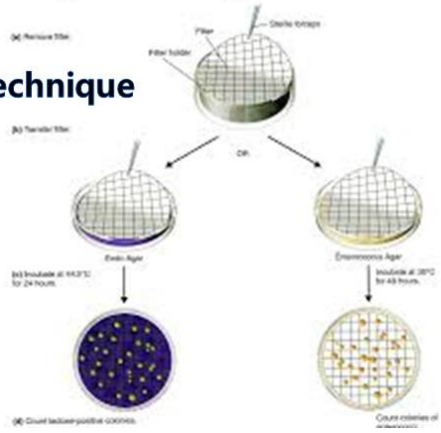
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

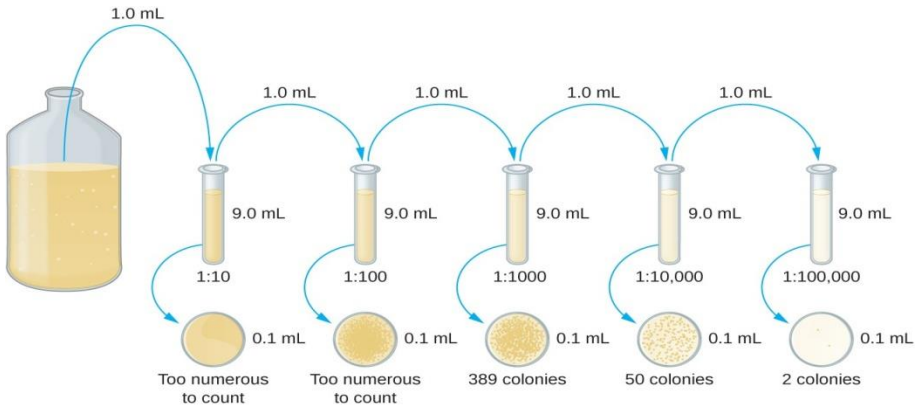




Filtration Technique







- 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 علبة 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 C°.

- وسط سابورو ديكستروز آغار Sabouraud Dextrose Agar لكشف وعد الفطريات، يحضن 5-7 أيام بدرجة حرارة 20-25 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 المكروبي أن المادة المختبرة لا تملك قدرة صادة للنمو المكروبيولوجي، لذلك لا بد من استعمال شواهد جرثومية وفطرية. وإجراء إزالة القدرة الصادة إما بالتعطيل أو التمديد.
- يجرى حساب العدد المكروبي بتطبيق القانون:

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

حيث:

Y: مجموع عدد المستعمرات في كل علبة من علب البتري

x: نسبة التمديد

n: عدد علب البتري

- يستخدم للعد جهاز خاص موصول بمكبرة عينية يمكن من خلالها تحديد عدد المستعمرات في كل ملم^2

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 الفموية يتحرى فيها عن الإيشريكيات القولونية.
- المستحضرات الموضعية يتحرى عن وجود العنقوديات الذهبية أو الزوائف الزنجارية.
- المستحضرات الصيدلانية المعدة للاستعمال الشرجي أو المهبلي يتحرى فيها عن وجود الخمائر والفطريات .

- إجراء عمليات التكثير في أوساط خاصة.
- وضع بعض المواد لمنع النمو المتطفل.
- يجري تحضير الجراثيم على أوساط سائلة عادية مغذية Enrichment Liquid Culture Medium
- يجري الحقن بالواخز 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 للسكاكر على نحو خاص التي تضاف إلى الأوساط.
- إضافة المشعرات المختلفة التي تتغير ألوانها في الوسط نتيجة تغير الـ pH.

❖ الإمعائيات Enterobacteriaceae

وتضم:

- ❑ أنواع السلمونيلا (ومنها: العصيات التيفية Typhi, نظيرة التيفية Paratyphi، الشيغلات Shigella، المتقلبات Proteus، الكلبسيلات Klebsiella).
- ❑ الإيشيريكيات القولونية.

يجري اختبار وجودها بعملية تطعيم المستنبتات حيث يجري:

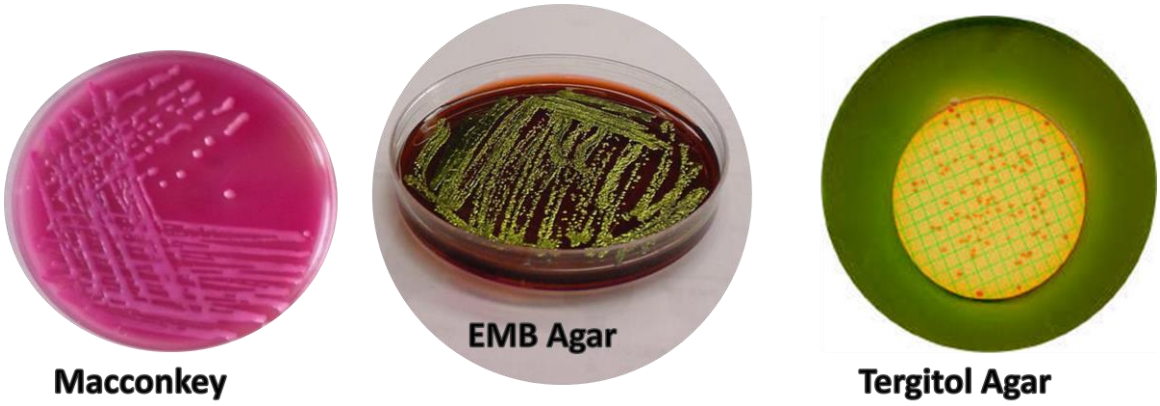
- التكثير على وسط المرق المغذي Broth Medium.
- النقل إلى مستنبت انتقائي يحوي مثلا آغار، غلوكوز، لاكتوز، البنفسجية المبلورة، أملاح الصفراء، الأخضر اللماع، التي يفيد وجودها في تثبيط نمو الجراثيم الإيجابية الغرام المرافقة.
- أو النقل إلى مستنبتات انتقائية سائلة لإغناء الجراثيم، وهي عبارة عن سائل مدروء من الغلوكوز. يفيد وجود الدارئة في تجنب انخفاض pH الناتج عن استقلاب الغلوكوز.

E. Coly

لكشف الإيشيريكيات القولونية:

- يجري التكثير 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.



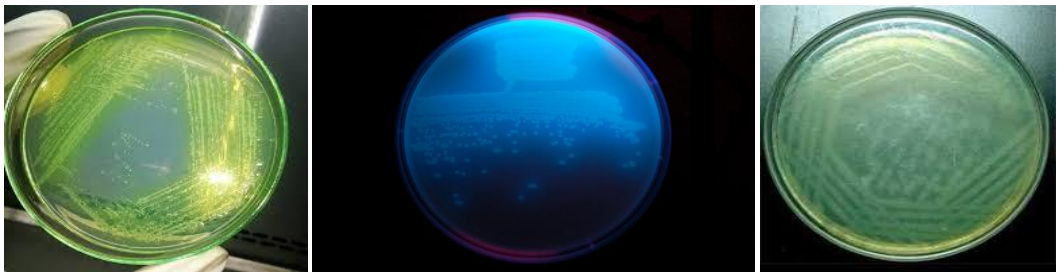
لنفي وجود أنواع السلمونيلا:

- 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 كولات مع مستنبت آغار، سكروز، لاكتوز، أحمر الفنول، والاخضر 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 الجرائيم التي يمكن أن تخفي ظهور الزوائف.
- يمكن إضافة حمض النالديكسيك Nalidixic Acid مع الستريميد بتركيز 0.1 % للسيتريميد. حيث ان الكليبسيلات والمتقلبات من الإمعائيات تقاوم السيتريميد ما يتطلب مشاركة.
- للزوائف الزنجارية رائحة كريهة، ولون أخضر في مستنبت السيتريميد، ويصبح لونها أزرق عند تألقها بأشعة UV .
- تعرف مستعمرات الزوائف من تلونها بالأزرق الشديد بإضافة كاشف فينيلين دي أمين دي كلوريد.

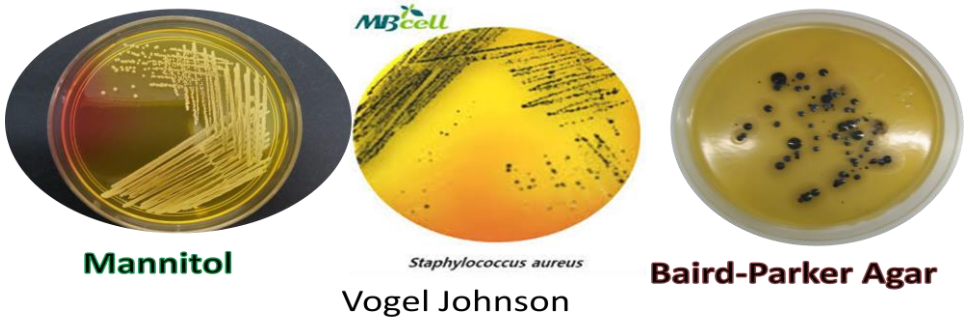


❖ العنقوديات الذهبية Staphylococcus Aureus

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

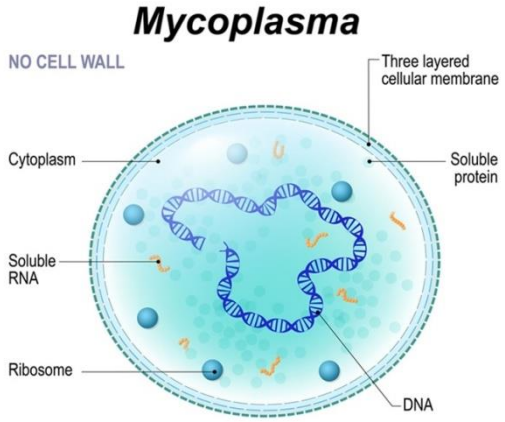
الممرضة، وهذا يؤدي لتشكل راسب اسود، وبالتالي تظهر المستعمرات بلون اسود ويتحول لون المستنبت إلى الأصفر، كما أن لهذه المادة دوراً في تثبيط المكروبات المرافقة.



❖ 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 النسج 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 الحضن 15 يوم مع وضع 50% من المستنبتات في شروط حضن لاهوائية، و50% في شروط حضن هوائية بدرجة حرارة 35-37 C° لأن بعضها هوائية مجبرة وبعضها الآخر لاهوائية مجبرة أو مخيرة.
- إثبات وجودها الفعلي يجري مجهرياً.



المقايسات البيولوجية واختبارات الفعالية
Biological Assays & Potency Tests

1- المقايسة المكروبيولوجية للمضادات الحيوية Antibiotics Microbial Assay

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

- ❑ طريقة الانتشار Diffusion Method
- ❑ طريقة مقياس العكر Turbidimetric Method

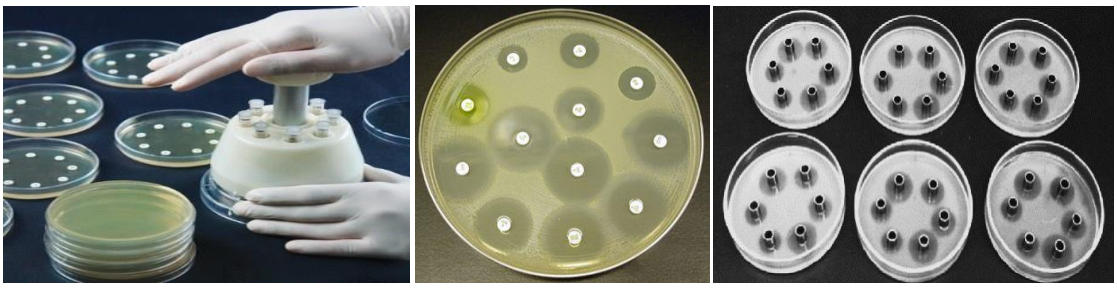
❑ طريقة الانتشار Diffusion Method

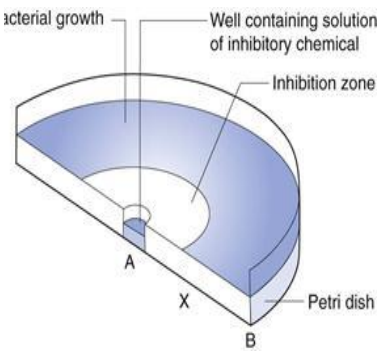
- تعني منع نمو المكروبات ضمن مستنبت مغذ صلب على مستوى انتشار المضاد الحيوي.
- يجري اختيار شروط الاختبار بحيث تنشأ علاقة شبه خطية بين قطر بقعة الصد مع لوغاريتم التركيز الأصغري للمضاد الحيوي، ومن ثم فإن قطر بقعة الصد يعبر عن مدى فاعلية المضاد الحيوي.
- تقانات المقايسة:

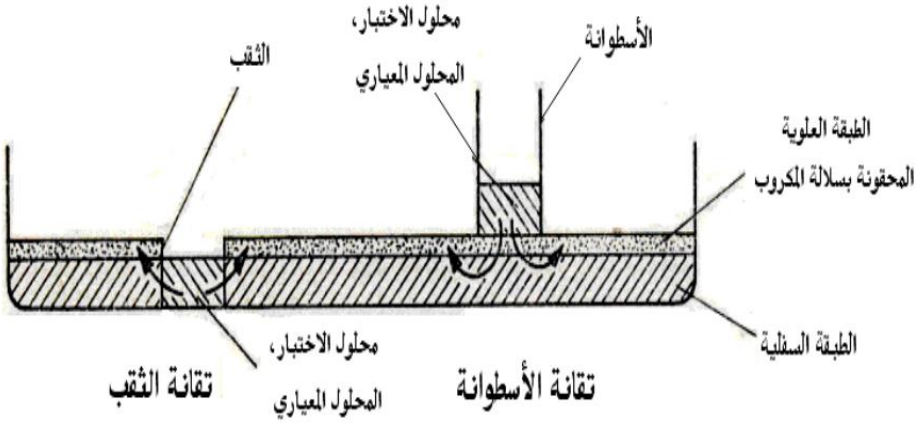
تستخدم فيها مستنبتات مختلفة الملقحة بلقيحة من ذرية جراثيم أو فطريات معيارية مناسبة.

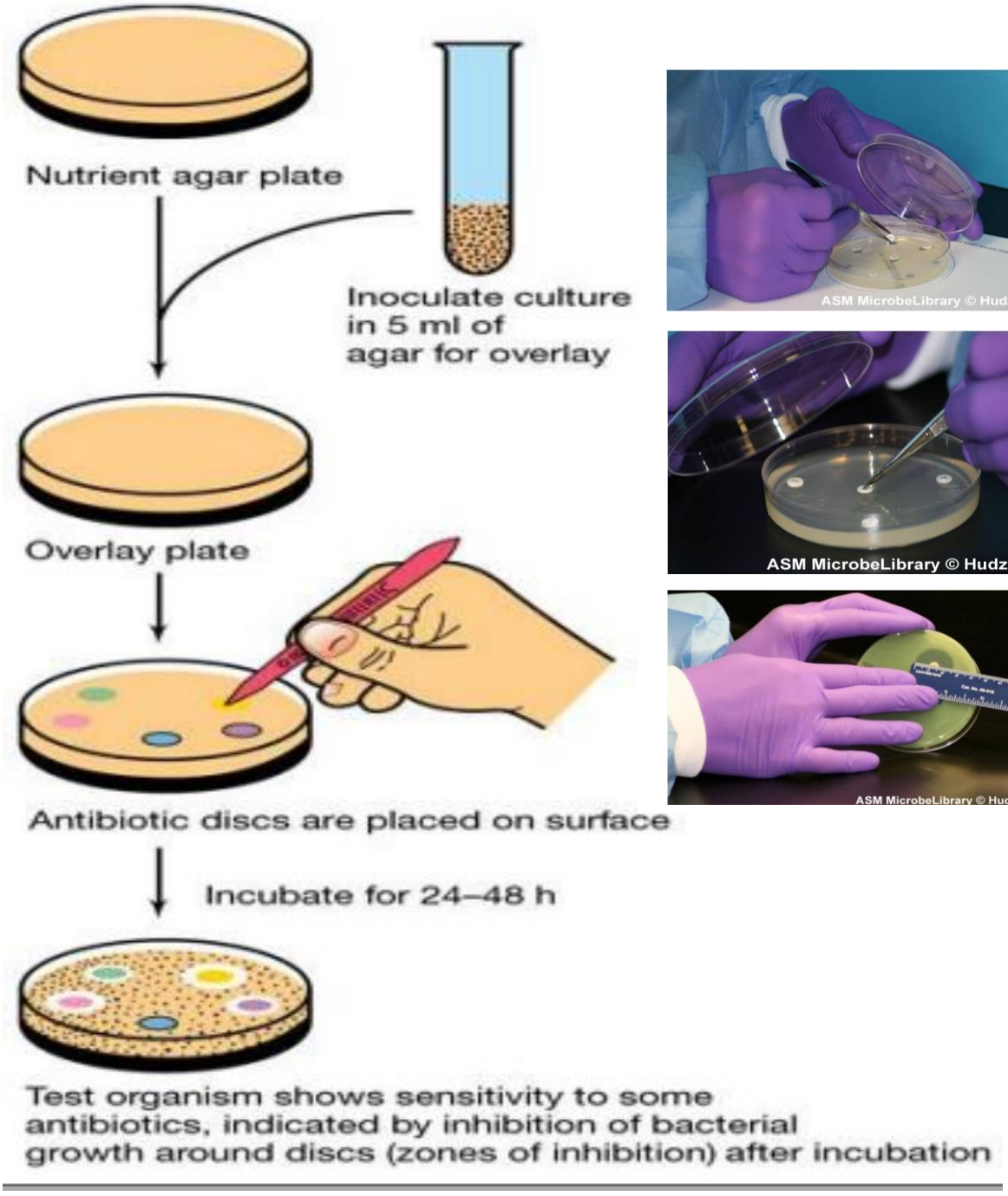
- تقانة الثقب Cavity Technique
- تقانة الأسطوانة Cylinder Technique

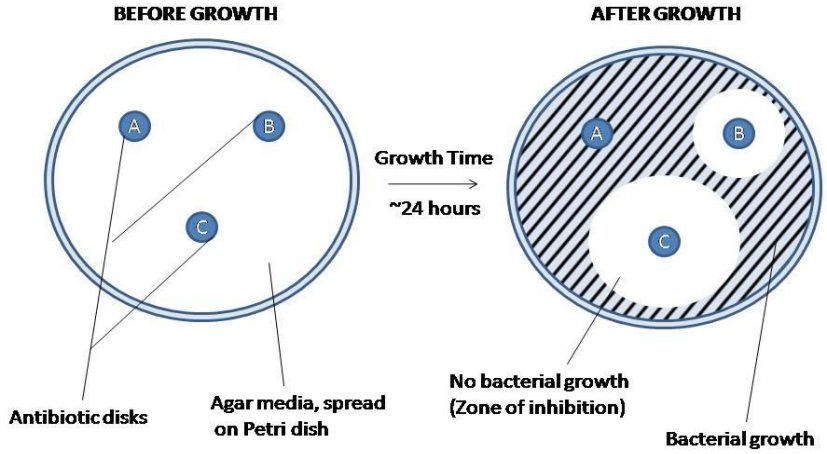
تقارن أقطار بقع الصد الناتجة عن سلسلة تراكيز المضاد الحيوي المراد اختباره مع أقطار بقع الصد الناتجة عن سلسلة المعياري المرجعي للمضاد الحيوي.

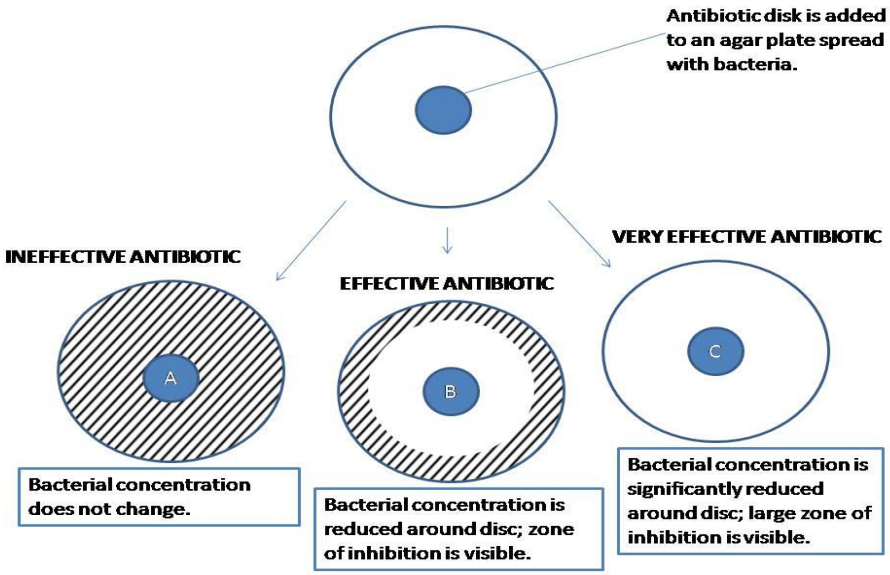


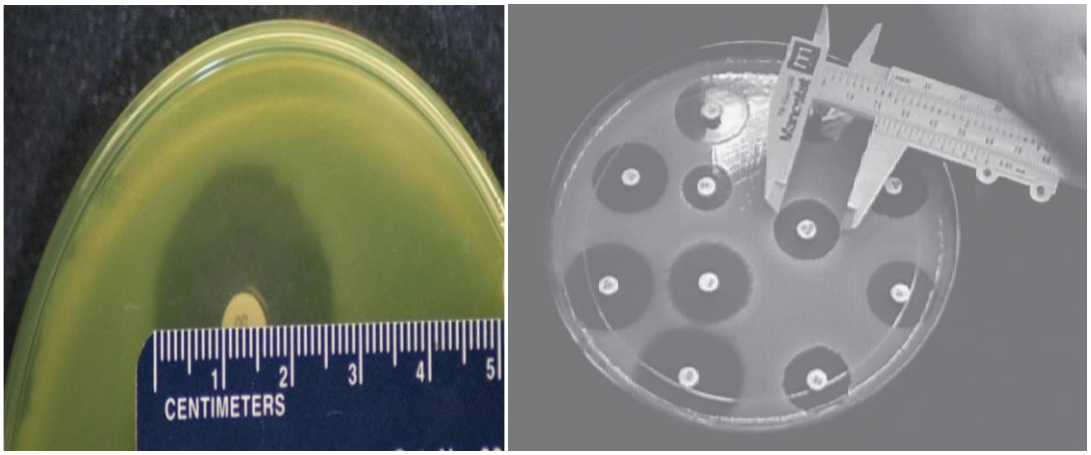


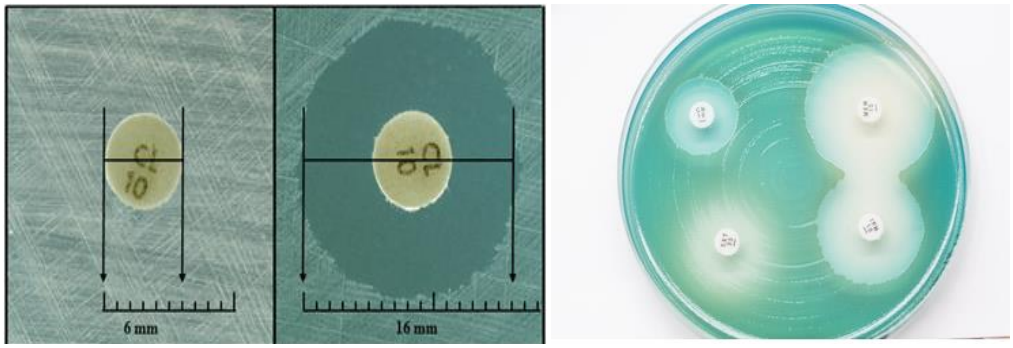



Nutrient agar plate
Inoculate culture in 5 ml of agar for overlay
Overlay plate
Antibiotic discs are placed on surface
Incubate for 24–48 h
Test organism shows sensitivity to some antibiotics, indicated by inhibition of bacterial growth around discs (zones of inhibition) after incubation
ASM MicrobeLibrary © Hudzicki
ASM MicrobeLibrary © Hudzicki
ASM MicrobeLibrary © Hudzicki


BEFORE GROWTH
AFTER GROWTH
A
B
C
Growth Time
~24 hours
Antibiotic disks
Agar media, spread on Petri dish
No bacterial growth (Zone of inhibition)
Bacterial growth



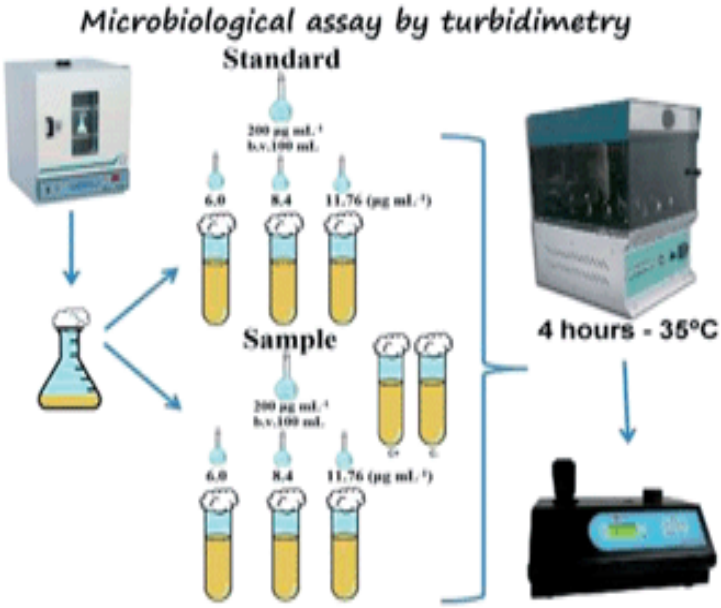




❑ طريقة مقياس العكر Turbidimetric Method

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

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



2- مقايسة الفعالية في الفيتامينات مكروبيولوجياً Microbial Activity Assay of Vitamins

- تعتمد مقايسة بعض الفيتامينات على مبدأ أن المكروبات لا تنمو طبيعياً إلا بوجود بعض الفيتامينات.
- مبدأ الاختبار:

هو زرع مكروبي على مستنبت مبعد عنه الفيتامين المراد مقايسته والمهم لنمو ذرية محددة من المكروبات.

- تضاف المادة المعيارية والمادة المراد مقايستها بتراكيز مختلفة إلى المستنبتات الحاوية على الذرية المكروبية المحددة.
- معيار الفعالية الفيتامينية هو شدة نمو المكروب.
- هذه الطرائق تعتبر نوعية جداً وتطبق عادة في حال مقايسة كميات صغيرة جداً من الفيتامين.

مثال : Vit B12، حمض الفوليك، بانتوتينات الكالسيوم.

المقايسات 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- المقايسة 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.
- يجرى 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 مقايسته.
- تقتل الجرذان وتقدر النسبة التي شفي بها الكساح بواسطة الصور الشعاعية، وتحسب نتائج المقايسة بطرائق إحصائية.

2- المقايسات البيولوجية للهرمونات Hormones Biological Assays

- مبدأ هذا النوع من المقايسات 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:

المقايسة 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.
- تثفل ويعاير الغلوكوز في البلاسما 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 المنتوجات المصنعة بطرائق التقانة الحيوية أو المستحضرات البيولوجية، كما يشمل بعض المضادات الحيوية مثل الستربتومايسين، ومضادات الفطريات مثل النيستاتين و Griseofulvin.
- تستخدم الفئران في اختبار المنتوجات 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 (17-23غ) USP.
- نظام حمية 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 المخمدة 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 الفخذي.
- 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:

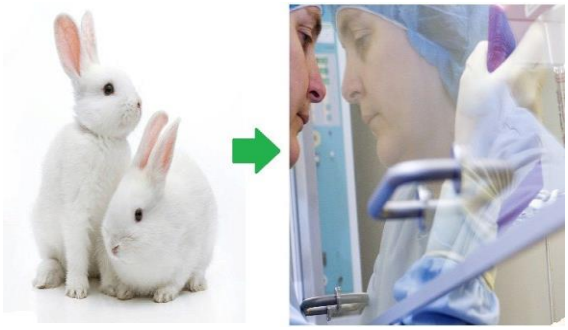
تسبب مولدات الحرارة أعراضاً مثل ضيق التنفس والحمى، وقد تؤدي في بعض الأحيان إلى موت المريض، كذلك قد تسبب أعراض نقص تروية، برودة أطراف، آلام في الرأس، ووهن عضلي عام.

- البنية: عبارة عن معقدات كبيرة الوزن الجزيئي، مكونة من دسم وبروتين وعديد سكاريد.
- الحيوانات: أرانب 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 الأرانب:

- 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:

- تحقن 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.



❖ الذيفانات الداخلية الجرثومية LAL Test - Bacterial Endotoxins

- وجد أن حلالة Lysate أحد الحيوانات المائية المسمى سرطعان نعل الفرس أو Limulus Polyphaemus تحوي أنزيماً 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 صنعي بين الببتيد ومولد الصبغ.