المحاضرة الثامنة والتاسعة

تتمة في مبادئ وطرق التعقيم

مراقبة العقامة ، اختبار العقامة، واختبار البيروجينات

sterilization control ,sterility test, and pyrogens test

د. سوسن الخاني

تتمة في مبادئ وطرق التعقيم

رابعا التعقيم بالترشيح

- تعتبر عملية الترشيح الوحيدة من بين طرق التعقيم التي تعتمد على مبدأ عزل الجرثوم دون تخريبه خارج المادة المُعقِمة وذلك بمنع مروره من المادة المُعقِمة من خلال حاجز الترشيح ، وحواجز الترشيح هذه لها القدرة ليس فقط على عزل ال M.O بل أيضا الجزيئات الدقيقة العالقة غير الحيوية لذلك لها فائدة تصنيعية إضافة الى فائدة التعقيم

- يكون استعمالها بالصيدلة الصناعية مقتصرة على تعقيم بعض المحضرات السائلة العطوبة بالحرارة مثل الحقن والقطورات العينية وبعض المنتجات الحيوية بالإضافة إلى استخدامها الأهم وهو تعقيم هواء منطقة العمل في جو عقيم، أما استعمالاتها الأخرى في الصناعة الصيدلانية استعمالها في نظام الصرف وفي أجهزة التخمر وكذلك في المثفلات وأجهزة التجميد، ولها استخدام مهم في اختبارات العقامة، حيث تحرر العينات السائلة والغازية من خلالها ليتم تكثيف وجمع الـ M.O الملوثة في العينة تحت الاختبار، ومن ثم يتم الاختبار بوضع غشاء الترشيح على وسط مغذ صلب. بالإضافة الى استخدامها من اجل الغاء فعالية المادة الحافظة او المطهرة.

أما **آلية الترشيح** فهي إحدى ثلاثة:

الغربلة (النخل) SIEVING و الادمصاص (الشبك) ضمن مكونات المرشحة adsorption والاحتجاز ضمن القالب matrix لمادة غشاء الترشيح. تعتبر عملية الغربلة الأفضل لأنها تقوم بحجز كل الجزيئات من حجوم معينة وتمنع عبورها.

* تعتبر الأغشية المستعملة بالترشيح والتي تركيبها غالباً من مشتقات **استرات السيللوز** أو متماثرات أخرى ذات فاعلية قريبة جدا من آلية الغربلة، بينما **الأنسجة الليفية** Fibrous pads و**الزجاج الصوفي** glass و**الخزف اللبادي** Sintered ceramic و**البورسلان** فجميعها تعتبر مراشح عميقة depth filters والتي آلية عملها الادمصاص Adsorption والشبك entrapment او الية الاحتجاز ضمن قالب .

ملاحظة:

- قلنا أننا نقبل القول بأن عملية الترشيح هي عملية تعقيم اصطلاحاً فقط عمليا، لأنها تحرر الفيروسات ولا تعقم الشكل الصيدلاني منها

- التعقيم بالترشيح يكون خاص بالغاز والسائل فقط مثلا ممكن مادة حساسة للحرارة دون أن تكون حساسة للرطوبة، لذلك نحلها بمحل مناسب ثم فلترة (عزل للأبواغ)، ثم استحصال البودرة بتبخير المحل,(طريقة مقبولة).

نقسم المراشح من **ناحية القطر لـ 3 أنواع :**

1) مراشح 0.45 ميكرون تحتجز الأشكال الإعاشية فقط وهي تستخدم بالـ water for injection، حيث نخاف من الجراثيم سلبية الغرام لأنه تعطي البيروجينات وليس الخوف من البذيرات لأن البذيرات غير حاوية على البيروجين.

2) مراشح 0.22 ميكرون، هي المعتمدة بالصناعة الصيدلانية.

3) مراشح 0.1 ميكرون، لنقاوة أعلى ولعزل بعض أنواع الفيروسات التي تكون أكثر من 100 نانومتر .

أنواع المراشح **من حيث الشكل :**

- **مراشح غشائية:** عبارة عن غشاء membrane من ألياف السللوز بمسام ذات قطر معين pore size او البوليمرات الصنعية مثل تترافلور ايتيلين .
- **مراشح عميقة**: طبقات مختلفة مصنوعة من البورسلان او الزجاج الصوفي وليس بالضرورة من الياف السللوز.

سنناقش في المراشح مايلي :

أ) مادة المرشحة: بالنسبة للمراشح الغشائية فهي مشتقات السللوز مثل نترات السللوز، او بوليميرات صناعية مثل تترافلور ايتيلين، يكون الانتقاء بينهما حسب طبيعة المادة المراد ترشيحها، فإذا كان لها خواص كاوية وتأثير تأكلي تخرب المرشحة، نستخدم لذلك البوليميرات الصناعية. بالنسبة للمراشح العميقة فهي من البورسلان والصوف الزجاجي...

ب) شكل المرشحة: عميقة أو سطحية.

ج) اليه الترشيح: قلنا هي إما غربلة وإما الحشر ضمن أنفاق خاصة بالمرشحة تؤمن آلية عميقة حيث فيها نفق قد يسمح بمرور الـ 0. M ببدايته لكن لايسمح بمروره في نهايته ، مساوئها تفقد هذه المرشحة جودتها مع الزمن وتفقد قدرتها على التصفية، ومن الأليات أيضاً الأدمصاص أو الشبك ضمن مكونات المرشحة (أسوء الطرق على الإطلاق لأنها مع الزمن تؤهب لنمو مستعمرات جرثومية فيها عند توفر الرطوبة المناسبة لها).

عندما نقول مرشحة بقطر 0.22 ميكرون، فنحن نعني بذلك أن أكبر قطر لمسام هذه المرشحة هو 0.22 ميكرون وهنالك مسام بقطر أصغر من ذلك، فليس بالضرورة أن تكون جميع المسام بقطر واحد لأن تصنيعها لا يتم باستخدام قوالب معينة، بل هي عبارة عن تجميع لألياف بآليات معينة دون الدقة في القياس فقط يهمنا أن يكون أكبر قطر فيها هو 0.22 ميكرون.

لايمكن تنظيف المراشح الغشائية، لذلك تعد Disposable، ويمكن تعقيم المراشح العميقة بالحموض دون مشكلة، وكلا النوعين يعطي نفس الدرجة من التعقيم.

والجدول التالي يبين الفرق بين الـ Depth Filters والأغشية:

الصفات	أغشية	مراشح عميقة
حجز الـMO فوق حجم معين (أكبر من حجم الثقوب)	+	-
سرعة ترشيح عالية	+	-
إمكانية التنظيف والتخلص من الأوساخ	-	+
نمو الجراثيم خلال وعلى المرشحة	unlikely	+
هدر في مكونات المادة المُرشحة	-	+
حجز السائل (عدم مروره أو توقفه)	-	+
ادمصاص المواد المذابة	-	+
ثباتها كيميائيا	حسب نوع المتماثر	+
الترشيح الجيد	+	+

أولا تعقيم السوائل بالترشيح Filtration sterilization of liquid

- نستعمل من اجل تعقيم السوائل من الجراثيم أو بذيراتها اغشية بقطر Pore size مسام (0.2-0.22 ميكرون) ويقطر 0.1 ميكرون لعزل بعض الفيروسات وبقطر 0.45 ميكرون لعزل الجراثيم كبيرة الأبعاد والجزيئات الكبيرة ولكن ليس بقصد التعقيم
- من المفترض أن يكون لغشائين لهما نفس قطر المسام ولمعملين مختلفين (معمل التصنيع) نفس فاعلية الترشيح أو التعقيم، لكن هذا غير صحيح حيث إن عمق غشاء الترشيح Depth of the membrane وحشوته Charge وتمعجات الأقنية tortuosity كلها عوامل تجعل غشاء ترشيح أفضل من غشاء آخر...
- تقوم المعامل التي تصنع أغشية الترشيح بعملية تقييم validation لها وفق طريقة (HIMA) -Health Industry Manufacturers Association وهو **اختبار لفعالية المرشحة بإستخام المشعر الحيوي** حيث تستعمل جراثيم الزائفة الصغيرة pseudomonus diminuta والمزروعة على وسط مرق اللاكتوز في المصل الفيزيولوجي، حيث تعطي في هذا الوسط خلايا جرثومية أبعادها 0.3 ميكرون وهي مناسبة لعملية الـ validation في المراشح 0.22 ميكرون ، لكي يكون الغشاء فعال ومسموح باستعماله في الترشيح عليه ان يحتجز 10^7 خلية / سم2 من سطحه وبفرق ضغط psi30 (حيث تطبق عملية الترشيح دائما مع ضغط إيجابي والذي له ميزة على حالة الضغط السلبي بأنه يقدم سرعة جريان اعلى ويتجنب حدوث التلوث في حالة الضغط السلبي) وتحسب فاعلية الاحتباس Retention officiency حسب طريقة HIMA بأخذ لوغارتيم قيمة النقص reduction values

- يوجد اختبار سلامة آخر يستعمل في التقييم validation الأغشية قبل وبعد عملية التعقيم، حيث أنه اختبار غير مخرب للغشاء وهو **اختبار نقطة الفقاعة أو الانتشار** The buble point or diffusion وهو مستعمل بشكل روتيني للتأكد من سلامة غشاء الترشيح (سنتحدث عنه لاحقا) .
- بعض المراجع المتشددة مثل دستور الأدوية البريطاني يفترض أن يكون غشاء الترشيح المستعمل في التعقيم له قدرة احتجاز 10^{9} M.O /سم2 من سطحه
- تستعمل المراشح اللبادية sintered filters (من المراشح العميقة) في بعض الحالات المحددة مثل السوائل ذات التأثير التأكلي ، والسوائل ذات اللزوجة العالية وكذلك المحلات (او المذيبات) العضوية .
- تصنع الأغشية (المراشح الغشائية) من العديد من المتماثرات أهمها استيرات السيللوز cellulosic-esters وفلور البولي فينيليدين (PVF) Polyvinylidine Fluoride والبولي تترافلوروايتيلين (PTFE) poly tetra fluoro- ethylene ولكل محلول أو سائل يوجد متماثر مناسب لترشيحه:

المحلول او السائل او الغاز (المراد ترشيحه)	المتماثر المستخدم في صناعة المرشحة
المحاليل المائية	PVF او MCE (متيل سيللوز)
الزيت	PVF او MCE
المذيبات العضوية	PVF او PTFE
المحاليل المائية ذات الPH العالي	PVF
الغازات	PVF او PTFE

اختبار نقطة الفقاعة أو الانتشار The buble point or diffusion:

- نبلل المرشحة بمحلول لمادة فاعلة على السطح توضع على فوهة جهاز ونطبق ضغط ونبدأ برفعه تدريجيا، فيكون ظهور أول فقاعة مساو للضغط الموافق لأكبر مسام، وهكذا لنصل لآخر فقاعة متشكلة والتي تكون مساوية للضغط الموافق لأصغر مسام، فإذا كان الضغطين اقل من الضغط المتوقع والمحدد من قبل الشركة المصنعة وفق مقاييس دولية تكون المرشحة غير سليمة ، كلما كان فرق الضغط (بين الضغطين) أكبر هذا يعني بأن المرشحة أقل جودة، وكلما كان فرق الضغط المطبق قليل ← المرشحة عالية الجودة ولا يوجد تباين كبير بين أحجام الثقوب
- فلنفترض أن ضغط أول فقاعة بالظهور هو X وآخر فقاعة هو Y وكان الضغط الموافق لأول فقاعة بعد الاستخدام للمرشحة لمدة من الزمن هو X~ ، ولآخر فقاعة هو Y~ فلكي نقول بان المرشحة سليمة :

يجب أن يكون X= X~ و Y =Y~ (الأفضل الاثنين معاً، ولكن يمكن التغاضي عن ال Y ولكن بشرط أن تكون ضمن الأرقام مرجعية)

إذا كان X< X~ فهذا منطقي ولا يعد مشكلة لأنه من الطبيعي أن **يحصل انحشار ضمن المسام مما يقلل من قطرها** (الحل هو زيادة الضغط المطبق)

إذا كان X > X~ هذا يعني ان المرشحة متخربة وأصبح هنالك تخرب في المسام، وبأقل ضغط يمكن أن تعبر الجزيئات.

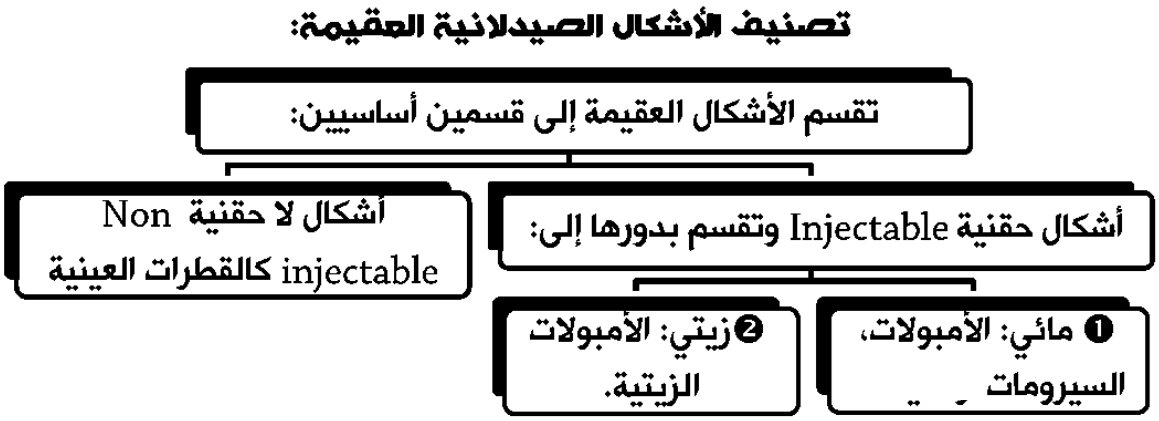
- اختبار الفقاعة مفضل على المشعر الحيوي لأنها تكتشف سلامة المرشحة دون تلويث العينة.

ثانيا تعقيم الغازات بالترشيح :Filtration sterilization of gases

- أهم استخدام لهذه الطريقة هو تعقيم الهواء في منطقة العمل بجو عقيم، وذلك عند تحضير الأشكال الصيدلانية المعدة للحقن والحساسة للحرارة والرطوبة والأشكال الصيدلانية العينية، كما أنها ذات استخدام واسع في تعقيم غرفة العمليات في المشافي وحجرات العناية المركزة الخاصة بالحروق.
- مادة هذه المراشح مؤلفة من نسيج مسطح من ألياف زجاجية دقيقة تتخلله دعائم عبارة عن الواح مموجة من الورق المقوى أو الألمنيوم، توجد هذه المراشح في فتحة الأنابيب التي توصل الهواء لمنطقة العمل (حيز كبير) أو يمكن أن تكون المنطقة المعقمة محصورة أو ما يعرف بحجرة جريان الهواء الصفائحي Laminar
- إن مراشح الهواء ذات الفعالية العالية (HEPA) High_efficiency particulate air تستطيع ان تزيل أكثر من 99.997% من الجزيئات التي أبعادها أكبر من 0.3 ميكرون، وهي تعمل كمراشح عميقة Depth filter
- يجبر الهواء على العبور ضمن هذه المراشح بواسطة مروحة قبل المرشحة، وفي الغالب يخضع الهواء لعملية ترشيح بدئية لتخليصه من الجزئيات العالقة الكبيرة وذلك لإطالة عمر مرشحة الـ HEPA .
- فعالية الترشيح وسلامة المرشحة يمكن مراقبتها من خلال مراقبة فرق ضغط الهواء قبل وبعد استعمال المرشحة وكذلك سرعة جريان الهواء، وكذلك **اختبار مرور جزيئات دخان أوكتيل فتلات** Dioctylphthalate

مراقبة العقامة و اختبار العقامة
sterilization control and sterility test

1- الاشكال الصيدلانية العقيمة:



ما هو الفرق بين الأشكال الصيدلانية العقيمة الحقنية والعقيمة الغير حقنية؟؟

الفرق أن الأشكال الصيدلانية الحقنية يجب أن تحقق شرط آخر غير العقامة وهو خلوّها من البيروجينات.

بينما الأشكال غير المحقونة كالقطرات العينية ف يشترط بها أن تكون عقيمة فقط.

- ولدينا أيضاً تصنيفات أخرى :

- حسب عدد الجرعات: أشكال صيدلانية حقنية وحيدة الجرعة، وأشكال صيدلانية حقنية متعددة الجرعة.

- يوجد تصنيف حسب الحالة الفيزيائية: صلب (المساحيق)، وسائل.

- وحسب الحجوم: حجوم كبيرة (السيرومات)، وحجوم صغيرة (الأمبولات).

- حسب طريقة التعقيم : أشكال صيدلانية تُعقَّم بشكلها النهائي Terminal sterilizationو وأشكال أخرى تُحضَّر بشكل عقيم Aseptic filling .

- ملاحظة : ما هو الفرق بين الأشكال الصيدلانية وحيدة الجرعة والمتعددة الجرعة؟؟

الفرق فقط أن الأشكال الصيدلانية المتعددة الجرعة تحوي مادة حافظة للحفاظ على عقامتها، أما الوحيدة الجرعة فلا تحوي مادة حافظة.

• Terminal sterilization أشكال صيدلانية تُعقَّم بشكلها النهائي:

a process in which the product is sterilized in its final container (terminal sterilization) is the preferred method. This is not possible for all types of products

• Aseptic filling أشكال أخرى تُحضَّر بشكل عقيم:

Aseptic manufacturing is used in cases where the drug substance is instable when subjected to heat (thus, sterilization in the final container closure system is not possible) or where heat would cause packaging degradation

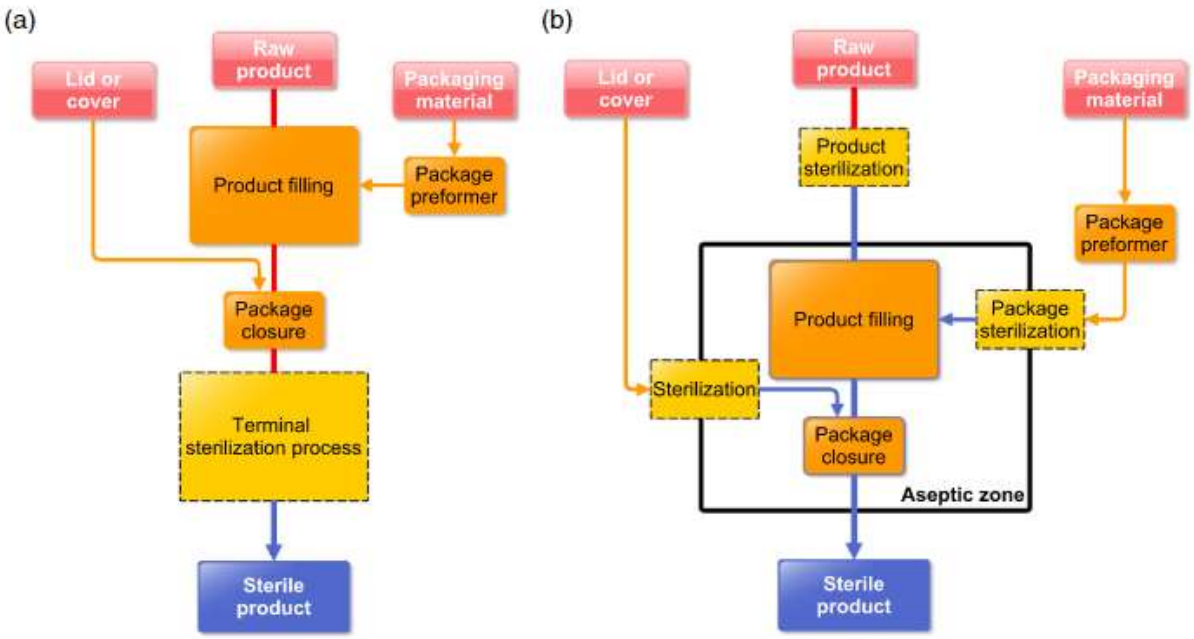
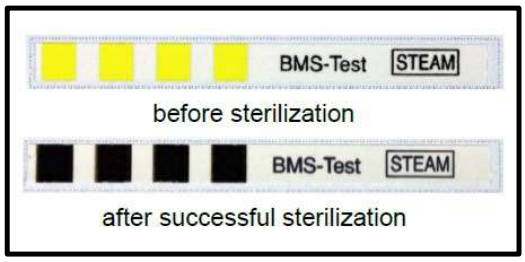


Figure 1. Flowchart portraying the design of a filling machine with a) terminal sterilization concept and b) setup of an aseptic filling machine.

2- مراقبة عملية التعقيم sterilization monitirs

- يستعمل لمراقبة التعقيم مشعرات فيزيائية وكيميائية وحيوية حيث توزع هذه المشعرات ضمن التحضيرة المراد تعقيمها



DRY HEAT STERILIZATION

Indicators	Sterilization method	Principle	Device	Parameter monitored
Physical	Dry heat	Temperature recording chart	Temperature recording chart	Temperature
Chemical	Dry heat	Temperature sensitive colored solution	Browne's tube	Temperature, time
		Temperature sensitive chemical	A temperature sensitive white wax concealing a black marked	Temperature
Biological	Dry heat	Temperature sensitive microbes	Bacillus subtilis	D-value

MOIST HEAT STERILIZATION

Indicators	Sterilization method	Principle	Device	Parameter monitored
Physical	Moist heat	Temperature recording chart	Temperature recording chart	Temperature
Chemical	Moist heat	Temperature sensitive colored solution	Browne's tube	Temperature, time
		Steam sensitive chemical	A device which is impregnated into a carrier material.	Saturated steam
Biological	Moist heat	Temperature sensitive microbes	Bacillus stearothermophilus	D-value

GASEOUS STERILIZATION

Indicators	Sterilization method	Principle	Device	Parameter monitored
Physical	Gaseous	Temperature recording chart	Temperature recording chart	Temperature
Chemical	Gaseous	Reactive chemical	Indicator paper impregnated with reactive chemical	Gas concentration, temperature time
		Capillary principle	Based on same migration along wick principle	Gas concentration, temperature time
		Temperature sensitive chemical	A temperature sensitive white wax concealing a black marked	Temperature
Biological	Gaseous	Temperature sensitive microbes	Bacillus subtilis	D-value

RADIATION STERILIZATION

Indicators	Sterilization method	Principle	Device	Parameter monitored
Physical	Radiation	Recording chart	Recording chart	
Chemical	Radiation	Radio chromic chemicals	Plastic device impregnated with radio sensitive	Only indicates exposure to radiation
			Chemicals which undergo colour changes at relative low radiation doses	
		Dosimeter device	Acidified ferric ammonium sulphate solutions responds to irradiation by dose related changes in their optical density	Accurately measures radiation doses
Biological	Radiation	Radiation sensitive microbes	Bacillus pumilus	D-value

FILTRATION STERILIZATION

Indicators	Sterilization method	Principle	Device	Parameter monitored
Physical	Filtration sterilization	Forcibly passing of solution through the membrane	Bubble point pressure test	Pressure
Biological	Filtration sterilization	Retention of bacteria	B. diminuta	Size of microorganism

- المشعر الفيزيائي لمراقبة التعقيم بالترشيح هو عملية اجبار مرور سائل خلال ثقوب غشاء الترشيح فيتشكل فقاعات بحجم معين ويدعى هذا الاختبار بإختبار الفقاعة تحت الضغط bubble point pressure test حيث تستخدم هذه التقنية لتحديد حجم الثقوب في المرشحة وبالتالي سلامة المرشحة حيث يتم ترطيب المرشحة ثم يطبق عليها تيار هواء او نتروجين تحت الضغط يتزايد الضغط تدريجيا ويسجل الضغط الموافق لظهور اول فقاعة من المرشحة ويوافق هذا الضغط حجم الثقوب فإذا كان الضغط اقل من الضغط المتوقع والمحدد من قبل الشركة المصنعة وفق مقاييس دولية تكون المرشحة غير سليمة

- فيما يخص اختبار سلامة مراشح الهواء (HEPA filter) يتم استعمال غاز دي اوكتيل فتالات DOP dioctylphthalate بدلا من سائل الترطيب ، اذا كان قطر المسام 0.22 ميكرون فلن يمر غاز DOP خلال المرشحة

3- الإجراءات التي تطبق بعد تعقيم الاشكال الصيدلانية :

- اختبار العقامة
- اختبار البيروجينات (للاشكال الصيدلانية الحقنية)
- اختبار فعالية المادة الدوائية (فقد تكون تخربت اثناء التعقيم)

اختبار العقامة Sterility testing:

هو الاختبار الذي بنتيجته نحكم على أن المنتج الصيدلاني أو الطبي خالي من التلوث بالعضويات الدقيقة ، وذلك بعد حضن كامل الشكل الصيدلاني او جزء منه في وسط مغذي ملائم لذلك هو اختبار مخرب ومستهلك للشكل الصيدلاني (حيث يوجد مثلا حقن هرمونية ذات تكلفة باهضة) وهنا يطرح تساؤل حول ملائمة هذا الاختبار لكميات كبيرة من المواد المعقمة والمواد غالية الثمن .

يعتمد اختبار العقامة في جزء كبير منه على قانون الاحتمال الاحصائي حيث يتم اخذ عينات عشوائية ومن خلال الحكم على تلك العينات العشوائية يمكن تمرير (الموافقة) التحضيرة batch الكاملة من المنتج على انها عقيمة رغم احتمال ان تكون غير ذلك (أي ان اختبار العقامة يحكم بشكل فعلي على عقامة العينة المأخوذة من التحضيرة فقط وبشكل افتراضي (احصائي) على باقي التحضيرة)

يتم الحكم على ان التحضيرة عقيمة من خلال عدم ظهور نمو عضويات دقيقة على وسط زرعي ملائم وهذا بحد ذاته حكم غير دقيق حيث يوجد احتمال ان يكون الوسط غير ملائم لنمو جرثوم موجود في الشكل الصيدلاني او ان شروط حضن الوسط بعد زرعه غير ملائمة من حيث درجة الحرارة ومحتوى CO_2 .....الخ ولتجاوز هذه السلبية يجب توفر وسط زرعي ملائم لنمو كل العضويات الدقيقة وكذلك ان تكون هناك شروط حضن تلائم نمو كل العضويات الدقيقة ولكن ذلك غير متاح حتى الان لذلك نلجأ لاستخدام عدة أوساط زرعية تسمح بنمو المتعضيات الدقيقة

من المشاكل التي تواجهنا أيضا في اختبار العقامة انه لايتطرق ابدا في الكشف عن الفيروسات رغم قدرتها على مقاومة طرق التعقيم المختلفة والعبور من مراشح تعقيم الهواء (مثل HEPA filter) ولايزال الضمان الوحيد لخلو المواد الأولية من الفيروسات هو نقاوة المصدر

- **طرق اختبار العقامة methods:**

- يتم اختبار العقامة على وسط سائل قطعا وليس وسط صلب لكي نسمح له بالنمو والتكاثر (الوسط السائل تحري كيفي ، الوسط الصلب تحري كمي).

- **أولا الشكل الصيدلاني الغير حاوي على مضاد الجراثيم:**

مثل الاشكال العقيمة ذات الجرعة المفردة single dose (امبولات ، أكياس سيروم .....) حيث نؤخذ جزء من المنتج مباشرة ونحضنه بوسط ملائم لنرى هل يحصل نمو ام لا ، او نفرغ عدة عينات على سطح مرشحة ثم نزرع المرشحة (أي بدل زرع كل عينة لوحدها)

A- حضن جزء من المنتج مباشرةً في وسط ملائم: و ينصح دستور الأدوية البريطاني بنوعين من الأوساط :

1- مرق التيوغليكولات thioglycollate broth والذي يحتوي الى جانب التيوغليكولات الغلكوز الذي يعتبر ملائم لنمو الجراثيم اللاهوائية بالدرجة 30-35 م

2- وسط كازئين الصويا المهضوم soyabeam casein digest و هو ملائم لنمو الجراثيم الهوائية و اللاهوائية ويتم الحضن بالدرجة 30-35 م ولنمو الفطور يحضن بالدرجة 20-25 م

اذا لاحظنا نمو على الوسطين هذا يعني وجود جراثيم لاهوائية اما اذا لاحظنا نمو على وسط كازئين الصويا فقط هذا يعني وجود جراثيم هوائية فقط

ملاحظة : يمكن استعمال أوساط أخرى ملائمة لاكتشاف أنواع محددة من الجراثيم

B- طريقة غشاء الترشيح: وهي الطريقة المنصوح بها حيث ترشح كمية من السائل المراد اختبار عقامته عبر غشاء قطر المسام له 0.22 ميكرون ، الذي يحتجز على سطحه كل الجراثيم وبعد اجراء عملية غسيل لغشاء المرشحة في مكانه بالماء المعد للحقن العقيم ، يقسم الغشاء بشكل عقيم الى عدة أجزاء حيث يوضع كل جزء في وسط زرعي ملائم ويحضن بالدرجة الملائمة والمدة الكافية

C- في محاليل كبيرة الحجم (التسريب الوريدي) : عن طريق إضافة مرق مغذي عالي الكثافة معقم ، يضاف الى عبوة المحاليل سالفة الذكر بحيث نحصل على وسط ملائم لنمو العضويات الدقيقة ، ثم يحضن بعد ذلك ويراقب من اجل حدوث نمو ، هذه الطريقة حساسة بعيدة عن التلوث

ملاحظات :

- في جميع الطرق السابقة يجب التأكد من الوسط المغذي ملائم لنمو العضويات الدقيقة ويحوي المواد الغذائية الكافية لذلك وانه خالي من المواد السامة التي تعيق نمو أي جرثوم من المحتمل وجوده

- لكي لايحدث التلوث اثناء اخذ العينة او التعامل معها والعمل عليها فإنه من الضروري العمل في جو عقيم مثل استعمال حجرة تدفق الهواء الصفائحي laminar flow cabinet

• ثانيا الشكل الصيدلاني يحتوي عوامل مضادة للجراثيم :

عندما تكون المادة الفعالة في الشكل الصيدلاني مضادة للجراثيم او المادة المضادة للجراثيم جزء من الشكل الصيدلاني (مادة حافظة) فإنه الزاما ابطال التأثير المضاد للجراثيم لهذه قبل اجراء اختبار العقامة وذلك بإتباع احدى الطرق التالية :

A- التثبيط النوعي Specific inactivation : يوجد العديد من المواد التي لها القدرة على ابطال neutralizing مفعول الصادات الحيوية بشكل نوعي مثال استخدام مادة البيتالاكتاماز لتثبيط عمل صادات البيتالاكتام

B- إضافة مادة تدمص على سطحها المادة المضادة للجراثيم وبالتالي تخفض تركيز المادة الحافظة الى اقل من التركيز الأدنى المثبط MIC للعضويات الدقيقة كما في استخدام التوين لإدمصاص مشتقات البارابين

C- التمديد dilution: يتم بهذه الطريقة عملية تمديد المادة المضادة للعضيات الدقيقة في الوسط الزرعي الى ان يصبح التركيز من المادة المضادة للجراثيم في مجمل الوسط اقل بكثير من التركيز الأدنى المثبط للنمو MIC . هذه الطريقة فعالة بشكل ممتاز مع المواد ذات معامل التركيز الاسي العالي مثل الفينولات والاغوال

D- الغسيل على غشاء الترشيح :تستعمل هذه الطريقة بفاعلية ممتازة لإلغاء تأثير المواد المضادة للعضويات الدقيقة التي ليس لها عوامل معدلة والتي لها معامل تركيز اسي منخفض . تتم العملية بترشيح محلول المنتج الصيدلاني عبر غشاء ترشيح كاره للماء قطر مسامه 0.22 ميكرون ، والذي يقوم بإحتجاز الجراثيم في حال وجودها على سطحه ، ثم تتم عملية غسيل لغشاء المرشحة والجراثيم المحتجزة على سطحه وهو في مكانه في جهاز الترشيح وبإستعمال الماء المعد للحقن والعقيم وذلك بهدف نزع أي اثر للمادة المضادة للجراثيم من على الجرثوم ومن على سطح غشاء الترشيح الذي ينزع في مرحلة تالية من جهاز الترشيح بشكل عقيم ويزرع على وسط زرعي ملائم .

المادة الفعالة	المادة المعدلة
فينول، كريزول	لا يوجد (التمديد)
الكحول	لا يوجد (التمديد)
مشتقات الباربين	التوين 80 و التمديد
مركبات الزئبق	مركبات SH– و الـEDTA
مركبات الأمونيوم الرباعية	الليستين + lubrol W أوالليستين+ توين 80
مركبات البيتالاكتام	بيتالاكتاماز
الصادات الحيوية المختلفة	لا يوجد الغسيل على سطح غشاء ترشيح
السلفاميدات	بارا أمينوبنزوئيك أسيد

- ملاحظات :

1- الصادات الحيوية يكون التركيز الأدنى المثبط للجراثيم MIC بالميكروغرام (مكغ) لذلك نلجأ للغسيل على سطح المرشحة

2- السلفاميدات تلغى بالبارا امينو بنزوئيك اسيد بسبب التنافس البنيوي

الشواهد الإيجابية :

- تستعمل هذه الشواهد للتأكد من ان الجراثيم تستطيع النمو تحت تأثير شروط الاختبار المتبعة وتستعمل لأجل ذلك جراثيم مناسبة وبأعداد قليلة كشواهد إيجابية وتعامل نفس معاملة العينة ومن ثم يلاحظ النمو من عدمه والحكم بالتالي فيما اذا كانت شروط الاختبار ملائمة للنمو الجرثومي ام لا .
- يجب ان تكون الشواهد الإيجابية المستعملة في اجراء اختبار العقامة في حالة الاشكال الصيدلانية المؤلفة من مواد مضادة للجراثيم كالصادات الحيوية من الجراثيم الحساسة للصاد الحيوي الموجود في الشكل الصيدلاني المختبر حيث يؤكد نمو تلك الجراثيم الشاهدة في شروط الاختبار المتبعة على ان عملية ابطال الفاعلية المضادة للجراثيم لذلك الصاد قد تمت بالشكل الأمثل (فمثلا الاميكاسين يؤثر على جراثيم سلبية الغرام اكثر من إيجابية الغرام لذلك يفضل ان يكون الشاهد من الجراثيم سلبية الغرام
- بشكل عام يوصي دستور الادوية البريطاني بإستعمال:
  المكورات العنقودية المذهبة كجرثوم شاهد للنمو في شروط هوائية
  المطثيات chlostridium sporogenes كشاهد للنمو في شروط لاهوائية
  فطور المبيضات البيض كشاهد على نمو الفطور
- يستعمل عمليا اثناء اجراء اختبار العقامة وسط مغذي اضيف له جزء من العينة بالإضافة للشاهد ويدعى بانبوب **الوسط الشاهد الإيجابي** (كلمة إيجابي هنا تدل على وجود العينة)، ووسط مغذي مضاف له الشاهد لم يضف له أي شي من العينة ويدعى **بانبوب الوسط الشاهد السلبي** ، بعد ذلك يراقب النمو في كلا الانبوبين ولكي تكون شروط العمل ملائمة يجب ان يظهر نمو الجرثوم الشاهد على الوسطين معا (الوسط الشاهد الإيجابي والوسط الشاهد السلبي) بالسرعة نفسها والكمية نفسها **حيث يدل ذلك على أن إبطال فعالية المادة المضادة للجراثيم الموجودة في العينة قد تم بشكل جيد**

توضيح مبسط لاجراء اختبار العقامة :

نؤخذ اربع انابيب :

الأول يحوي الوسط الزرعي المناسب (هو يدل على مدى ملائمة الجو المستخدم لاجراء اختبار العقامة)

الثاني يحوي وسط زرعي مناسب مع الشاهد الإيجابي (CFU100-10) (وهو يدل على ملائمة الوسط الزرعي لحدوث نمو مكروبي)

الثالث يحوي وسط زرعي مناسب مع العينة التي تم تعقيمها (لاختبار عقامة الشكل الصيدلاني)

الرابع يحوي وسط زرعي مناسب مع عينة مع الشاهد الإيجابي (ظهور العكر يجب ان يتساوى مع الانبوب الثاني لكي يدل على ان ابطال فعالية المادة المضادة للجراثيم ضمن الشكل الصيدلاني قد تم بشكل جيد)

نقوم بحضن الانابيب الأربعة السابقة لمدة 14 يوم في حال الاشكال الصيدلانية التي عقمت بطريقة الجمع العقيم aseptic (ولمدة 7 أيام للاشكال الصيدلانية التي عقمت بشكلها النهائي) ، **بعد ثلاثة أيام** اذا حدث نمو في الانبوب الأول نلغي الاختبار فورا لان ذلك يعني ان الجو الذي يجري فيه الاختبار ملوث ، حيث في الحالة الطبيعية في اليوم الثالث يجب ان لايحدث نمو في الانبوب الأول وان يحصل نمو في الانبوب الثاني والرابع (يشترط ان يكون النمو في الانبوب الثاني والرابع متماثل من حيث العدد المكروبي لكي يدل على ان الغاء فعالية المادة المضادة للجراثيم قد تم بشكل جيد)

اذا حصل نمو في الانبوب الثالث بعد 14 يوم (بعد 7 أيام) فإختبار العقامة مرفوض والمنتج غير موافق عليه اما اذا كان سلبي النمو عندها يكون الاختبار جيد والعقامة ممتازة

Figure 12.2 Isolator prepared for sterility testing.
Photograph courtesy of Pharmig.

يبين الجدول التالي حجم العينة المأخوذة من التحضيرة وفقا لحجم التحضيرة

عدد العبوات في التحضيرة	الحد الأدنى لحجم العينة المأخوذة
الاشكال الصيدلانية الحشوية (فيال ، حُبابات ، ..... الخ)	
اقل من 100 عبوة	10% او 4 عبوات كحد اقصى
100 عبوة الى 500 عبوة	10 عبوات
اكثر من 500 عبوة	2% او 20 عبوة وليس اقل
الاشكال العينية والسوائل العقيمة الأخرى غير المحقونة	
اقل من 200 عبوة	5% او 2 عبوة ويمكن تجاوز نحو الأكثر
اكثر من 200 عبوة	10 عبوات
عبوات المنتجات الصلبة الكبيرة	
حتى 4 عبوات	يؤخذ من كل العبوات
4 عبوات الى 50 عبوة	20% على ان لايزيد عن 4 عبوات
اكثر من 50 عبوة	2% او 10 عبوات ويمكن ان تكون اقل

pyrogens البيروجينات

Pyrogenicity :

Pyrogens are substances that, when injected into the mammalian body, will cause a variety of symptoms, the most recognizable of which is an increase in core body temperature. The association of fevers (pyrexia) has a long history. When injected into mammals (including humans), at a certain threshold, pyrogens will cause a number of adverse physiological responses. These responses include:

- increased body temperature;
- chilly sensation;
- cutaneous vasoconstriction
- pupillary dilation;
- decrease in respiration;
- increase in arterial blood pressure;
- muscular pain;
- nausea and malaise.

- Of these, a rise in body temperature represents the most common response. the Greek word "pyrogen" (pyro, meaning "fire"; and gen signifying "beginning"). The term pyrogen was first used in 1876.

- Pyrogens can be nonbacterial as well as bacterial in origin .However, the main pyrogen encountered in the pharmaceutical industry is of Gram-negative bacterial origin. That is the lipopolysaccharide (LPS) from the bacterial cell wall

Table 6.4 Sources of pyrogens

Nonbacterial	Bacterial
• Antigens (antibody mediated response) • Poly nucleotides • Steroids • Adjuvants (e.g., muramyl dipeptide) • Viruses • Fungi (yeast, polysaccharide capsules)	• Streptococcal toxins • Staphylococcal enterotoxins • Mycobacterial cell wall components • Bacterial cell wall: lipopolysaccharides (endotoxins)

الية عمل البيروجين :

- البيروجين هو مستضد antigen عند دخوله الى الجسم يرتبط مع اضداد antibodies مما يولد رد فعل التهابي عند الشخص (حرارة ، عرواءات .....) وهي غير مميتة اذا كانت كميتها قليلة تم اكتشافها قديما عام 1820 حيث وجدوا ان حقن الماء المقطر لوحده لدى المريض يسبب زيادة الحرارة وأول دستور تحدث عنها هو الدستورالامريكي عام 1840 ووجد طريقة لكشفها
- البروجينات توثر سلبا بالحجوم الكبيرة اما الحجوم الصغيرة فلاتسبب تأثيرات مميتة

مصادر البيروجينات :

- 1- الماء المستعمل في عمليات تحضير الشكل الصيدلاني المختلفة وهو اول احتمال يجب ان نفكر فيه لانه يدخل على الأقل في 80% من مكونات الاشكال الحقنية ، تجدر الإشارة الى ان عملية التقطير والتحال العكسي تقدم لنا ماء خالي من البيروجينات (المحرّات) وكذلك عملية حفظ الماء (مراشح 0.22 ميكرون تمنع مرور الجراثيم والبذيرات او مراشح 0.45 ميكرون تمنع مرور الجراثيم فقط) يجب ان تمنع دخول أي جرثوم وبالتالي نموه

- 2- **الأجهزة:**

إذا كانت الأجهزة ملوّثة بالجراثيم فيمكن بنتيجة عمليات المعالجة والتعقيم أن تبقى أجزاء الخلايا الجرثومية ملتصقة على سطوح هذه الأجهزة. تلتصق المحرّات بقوة إلى الزجاج والسطوح الأخرى، أيضاً عملية تنظيف الأجهزة وتركها رطبة أو تركها عرضة للرطوبة من الجو يجعل منها وسط ملائم للنمو الجرثومي، ولكن المعالجة بالحرارة الجافة تعيد الأجهزة الملوثة للاستعمال. كما يمكن أن تلتصق المحرّات على البلاستيك ويكون تخليصه منها صعباً ، وهذا ينطبق على العبوات البلاستيكية فإذا تلوثت بالبيروجينات يصعب التخلص منها لذلك يتم رميّها وعدم استعمالها لذلك تم اللجوء الى تقنية النفخ والتعبئة والإغلاق. حيث تدخل المواد البلاستيكية إلى المعمل الدوائي على شكل حثيرات وتتم إذابتها بدرجة حرارة عالية تصل إلى250 - 300 درجة مئوية وعملية الإذابة هذه كافية للتعقيم وإزالة البيروجينات، ثم يتم نفخه (أي تشكيل العبوة)، وبعد تبريده يتم تعبئة المادة الدوائية وإغلاقه.

- 3- المواد المذابة أو المنحلة ضمن الشكل الصيدلاني

يمكن أن تكون مصدراً للمحرّات، خاصةً تلك المُستحصلة بعمليات البلورة أو الترسيب من محاليل مائية ملوّثة حيث تُشبك المحرّات مع المادة خلال عملية التبلور والترسيب، وللتخلص منها يجب إعادة البلورة (بوسط خال من المحرّات) أي نقوم بحل البلورات ونعالج المحلول ونبلور من جديد، أو غسل الرسابة.

يتم التخلص من البيروجينات (المحرّات) بالطرق التالية:

- لتكون المادة خالية من البيروجين يجب ألا يتجاوز محتواها من البيروجين 0.25 bacterial unit/ml endotoxin USP لذلك البيروجين بالحجوم الصغيرة ليس ذو قيمة أما البيروجين بالحجوم الكبيرة له قيمة.
- تتضمن طرق التخلص من البيروجينات :
- 1- الطريقة الأمثل للتخلص من البيروجين هي فعل الأكسدة: ومن طرق التعقيم في الصيدلة التي تعتمد على فعل الأكسدة هي الحرارة الجافة (بدرجة 250 م لمدة 45 دقيقة او 650 م لمدة دقيقة واحدة . اما الحرارة الرطبة غير فعالة ، اما التسخين بحرارة 80-90 م بوجود مادة مؤلكلة او مؤكسدة قوية فهو فعال أيضا .
- 2- يخلص التحال العكسي (الترشيح الفائق) الماء من المحرات الا ان عملية التقطير افضل منهما
- 3- الادمصاص على مواد مدمصة خاصة (وهو قليل الفعالية)
- 4- يفصل التثفيل الفائق المحرّات اعتمادا على وزنها الجزيئي

طرق اختبار الذيفان الداخلي:

أولا اختبار مولدات الحرارة بالأرانب Rabbit Pyrogen Test :

- منذ عام 1942 كانت الأرانب تستخدم لكشف وجود مولدات الحرارة. اختيرت الأرانب لوفرتها وتشابه استجابتها لمولدات الحرارة مع الانسان.
- يتم حقن **المنتج** المراد فحصه في وريد الأذن لعدة أرانب، بجرعة لا تتجاوز 10 مل/كغ. وتراقب حرارتهم لمدة 3ساعات ، حيث تستعمل مقاييس حرارة حساسة بدرجة 0.1 درجة مئوية تدخل في شرج الارنب بطول لايقل عن 7.5 م (يوجد أجهزة اكثر دقة في الأسواق حاليا).
- بالنسبة لتحري البيروجينات في **الأجهزة والأدوات** نقوم بغسلها بسائل خالي من المحرات، ثم تحقن نواتج الغسل في وريد الارانب.
- **ترفض** المادة المفحوصة في حال:
- ارتفاع حرارة نصف الأرانب بمقدار **0.6 درجة مئوية** على الأقل.
- او ارتفاع حرارة كل الأرانب بمتوسط قدره **0.5 درجة** على الأقل.
- ان هذا الاختبار يكشف كافة أنواع البيروجينات بأنواعها
- محددات هذا الاختبار :

1- تختلف الحالة الفيزيولوجية من حيوان الى اخر مع اختلاف تغذية الحيوان وخلوه من الامراض
2- حساسية الارانب للمحرات تبين الدراسات ان هنالك حالات من عدم قدرة الحيوان على كشف وجود المحرات وذلك نتيجة عدم تحسس الحيوانات لها
3- بعض الأدوية لا يمكن اجراء هذا الاختبار معها لأنها ذات تأثير يرفع حرارة الجسم مثل البروستاغلنديات ومضادات السرطان.

ثانيا اختبار حلالة الخلايا المتحولية لسرطان حدوة الحصان Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

- ثم تم اكتشاف خواص دم سرطان حدوة الحصان horseshoe crab (Limulus polyphemus)

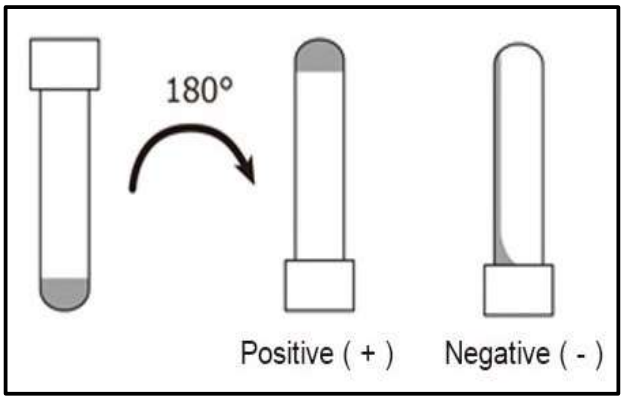
الذي يتميز بأنه يتخثر عند تعرضه للاندوتوكسين ، لاحقا عام 1974 تم اعتماد الاختبار من قبل هيئة الغذاء و الدواء الامريكية FDA تحت اسم حلالة الخلايا المتحولية لسرطان حدوة الحصان (بلازما سرطان حدوة الفرس) Limulus Amebocyte Lysate (LAL) لكشف أو معايرة الذيفان الداخلي

- الحلالة المتحولية Amoebocyte lysate تحضر بتجفيد (تجفيف بالتجميد) الكريات البيض المتحولية لسرطان حدوة الحصان ثم تحل الجفادة في ماء خاص خالي من الاندونتوكسين

لدينا ثلاثة طرق لاجراء اختبار LAL :

1- طريقة العلقة Gel-Clot technique :

تعتمد على تشكيل علقة كالجيل gel، وهي الأكثر استخداما :وهي الأكثر استخداما



- تمزج كمية متساوية من العينة (ماء، دواء) مع حلالة الخلايا المتحولية في أنبوب اختبار
- تحضن في الدرجة 37 مئوية لمدة 60 دقيقة
- يقلب الأنبوب ويلحظ تشكل علقة أو جيل ملتصقة في قعر الأنبوب دليل على وجود كمية كافية من الذيفان الداخلي
- هذا الاختبار متوفر في الأسواق السورية (الاختبار المعتمد في سوريا)

- **2- طريقة قياس العكارة Turbidimetric Technique** : في هذه الطريقة يمكن معايرة كمية الذيفان الداخلي التي تتناسب مع سرعة تشكل العكر المقاس بجهاز الطيف الضوئي.

- **3- الطريقة اللونية Chromogenic Technique :** التي تعتمد على تشكل لون نتيجة تفكك مقعد ببتيد - مولد لون. أيضا تمكننا من معايرة كمية الذيفان الداخلي التي تتناسب مع شدة اللون المقاس بجهاز الطيف الضوئي.

سلبيات اختبار LAL :

بالرغم من كل مايتصف به هذا الاختبار من سرعة وسهولة وحساسية عالية وقلة تكلفة وانه يتم في الزجاج الا ان هنالك بعض المحددات :

- يكشف فقط البيروجينات من نوع الاندوتوكسين.
- بعض الأدوية تثبط التخثر مثل مضادات التخثر فلا يمكن اجراء الاختبار عليها.
- بعض أنواع الاندوتوكسنات لا تعطي نتيجة إيجابية بهذا الاختبار.

- يوجد اختبار غير دستوري للكشف عن البيروجينات هو الكشف عن أجزاء محددة (الحموض الدسمة 3-OH FAs النوعية الموجودة في الليبوبولي سكاريد للجراثيم سلبية الغرام والكشف عن حمض الموراميك الموجود في الببتيدوغليكان للجراثيم السلبية والايجابية الغرام) بإستخدام طريقة صعبة ومكلفة لكنها دقيقة وذلك باستخدام جهاز كروموتوغراف الغازي او الاستشراب الغازي (GC-MS) gas chromatography- tandem mass spectrometry