

# Counting, Detecting and identifying microorganisms

تفريغ تعقيم

Lec . 1

محاضرة:

ياسمين خليل

الصيدلانية:



لجان الزفعات





اللهم علّنا ما ينفعنا، وانفعنا بما علمتنا، وزدنا علما

# Counting, Detecting and identifying microorganisms

Chapter 15&18

# Key Facts مفهوم يشير إلى عدد + نوع الكائنات الدقيقة الموجودة في مادة خام / دواء / جهاز طبي . بهدف !!

تُقاس بهدف التأكد من قلو هذه المنتجات

- **Bioburden:** the number and type of microorganisms (MO) present in or on a pharmaceutical raw material, medicine, or medical device كما قد يسبب ضرر للمريض مثل E.coli or S.aureus + وجودها راجع تأثير على جودة المنتج وسلامته و حتى أثناء تصنيعه في حال وجود MO خارج يكونه الناتج زي المتوقع والمطلوب

- **Pharmacopeias describe procedures for:** تحديد الحد المسموح به من البكتيريا و MO في المنتجات (nonsterile)

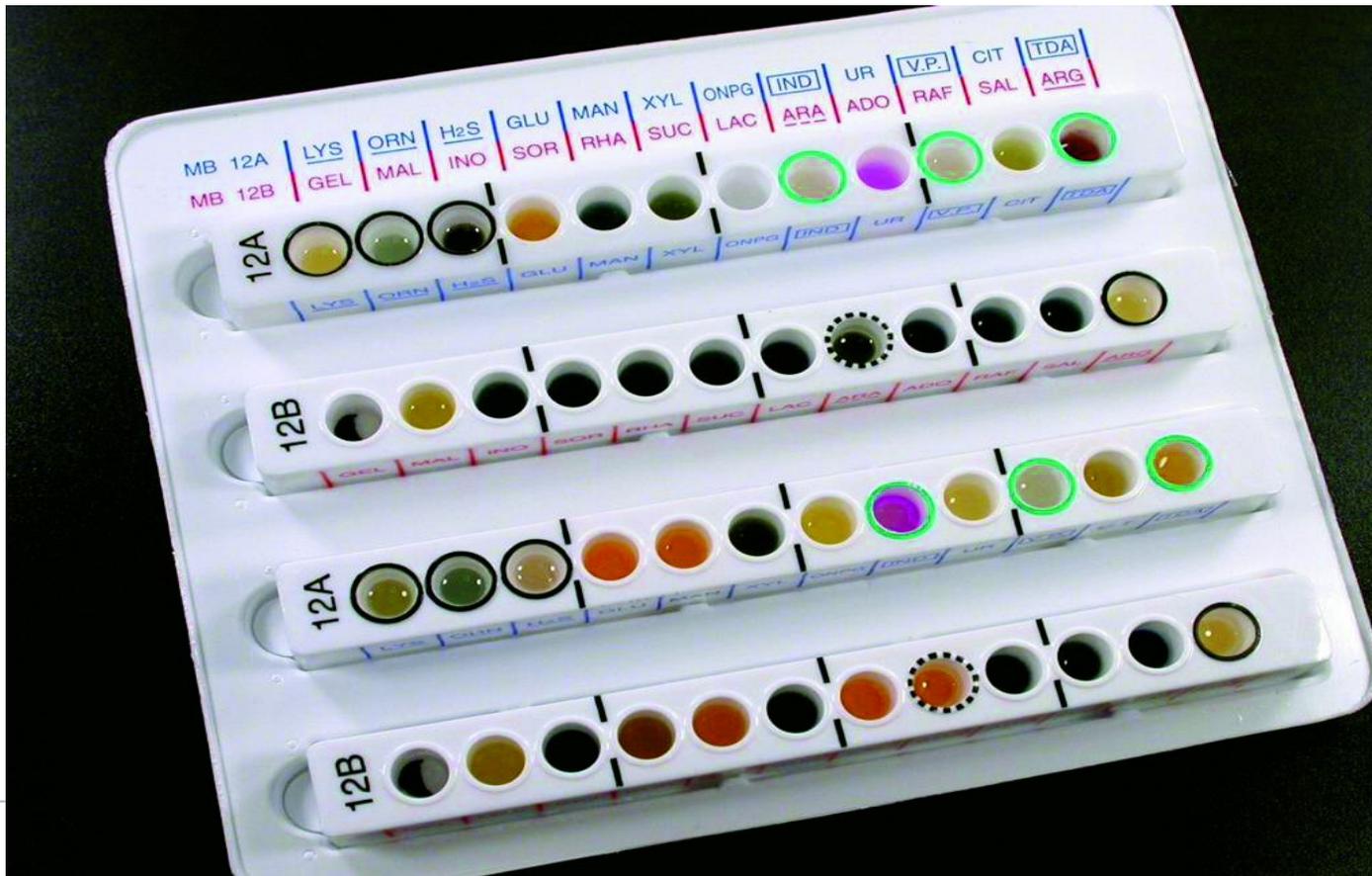
- Procedures for counting microorganisms اختبارها عدم وجود +
- Procedures for confirming the absence of named objectionable MO أنواع معينة من MO
- Specifications for the max permitted levels of bacteria and fungi for the different categories of nonsterile medicine

هدول صا بي الاهم يكونوا حو لودين Requirements for the absence of one or more of the major objectionable MO: E.coli, Salmonella species, Staph aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Candida albicans



# Key Facts

- Commercially available test kits and automated instruments are available for identifying different categories of bacteria and yeasts



# Key Facts

- **Objectionable:** → هي الكائنات الاله قيفه الي صكه تكونه  
ظيره اذا وجدت في الادويه وهذا السبب:  
①
- Because it is a pathogen so its presence in a medicine may cause an infection (E.coli & Staph aureus are pathogens □ health hazards)   
وجود هذه MO في اصاكنه صتن لازم تتواجد فيها  
دليل على
- Its presence may be indicative of poor-quality raw materials or poor manufacturing procedures

## Gelatin: test for absence of E. coli and Salmonella

يستخدم في صناعة  
الكبسولات 

رب اني لما انزلت  
الي من ضمير فقير

صاننسي !نننا عدد / نوع

الكائنات الحية الموجودة في

المواد الخام ...

• ويتم قياسه كإجمالي عدد MD =

TVC = Total Viable Counts واسمها

# Bioburden

- Determination of bioburden **quantitatively**: to count the organisms present □ Total Viable Count (TVC) ليتم القياس!
- Bioburden test □ the most common microbiological test undertaken in the pharmaceutical industry:
  - Raw material (including water) → \* ضمان جودة المواد الخام مثل الماء والمواد الفعالة.
  - Finished products → تحديد مدى التلوث النهائي للمنتج النهائي
  - Various stages during manufacturing process ← و اكتشف عن التلوث الحاصل في مراحل التصنيع ؛ بإعداد تحسينات إجراءات وتقليل المخاطر و ضمان التحسين في العمليات إلى بعد

طوره تقليدياً من خلال تراجعتها في وسط غذائي ورصد نمو المستعمرات  
من خلال عدّة خطوات

## Traditional counting methods:

- Place a sample of the material to be tested onto or into gelled culture medium in a petri dish (plate) and counting the visible colonies that arise after incubation
- A single colony may develop from an individual cell or from a group of cells attached or clumped together □ count is expressed as colony forming unit (CFU) and not cells per ml or gram.
- USP states that petri dishes containing between 25-250 colonies produce reliable bioburden results

توضع العينة من المادة

المواد اذتبارها على وسط غذائي

عقد داخل

بيترى وبعد بين بنه

المستعمرات الناتجة بعد فترة الرضانه



يحدد USP انه الطهره الي حد

مستعمرات (25-250) يكونه نتائج

صوتوقة ، ايضا لو كانت اقل من 25 خبانه دليل على التلوث ، بس لو

أكثر من 250 يكون العد هصب ورح يؤدي الي تقديران عني  
صحيحة

### High Bioburden materials:

بعض المواد بطبيعتها فيها مستوى صاير بي عالي لانها ما يكونه صحتة عند استخراجها ، مثل:

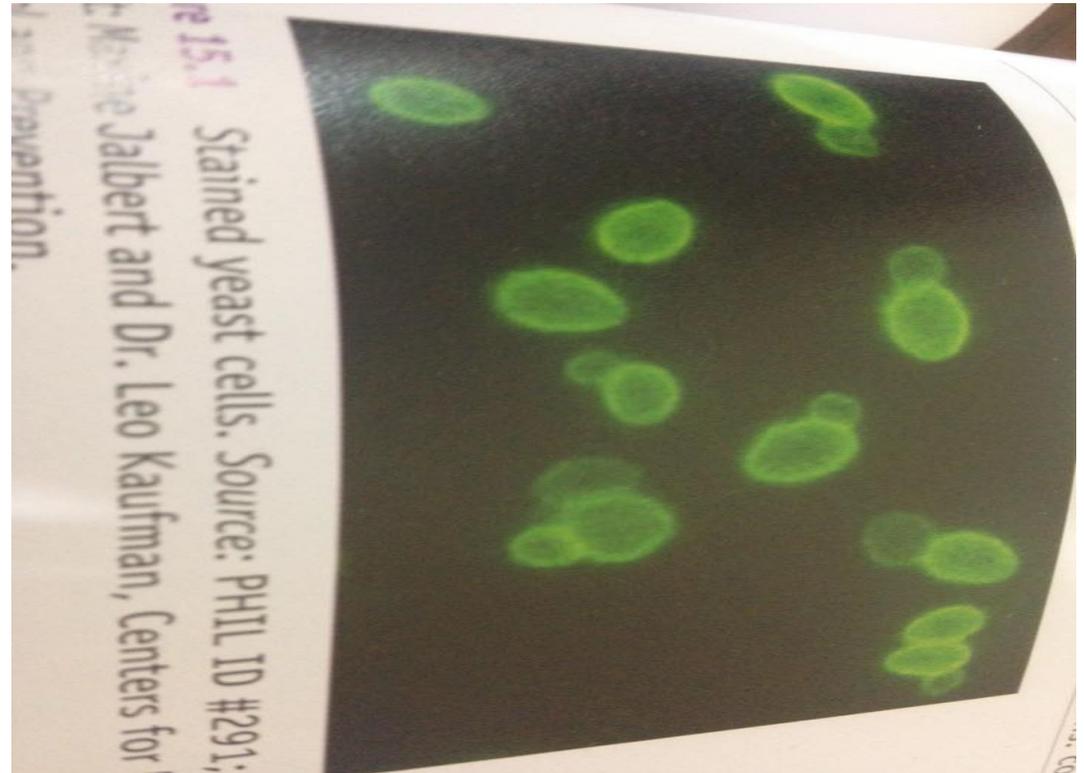
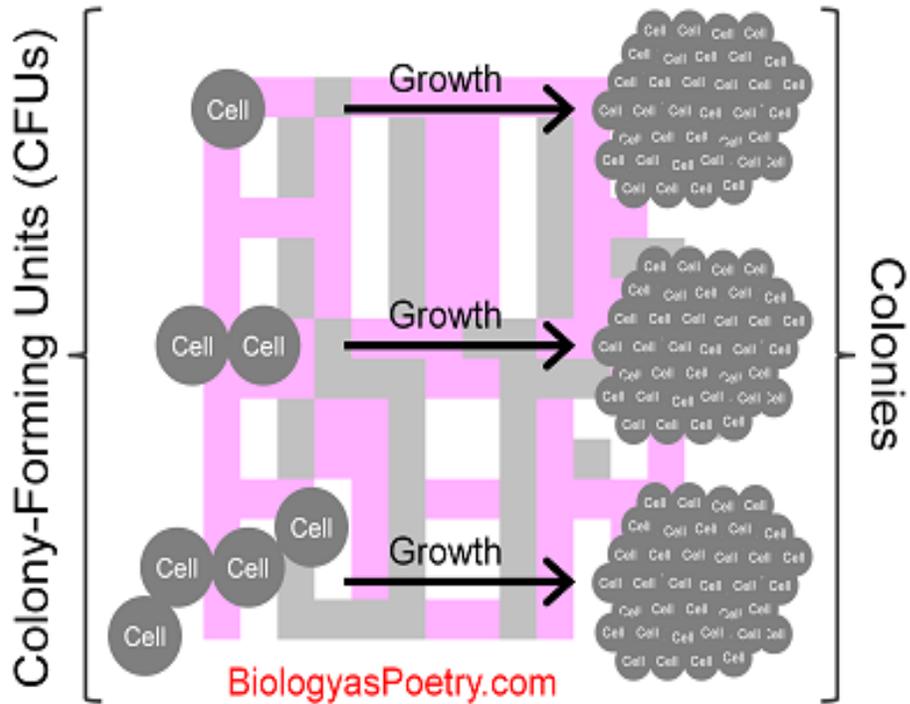
- Mined minerals (talc, kaolin, bentonite)

المعادنه المستخرجه

- Vegetable origin (starches, gums, thickening agents)

مواد ذات أصل نباتي .

# Traditional counting methods



# Traditional counting methods

السهم لهم أبيضهم و اغفر له و تجاوز عنه

- Dilution is necessary for material with a high bioburden, why?  
سبب تخفيف العينة هو الحصول على عدد مناسب من المستعمرات و يمكن من عدّها بسهولة  
كأنه دونه تخفيف ربع تتداخل المستعمرات مع بعض و يمكن تجاوز 250 مستعمرة في صحن عدّها
- to achieve a countable number of colonies on the plate

Perform a series of dilution (tenfold increments)



إضافة

كيف يتم التخفيف؟ (Dilution Process)

يتم التخفيف باستخدام تخفيفات عشرية (Tenfold Dilutions)، أي تخفيف العينة بنسبة 1:10 في كل خطوة، كالتالي:

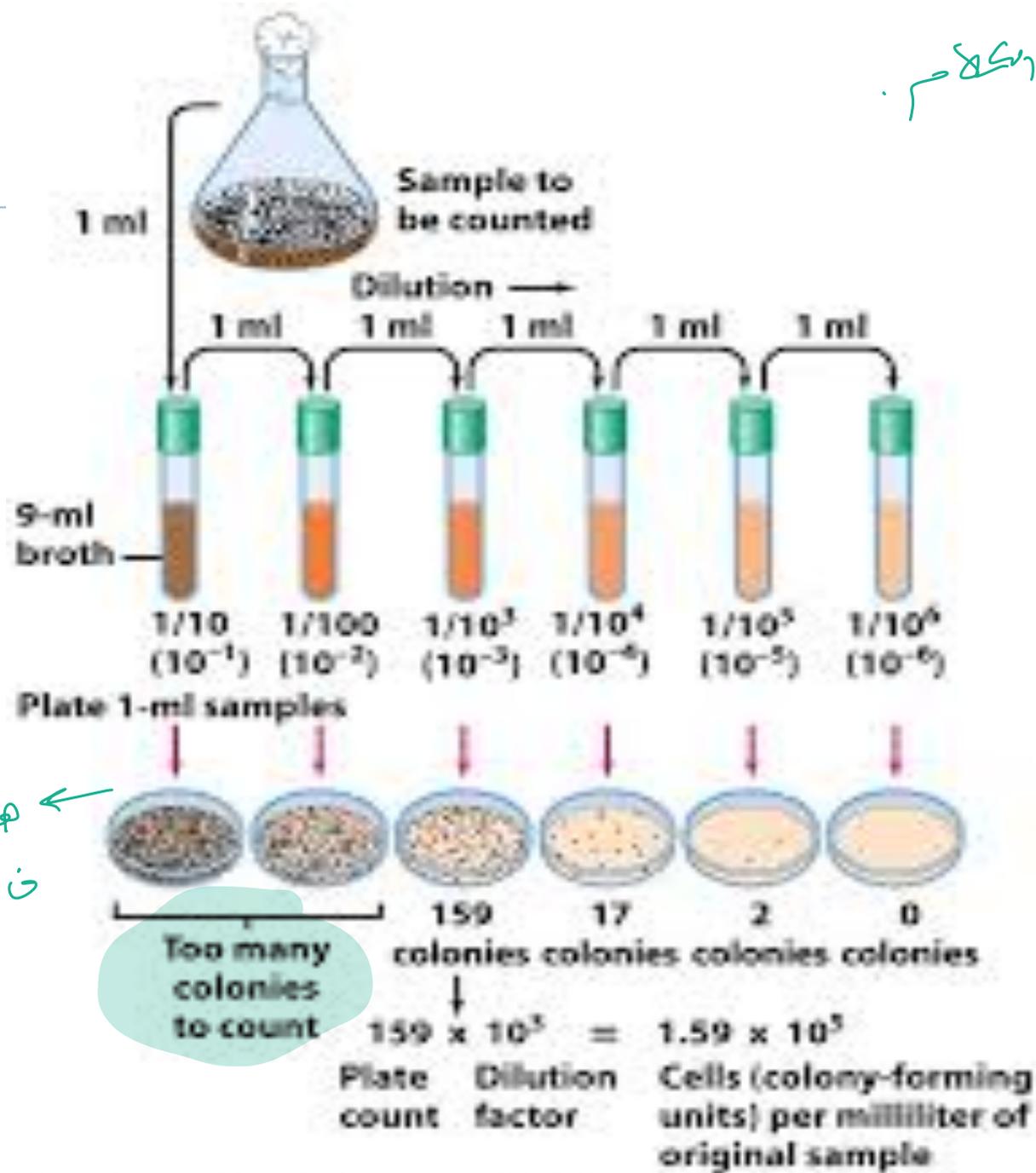
1. أخذ 1 مل من العينة الأصلية وخلطه مع 9 مل من محلول معقم → (تخفيف 1/10 أو  $10^{-1}$ ).

2. أخذ 1 مل من التخفيف الأول ونقله إلى أنبوب جديد يحتوي على 9 مل من محلول معقم → (تخفيف 1/100 أو  $10^{-2}$ ).

3. تكرار العملية للحصول على تخفيفات مثل  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ... وهكذا حتى يتم الوصول إلى تركيز مناسب للعد.

4. يتم زراعة كل تخفيف على طبق بتري، وبعد الحضانة يتم اختيار الطبق الذي يحتوي على عدد مستعمرات يمكن عدّه بسهولة (25-250)

نفس الكلاس



هدول ما تخففوا  
في صابنة رنعة هم

Figure 5-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# Traditional counting methods:

## Pour plates method

1. يتم تحضير وسط غذائي سائل معقم.

2. يتم أخذ عينة من المادة المراد اختبارها (بعد التخفيف إن كان هناك حاجة لذلك) وإضافتها إلى وسط الزرع السائل.

3. يُصب الخليط في طبق بتري.

4. يُترك الطبق ليبرد ويتجمد وسط الزرع.

5. بعد الحضانة، تُعد المستعمرات التي نمت داخل الطبق

الأطباق المصبوبة

① Pour plates (most popular)

الأطباق الموزعة

② Spread plates

طريقة لتر شايح بالفنشاء

③ Membrane filter method

④ Most probable number method

طريقة العدد الأكثر احتمالاً

## Membrane filter method

1. يتم أخذ عينة من المادة واستخدام غشاء مرشح (membrane filter) لفصل الكائنات الحية الدقيقة.

2. يُوضع الغشاء المملوء بالكائنات الدقيقة على وسط غذائي صلب.

3. بعد الحضانة، تُعد المستعمرات التي تنمو على سطح الغشاء

## Spread plates.

1. يتم وضع عينة من المادة على سطح وسط الزرع الجاف في طبق بتري.

2. يتم استخدام أداة معقمة (مثل العصا الموزعة) لنشر العينة بالتساوي على السطح.

3. يُترك الطبق لينمو المستعمرات بعد الحضانة

## Most probable number (MPN)

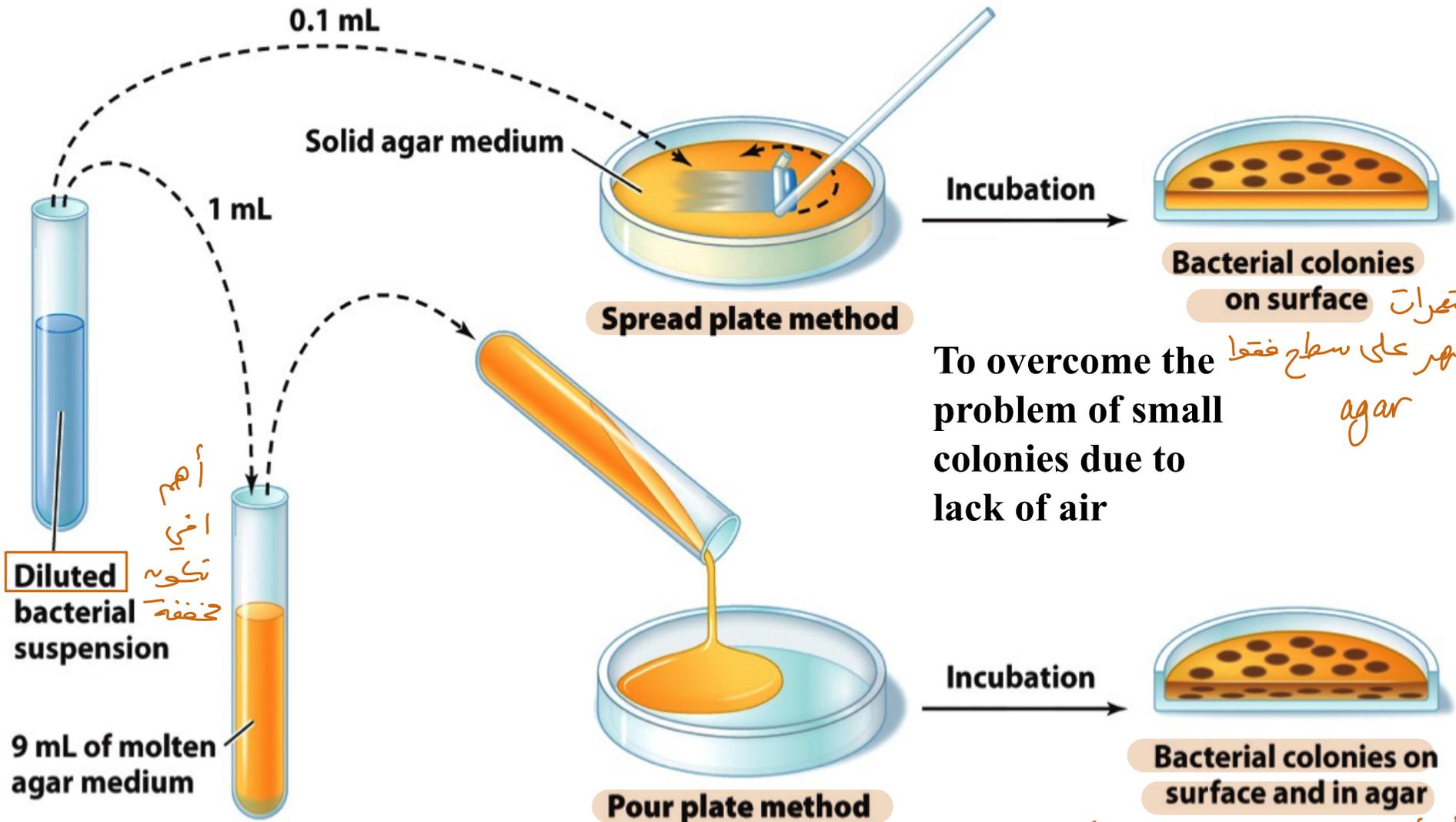
1. تُستخدم هذه الطريقة عادة لتحديد عدد الكائنات الدقيقة في السوائل مثل المياه.

2. يتم أخذ عينات من المادة وتخفيفها تدريجياً.

3. يتم وضع العينات المخففة في عدة أنابيب تحتوي على وسط غذائي.

4. يتم مراقبة نمو المستعمرات في الأنابيب.

5. يتم حساب أكثر عدد محتمل من الكائنات الدقيقة بناءً على أنماط النمو التي لوحظت في الأنابيب



Sterile glass or plastic "hockey-stick" spreader

Incubation

Spread plate method

Bacterial colonies on surface

المستعمرات

To overcome the problem of small colonies due to lack of air

تظهر على سطح فقط agar

Incubation

Pour plate method

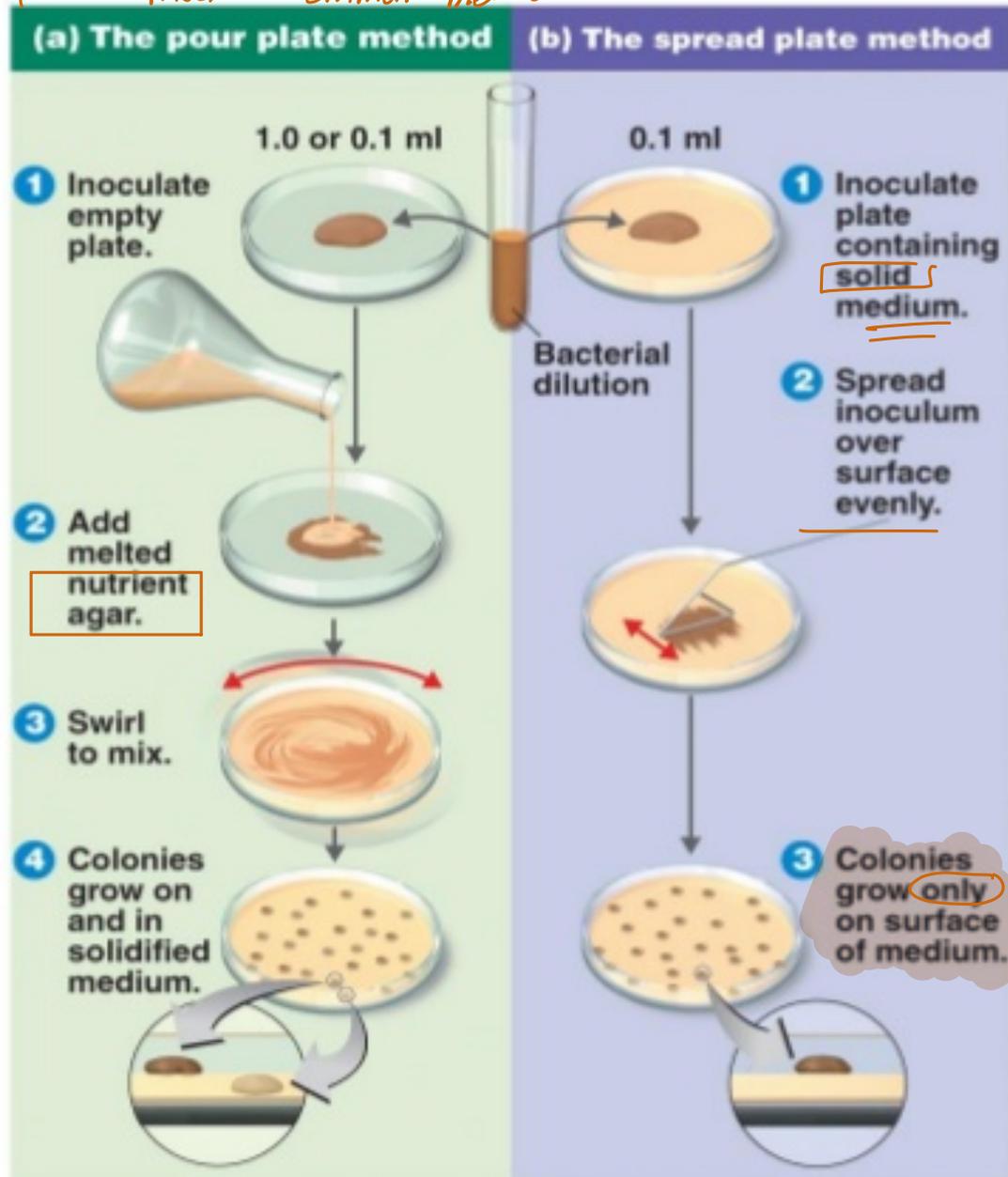
Bacterial colonies on surface and in agar

أما الطريقة الأكثر شيوعاً

تظهر المستعمرات فيها على سطح + داخل agar

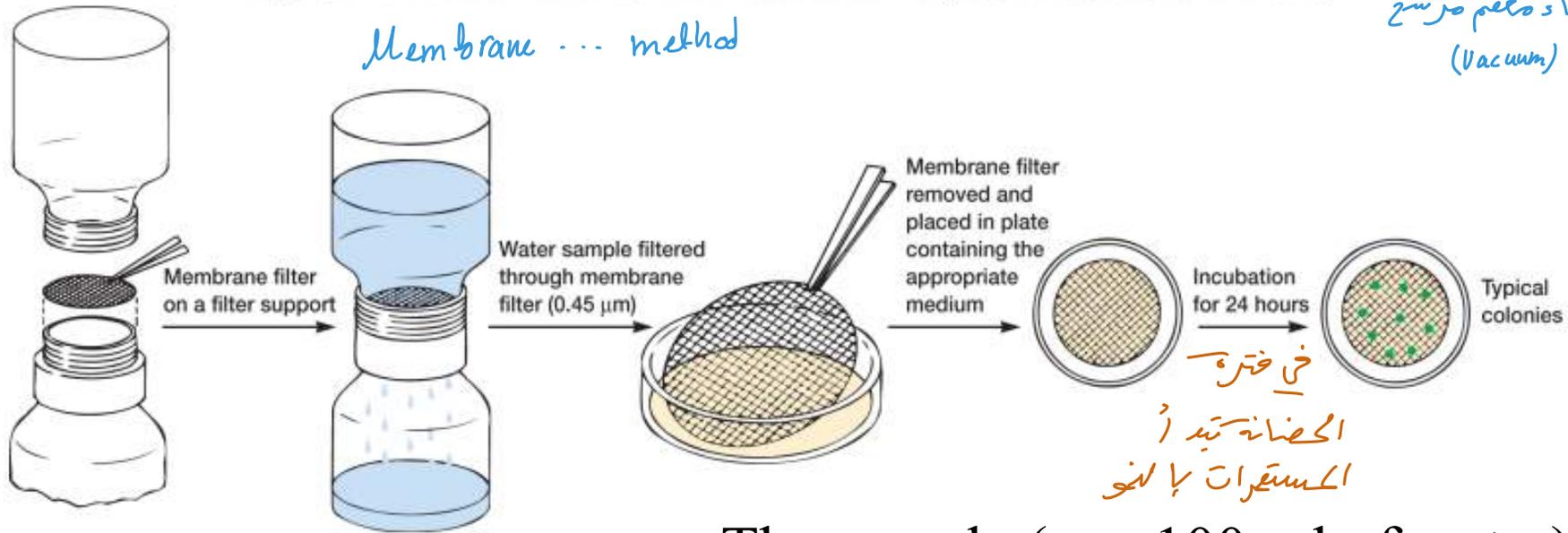
→ The most common method

- Plating serial dilutions of the specimen
- Pour plate method
- Spread plate method

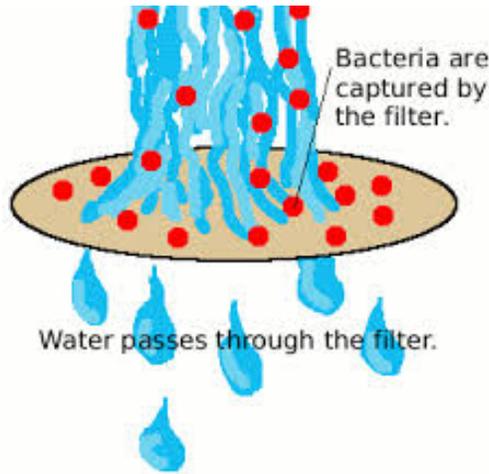


المختصر منها هو تمرير عينة  
من السائل عبر غشاء صلب معقم مرشح  
تحت تأثير التفوؤ (Vacuum)

### Membrane ... method



- The sample (e.g. 100 ml of water) is passed under vacuum through a sterile filter membrane with pore size that is small to retain all contaminating MO on its surface (usually 0.45 µm)



يتم التعبير عن النتيجة بوحدة (CFU/100 ml) لتحديد مدى تلوث العينة

# Membrane filter method

## Advantages:

- For low bioburden material like Purified water EP  required to have no more than 100 CFU/ml  
*الماء النقي مش لازم يحتوي على أكثر من 100 CFU/ml*
- Can be used to determine concentration of organisms in oils or ointments (after dispersing it in oil)  
*بالإضافة إنه هاي التقنية يمكن استخدامها لتحديد تركيز 100 في الزيوت والمواد  
في عن طريق الترشيح روح تعلقه 100 على الفشار*
- The best method if the sample is likely to contain antimicrobial chemicals (preservatives)  
*لأنه رجعنا المواد فيها مواد حافظه لقتل البكتيريا، صايبو نزل دقة  
العد بالطره التقليديه، بس لو استعملنا طريقه الترشيح روح تعلقه المايكروبان وتنزل برده  
قبل صايبو نزل هاي المواد الحافظه عليها بالنهاي بنحصل على نتائج أكثر دقة.*

\* هاد الجدول يبين إن نبي مواد مضادة تعمل على تثبيط نمو البكتيريا في لوند ما مستعمل يكون عدد المستقرات صحيح ، ف السؤال ؟  
صنطانات الكواد المضادة هو الحل كإنها تعمل على تعطيل الكواد المضادة بالتالي روح تستعمل 40 بالفوق يكون عدد ها صحيح كما نفذها

Antimicrobial agent مواد مضادة

Quaternary ammonium compounds,  
parabens and chlorhexidine

Thimerosal and other mercurials

Beta-Lactam antibiotics

Phenols, alcohols and weak acid  
preservatives

inactivator صنطانات  
خاصة بالكواد المضادة

Lecithin with or without Polysorbate  
(Tween) 80

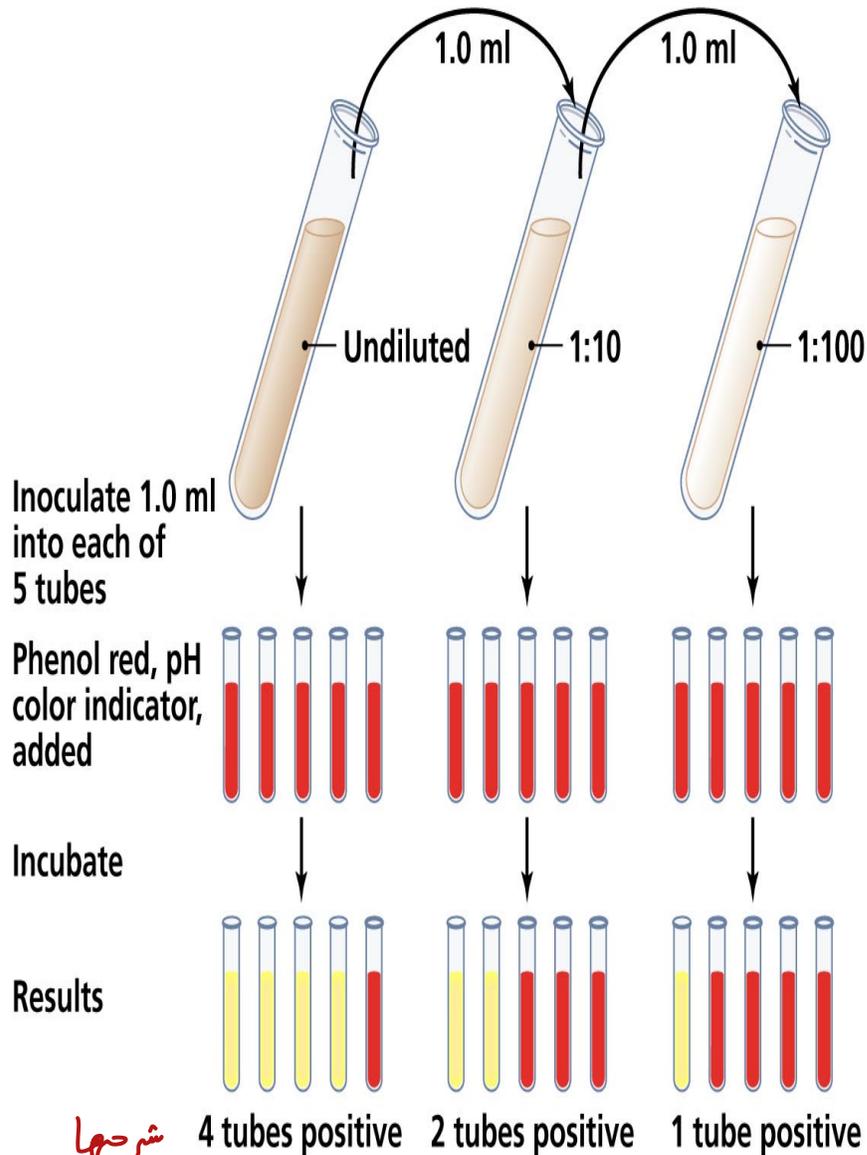
Sodium thioglycolate

Beta-lactamase

Dilution alone

MPN is used when the sample contains insoluble material that would interfere with plate counts as in herbal products

استغفون ربّي وأتوب إليهن



شرحها

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

## INDIRECT MEASUREMENTS: MPN

- Multiple Tube Fermentation Test as measured in MPN or Most probable Number
- Count positive tubes and compare to statistical MPN table.

Combination of Positives	MPN Index/ 100 ml	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

Parungao-Balolong 2011

ما هي؟

طريقة MPN هي قياس غير مباشر يستخدم لتقدير عدد البكتيريا في عينة سائلة، خاصة عندما تحتوي العينة على مواد غير قابلة للذوبان قد تتداخل مع طرق العد التقليدية مثل الطريقة الصفحية (plate count method).

كيف تعمل؟

1. تحضير التخفيفات:

• يتم تخفيف العينة الأصلية تدريجيًا (مثلاً: 1:10، 1:100) في أنابيب تحتوي على وسط غذائي.

2. تلقح الأنابيب:

• يتم تلقح عدة أنابيب (5 لكل تخفيف) بكمية معينة من العينة (مثلاً 1 مل).

• يضاف دليل لون (مثل Phenol Red) لتحديد التغيرات في درجة الحموضة نتيجة نمو البكتيريا.

3. التحضين (Incubation):

• يتم وضع الأنابيب في حاضنة بدرجة حرارة مناسبة لنمو البكتيريا.

4. تحديد النتائج:

• الأنابيب التي يظهر فيها تغيير لون الوسط (أو ظهور فقاعات غازية إذا كان الاختبار يعتمد على التخمر) تُعتبر موجبة (+)، أي تحتوي على بكتيريا.

• يتم تسجيل عدد الأنابيب الموجبة لكل تخفيف.

5. مقارنة النتائج بجدول MPN:

• يتم مقارنة عدد الأنابيب الموجبة لكل تخفيف مع جدول MPN (الموضح في الصورة).

• الجدول يعطي تقديرًا إحصائيًا لعدد البكتيريا في العينة الأصلية بوحدة CFU/100ml.

سبباً لله الله و بقره  
حدود خلقه و رزقها نفسه  
وزنه عرشه و صداد كلماته

## Calculation of concentration of MOs in a sample

Table 15.3 Specimen results from a viable count.

Dilution	Dilution factor	Colony count 1	Colony count 2	Colony count 3
A	$10^1$	TNTC <sup>a</sup>	TNTC	TNTC
B	$10^2$	TNTC	TNTC	TNTC
C	$10^3$	453	521	419
D	$10^4$	85	79	81
E	$10^5$	7	6	8
F	$10^6$	0	1	0

<sup>a</sup>TNTC = too numerous to count.

# طريقة الكشف عن MO غير المقبولة

## Detection of objectionable MOs

- Non sterile dosage forms may contain some MOs  
*قد تحتوي على MO مهم*  
*الأشكال الصيدلانية غير المعقولة*
  - The quality of non sterile products is controlled by pharmacopeia in two ways:
    - Limit on total number or concentration of MO that may be present  
*تحدد الحد الأقصى لإجمالي عدد/تركيز MO في المنتج عن طريق قياسها إما بـ TVC أو Burden test*
    - Particular objectionable organisms must be absent in a specified weight of material:  
*ضمان غياب MO غير المقبولة [objectionable] عن كمية محددة من المنتج ← مثل لو كانت بكتيريا معينة طابري إليها.*
- e.g. EP quality gelatin □ Salmonella should be absent in a 10g sample and E.coli absent in 1 g sample

صافي أمثلة على MO objectionable و يتم تركيزهم المحدود و لا يتم تجاوزها في المنتج

يا هي يا قيوم برحمتك  
استغيت ، اهلعي شأني  
كله وما تكلني ابي نفسي

طرفه عين

## Detection of objectionable MOs

- Dissolution or dispersal of the sample in a suitable liquid culture medium and , where necessary, inactivation of any substances that might inhibit the growth of the organism under test

- Enrichment: increasing the relative concentration of the test organism by growing in a liquid medium that inhibit other contaminants but allows free multiplication of the organism of interest

- Streaking liquid cultures from step 2 onto selective agar media that usually permit easy recognition of any colonies of the test organism that might arise

↓  
شرحها  
تحت

- The use of specific biochemical or immunological confirmatory tests (test kits)

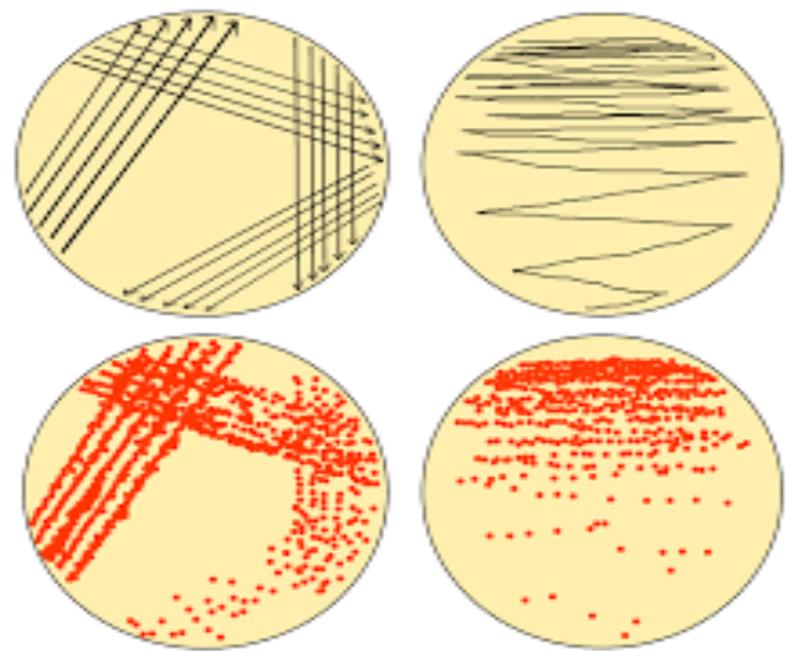
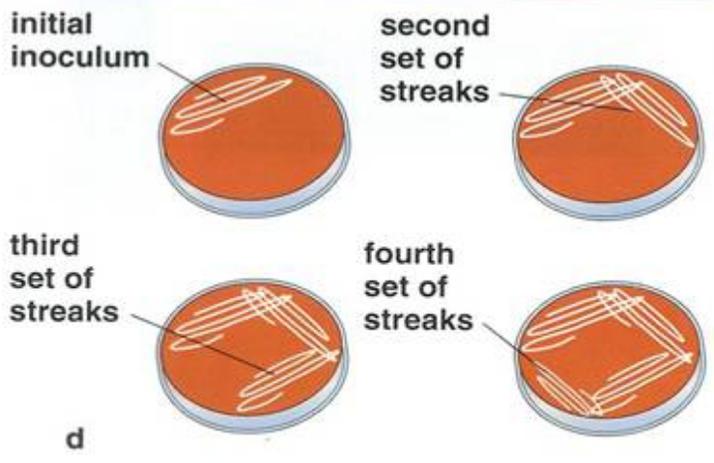
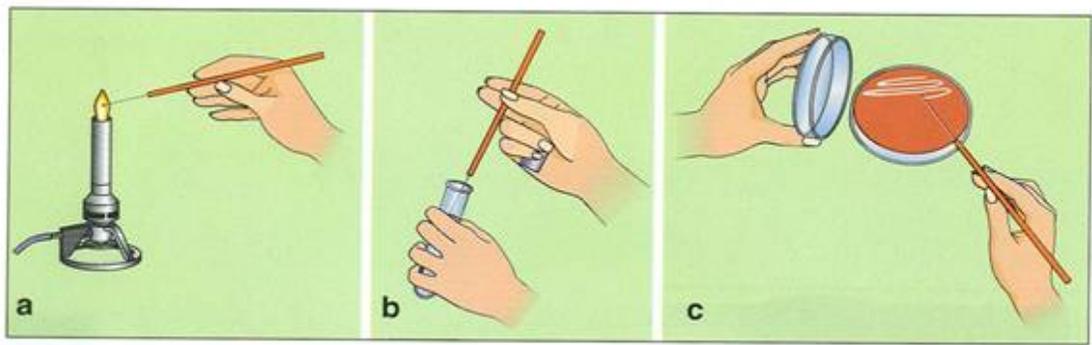
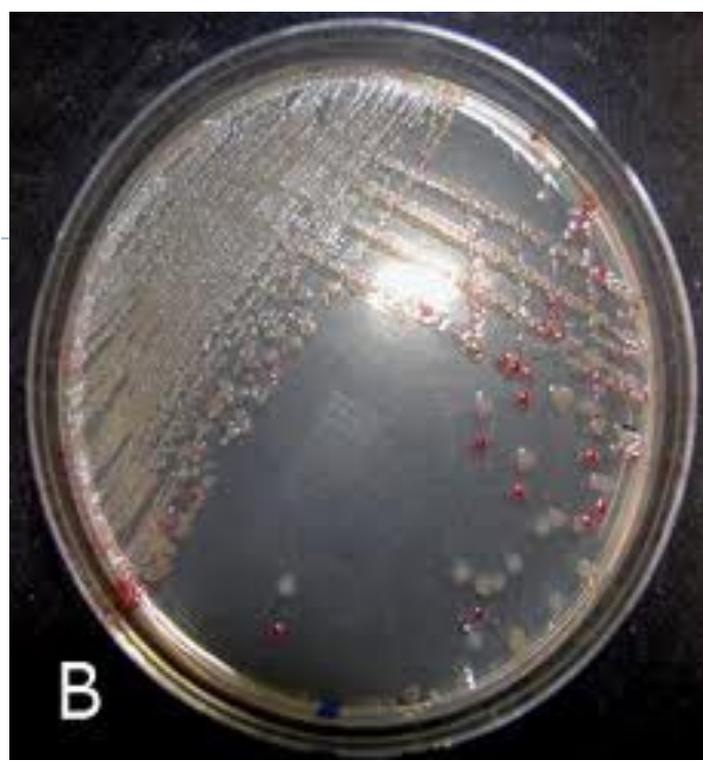
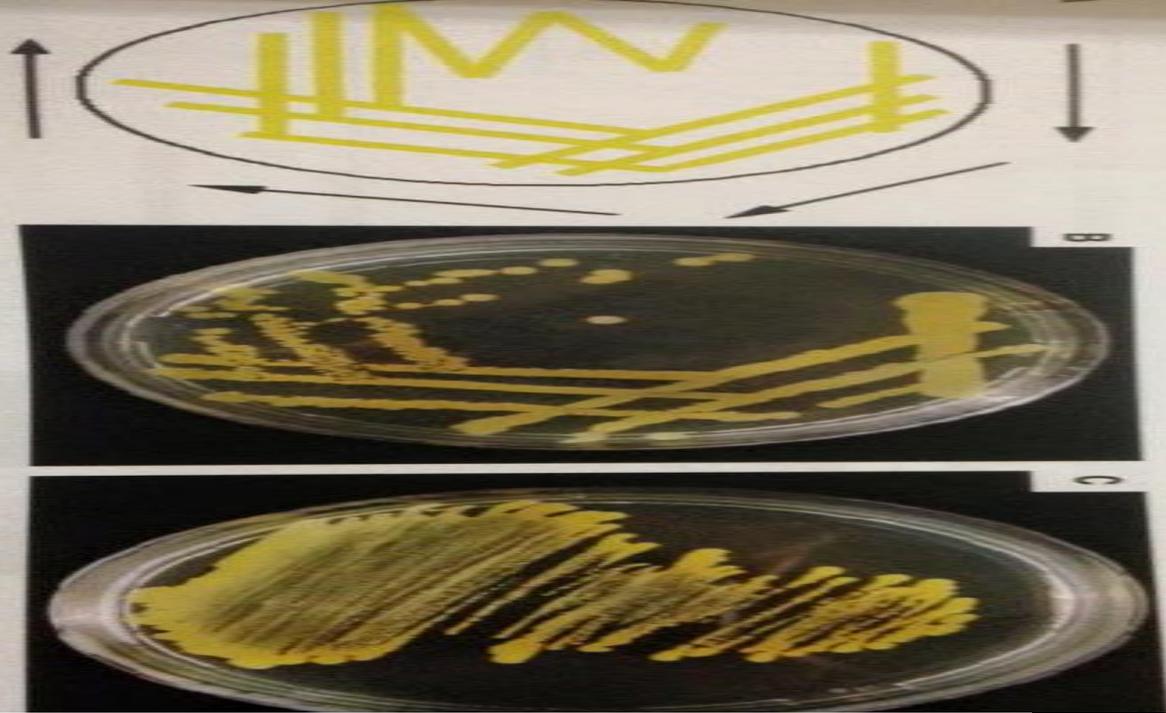
1. الذوبان أو التوزيع في وسط ثقافي سائل مناسب: في هذه الخطوة، يتم إذابة العينة أو توزيعها في وسط سائل يسمح بنمو الكائنات الدقيقة، ويشمل ذلك أحيانًا تعطيل المواد التي قد تمنع نمو الكائنات الدقيقة المراد اختبارها.

2. التخصيب: هذه الخطوة تهدف إلى زيادة تركيز الكائنات الدقيقة المستهدفة عن طريق زراعتها في وسط سائل يمنع نمو الملوثات الأخرى، ولكنه يسمح بنمو الكائنات الدقيقة المراد اختبارها.

3. الزراعة على أطباق أجار انتقائية: يتم أخذ عينات من الثقافة السائلة (التي تم تحضيرها في الخطوة الثانية) وزراعتها على أوساط أجار انتقائية. هذه الأوساط مصممة للسماح بالكشف بسهولة عن أي مستعمرات للكائنات الدقيقة المستهدفة.

4. استخدام اختبارات بيولوجية أو مناعية تأكيدية: في هذه الخطوة، تُستخدم اختبارات بيولوجية أو مناعية خاصة (مثل أطقم الاختبار) لتأكيد نوع الكائنات الدقيقة المكتشفة، وذلك من خلال تفاعل محدد.

Figure 2.3 Streaking a Petri dish to give isolated colonies and check culture purity (see text).



## Detection of objectionable MOs

---

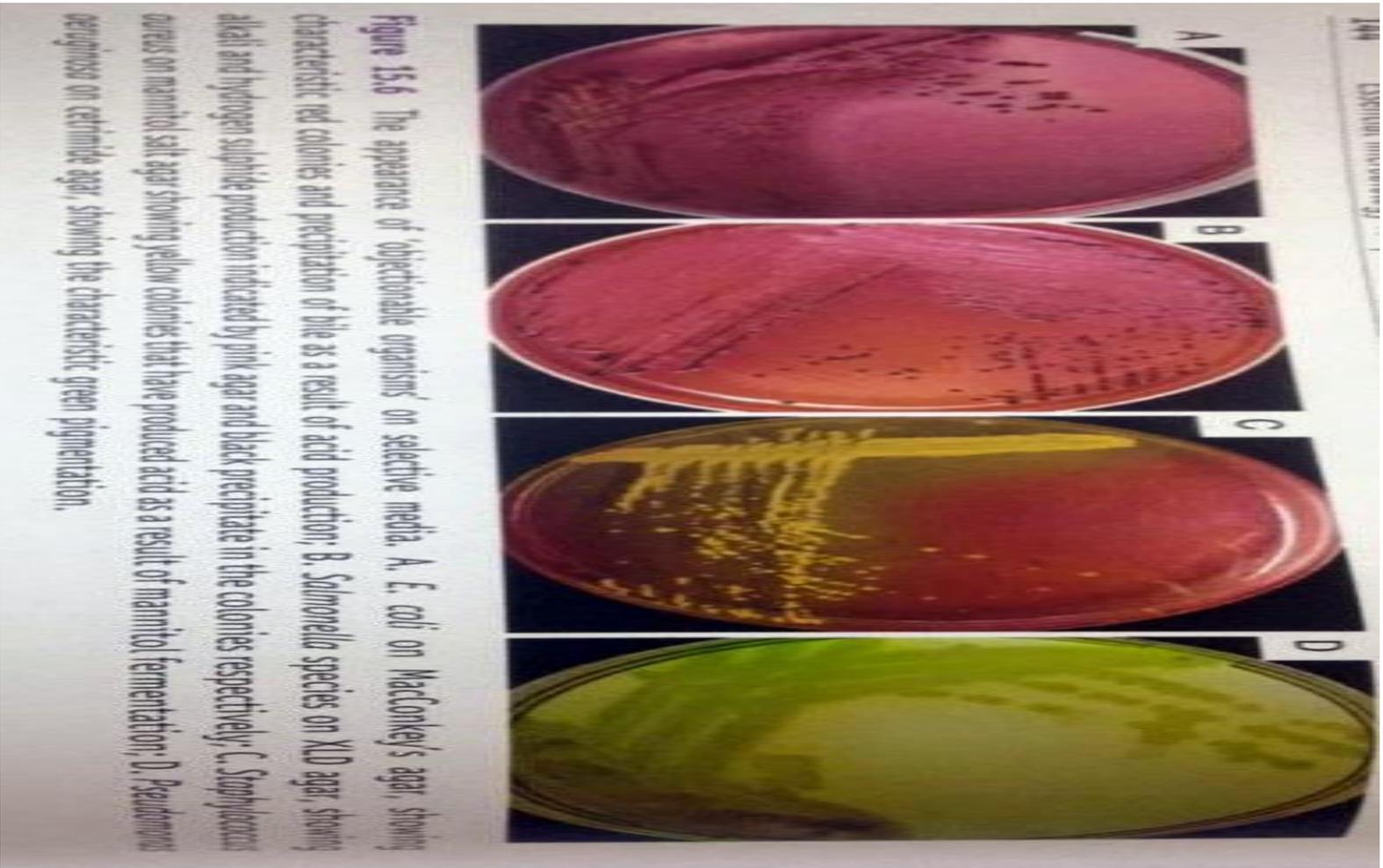
- Selective agar media recommended in the pharmacopeias: هاي هي الأوساط النموصي بيها للكشف عن MOs
- MacConkey's agar for E. coli
- XLD agar for Salmonella species
- Mannitol salt agar for Staphylococcus aureus
- Cetrimide agar for Pseudomonas aeruginosa

اللهم صلّ وسلم وبارك على محمد

---



# Detection of objectionable MOs



# Automated bioburden determinations

- Bases of the methods
- Limited application
- Look for pg 144

## Bioburden specifications in the pharmacopeias

**Table 15.4** Quality criteria for nonsterile medicines.

Route of administration <sup>a</sup>	Maximum total aerobic microbial count CFU/g or ml	Maximum total yeast and mould count CFU/g or ml	Specified microorganisms absent in 1 g or 1 ml
Nonaqueous oral products	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Absence of <i>E. coli</i>
Aqueous oral products	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>E. coli</i>
Rectal products	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	
Oral mucosal, gingival, cutaneous, nasal and ear products	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staph. aureus</i> and <i>Ps. aeruginosa</i>
Vaginal products	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staph. aureus</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> and <i>Candida albicans</i>
Inhalation products (excluding nebulized liquids)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staph. aureus</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> and bile-tolerant Gram-negative bacteria

- اللهم اغفر لي ولوالدي وللمسلمين والمسلمات والمؤمنين والمؤمنات والأصفياء والأصوات .
- اللهم ارحم أئمتهم واغفر لهم واحتقنا من النار وأجمعهم وأهلهم في الفردوس الأعلى .
- اللهم اعتق رقابنا ووالدنا والمسلمين من النار، وتقبل منا صبيانا وقيامنا .
- سبحان الله ، الحمد لله ، لا إله إلا الله ، الله أكبر
- ربنا آتنا في الدنيا حسنة وفي الآخرة حسنة وقنا عذاب النار

• ربنا & تجعلنا من المحرمين ولا والدنيا .

• اللهم أدر فل والدي الجنة بغير حساب ولا عذاب

• ربّ ادخلني مدخل صدقه ، واخر جني مخزج صدقه ، واجعل لي من لدنك سلطانا نصيرًا .