MIRACLE Academy

التعقيم والتصنيع المعقم

لجان الدُّفعات

اللهم وفقني في دراستي، ونوّر بالكتاب بصري، واشرح به صدري، واستعمل به بدني، واطلق به لساني، وقوِّ به عزمي بحولك وقوتك، فإنّه لا حول ولا قوة إلّا بك يا أرحم الراحمين.

وفقكم الله...

Counting, Detecting and identifying microorganisms

Chapter 15&18

Key Facts

- **Bioburden(العبىء الحيوي)** : the number and type of microorganisms (MO) present in or on a pharmaceutical raw material, medicine, or medical device

من هون بنبلش شغل العبىء الحيوي و نضمن ال **standards** لتصنييع مستحضرنا الصيدلاني

- **Pharmacopeias describe procedures for**:

✓**Procedures for counting microorganisms**

How to count microorganism بتروح على دستور الادوية بتلاقي

✓**Procedures for confirming the absence of named objectionable MO**

objectionable كيف يتم التحقق من عدم وجود بكتيريا تسبب المرض يعني ما بدي ياها يعني

objectionable أحيانا بعض المستحضرات زي **Oral** بنسمح بوجود بعض البكتيريا لكن في **(pathogenic) bacteria** مش لازم تكون موجودة ولازم نشيك انها مش موجودة...كيف؟؟

بنروح على ال **Pharmacopeia** وبنتأكد

- ✓ **Specifications for the max permitted levels of bacteria and fungi for the different categories of nonsterile medicine**

في مستحضرات صيدلانية لا تتطلب انه تحقق ال sterility فيها ولكن هناك microbiological
specification يجب ان تحققها و برضه بنلاقي ال specification في ال pharmacopeia

- ✓ **Requirements for the absence of one or more of the major objectionable MO: E.coli, Salmonella species, Staph aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Candida albicans**

يعني مش شرط كل مستحضر صيدلاني بدنا نشوف انه ما فيه objectionable MO، لكن حسب المستحضر مثلا:

1) ال Candida albicans مش لازم تكون بالمستحضرات اللي بنعطيها vaginal فلازم هالمستحضر اشيك انه ما فيه Candida albicans
2) ال Pseudomonas aeruginosa ما تكون بقطرات العين فلازم اشيك على عدم وجودها لانها بتعمل blindness خلال 48 ساعة

Remember that : candida albicans is objectionable MO for vaginal Preparations according to the specification

- ال Bioburden معناها العبىء الحيوي وهاد بهمنا للمستحضر الصيدلاني ...بس بالأصل شو يعني عبىء حيوي ؟

معناه أكم و شو نوع ال Microorganism اللي عايشة بالمستحضر تاعي او لو اخذت مسحة او عينة من طاولة لأعرف اكم Microorganismعايش على أو جوا السطح اللي بدي اشوف ال bioburden اله.

- احنا كصيادلة ما بصير نسمح لحالنا نصنع مستحضر صيدلاني من مواد خام مليئة بال microorganism(MO)علس أساس نعقمه بالآخر !

فلازم من الأول من ال raw materialيكون عنا specification لل raw material و ال medical devices اللي هي المستلزمات و الاجهزة الطبية

- وين بنلاقي معلومات عن ال bioburden؟ بال pharmacopeia

فيها بنلاقي شو المسموح والعدد الممنوع يكون من ناحية ال pathogenic MO

Key Facts

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

زمان كانوا يعملوا الطريقة ال traditional انه بزرعوا و بستنوا لتطلع بعدين بشوفوا ال color
(هاد اللي رح نعمله بلاب المايكرو) و في انواع agar مختلفة رح نحكي عنها.

هسا بعض انواع ال kits بتساعد لكن مش كلها accepted in pharmacopeia يعني
ممكن نستخدمها بالمصنع الخاص تاعنا عشان نسرع ال identification لكن اذا بدنا نسجل
المستحضر لازم نشوف ال kits اللي وافقت عليها ال pharmacopeia

Key Facts

- **Objectionable:**

- Because it is a pathogen so its presence in a medicine may cause an infection (E.coli & Staph aureus are pathogens→ health hazards)

- Its presence may be indicative of poor-quality raw materials or poor manufacturing procedures

Gelatin: test for absence of E. coli and Salmonella

Note of this slide:

- E coli in colons of mammals fecal contamination
- Staph aurues arises on the skin manufacturing personal are source of contamination
- The pharmacopeia describes tests to specific products:1. those where the presence of the product is a realistic possibility or 2. the product is applied to vulnerable site of the body

- هسا ليش ال objectionable ما بدنا ياها ؟؟

لأنها pathogen تسبب الامراض و ال infection وكمان وجودها بيعني انه التصنييع ابتدأ بـ raw material و لم يتم مراعاة ال standards أو انه ال manufacturing سيء فبالتالي لازم ما تكون هي ال objectionable بمستحضري النهائي .

مثلا: لو مستحضري يتطلب استخدم مادة الجيلاتين يعني مثلا كبسولات جيلاتينية فال pharmacopeia بتحكي انه لازم اتأكد انها ما بتحتوي على E coli , Salmonella

فيعني بنرجع لل specification لنعرف شو البكتيريا اللي لازم اعمللها test واتأكد انها مش موجودة بمستحضري الصيدلاني قبل ما اعمل release to market

Bioburden

- **Determination of bioburden quantitatively: to count the organisms present → Total Viable Count (TVC)**

كيف رح نعمل ال bioburden test؟ (رح نعمله بلاب المايكرو)
بنزرع الخلايا و بنعد عدد ال cell اللي عاشت و ال colonies اللي ظهرت وهاد بنسميه TVC

- **Bioburden test → the most common microbiological test undertaken in the pharmaceutical industry:**

معنى most common
test انه في test آخرين

- **Raw material (including water)**
- **Finished products**
- **Various stages during manufacturing process**

بنعمل ال test سواء لـ :

1.Raw material → e.g.: water
2. Finshed product

وتذكروا بنعمل ال test كمان لـstages التصنييع فبضل خلال عملية التصنييع اخد عينات و اتأكد من ال Bioburden، ليش بنعمل هيك و ما بنكتفي بفحص ال final product؟؟؟؟
عشان لو صار contamination بال final product يكون عندي القدرة اعرف بأي مرحلة صار هيك ،يعني بعمل Quality control عشان نشوف وين بالضبط بأي مرحلة خرب المنتج

Traditional counting methods:

ال counting كحكي سهل لكن كتطبيق لازم يكون انسان ماهر و تكون الenvironment صحيحة لأن الشخص بنفسه ممكن يكون تسبب بفشل ال test يعني ممكن المنتج ما يكون فيه MO لكن اللي بعمل الtest يكون ما عنده المهارة الصحيحة لعمل counting test أو المشكلة بالأدوات

- **Place a sample of the material to be tested onto or into gelled culture medium(such as : agar) 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**

- شو بنعمل لنعمل ال counting ؟

1) بنحط ال sample من الsolution اللي بدنا نشوف اكم من الMO فيه و بنزرعه يا أما على سطح ال agar أو بنخلطه مع الagar و بعدين بنعمل incubation حسب ال temreture &required relative humidity

2)بنعد ال colonies

هسا كل colony بقدر اشوفها بالعين المجردة لكن الخلية ال single ما بقدر اشوفها بالعين المجردة يعني لازم microscope فمنهم بعرف بس اشوف ال colony هاد لا يعني انها one cell ممكن يكون اكثر من cell احيانا

فـ لو شفت colony فيعني شفت مجموعة خلايا فهل اعتبرها خلية او مجموعة خلايا عملوا هي ال colony فعشان نحل هالشي اعتبروا كل colony انها colony forming unit (CFU)

فـ لو شفت 10 ما بحكي انهم 10 cells!!

لكن بحكي 10 CFU لانه ما بعرف ال unit الاصلية واذا همه من single cell او من مجموعة خلايا

- **USP (United States Pharmacopeia) states that petri dishes containing between 25-250 colonies produce reliable bioburden results**

نفرض عنا solution وبدنا نشوف الbioburden تاعه بنروح بنزرع 1 ml على ال agar بلاقي ال agar مليان خلايا ، هسا هون بهيك حالة عملية العد ممكن يصير خطأ، و ممكن ازرع كمية كثير بسيطة
فالـ USP بتقلك عشان الagar اللي زرعته اعتمده و يكون reliable يعطي فكرة صح عن bioburden تاع مستحضري لازم ال colony اللي طلعلك يكون بين 25-250colonies هاد معناه لو انا زرعت محلول و عطاني كمية هائلة من ال colonies يعني 400 مثلا فشو لازم اعمل وقتها؟؟
*لازم نعمل Dilution و بنزرع الـ diluted solution عشان بالنهاية يطلعلي العدد اللي بدي اطلع منه الbioburden يكون من ال 25-250 و بعدين نضرب بال dilution factor لنطلع العدد الأصلي الموجود بال solutionالاصلي.

- **High Bioburden materials:**

*هسا شو ال material اللي لو زرعتها بتعطيني High bioburden؟
اللي هي ال material اللي جاي من الطبيعة أو من الحيوانات ، حيث انه خلال عملية
استخلاص ال material من الطبيعة بتسمح بدخول نسبة منيحة من الMO

1)Mined minerals (talc, kaolin, bentonite)

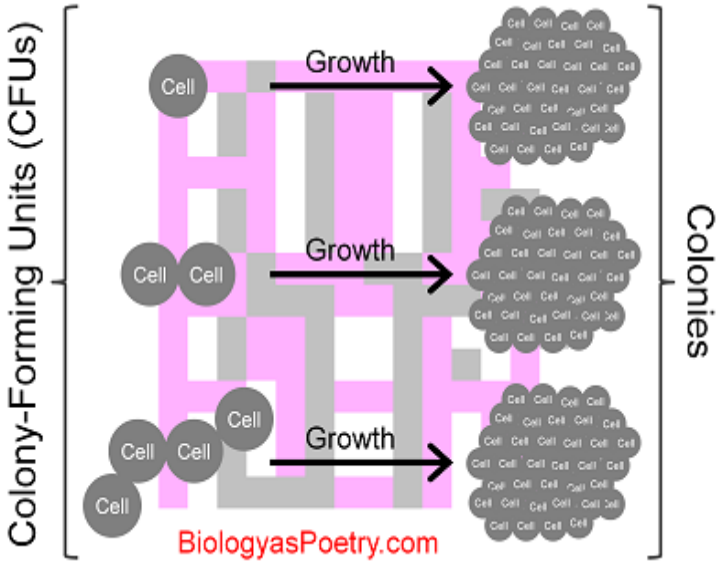
Lubricant

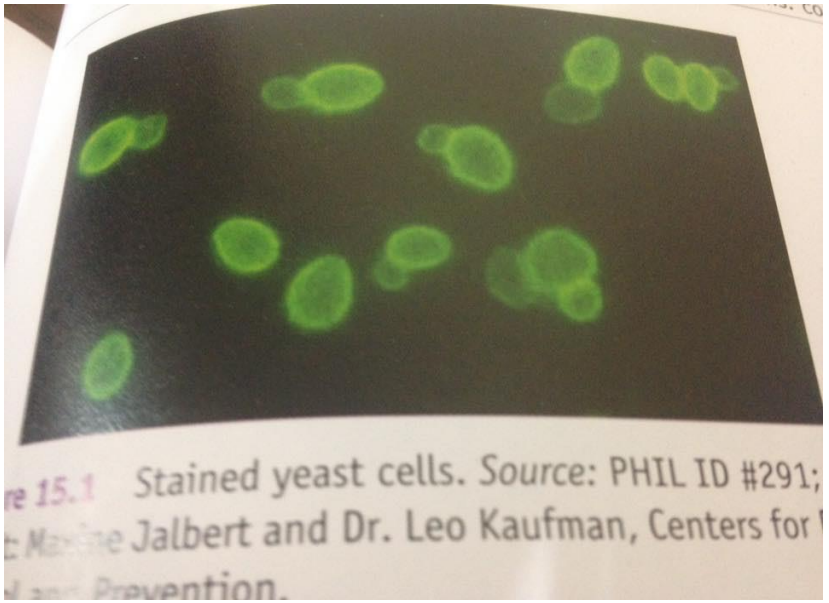
عبارة عن thickening agent يستخدموا
لزيادة ال viscosity

2)Vegetable origin (starches, gums, thickening agents such as :cellulose dervatives)

3)Animal origin (gelatin)

Traditional counting methods





الصورة عبارة عن زراعة yeastهاي ال yeast عاملينلها صبغة بال fluerscenseعشان توضح ال concept of colonyلنعرف هاي من خلية او خليتين

لما آجي ازرع المستحضر تاعي على الagar plate هاي ال colonyممكن يكون مصدرها خلية واحدة أو خليتين و تكاثرت أو اكثر من خلية و تكاثرت

و عنا بالصورة :

19 cell

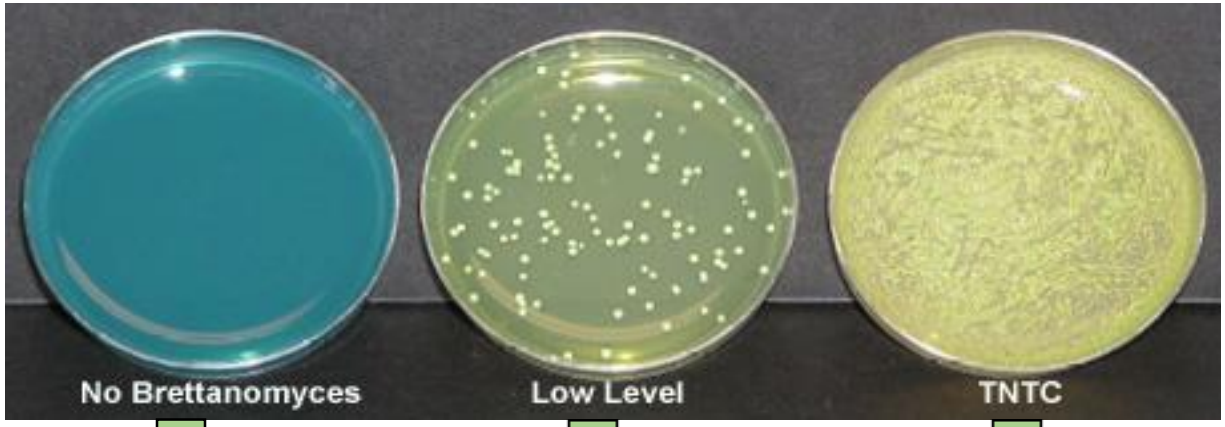
10 CFU

Traditional counting methods

- **Dilution is necessary for material with a high bioburden, why?**

to achieve a countable number of colonies on the plate

Perform a series of dilution (tenfold increments)



No colony
لا يمكن اعتمادها
حسب USP

ممكن يوصلوا لـ 25
فبنقدر نعتمدهم
حسب ال USP

Too numerous
to count
اكثر من العدد
المسموح لاعتماده
حسب ال USP

High bioburden

so we need dilution

Why?

to achieve a countable

What is the countable number used in USP ?

***25-250 colonies**

الـ dilution بكون بالعادة على مبدأ 10 fold increment يعني
ناخد 1 ml على 9 ml يعني 1:10

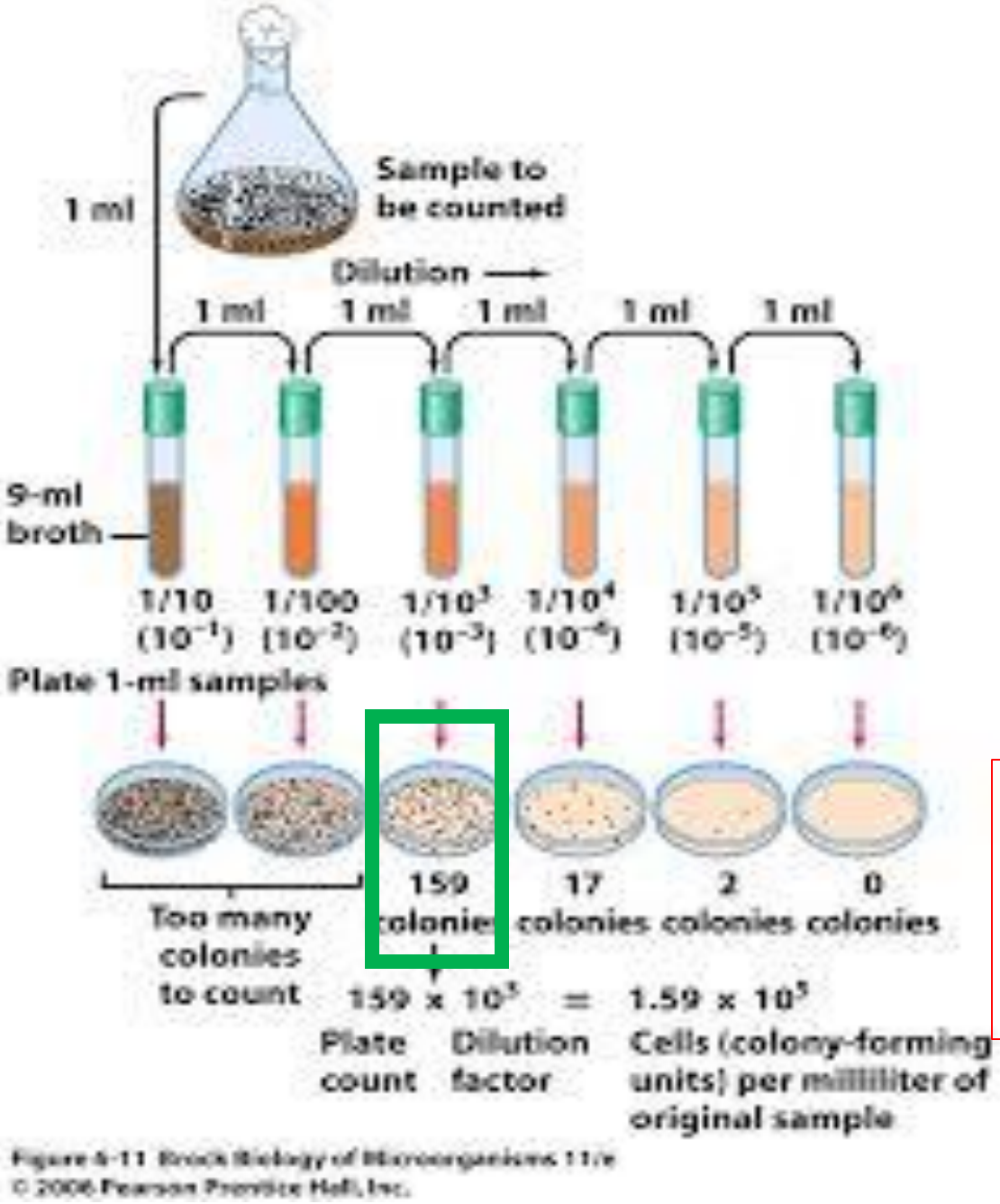
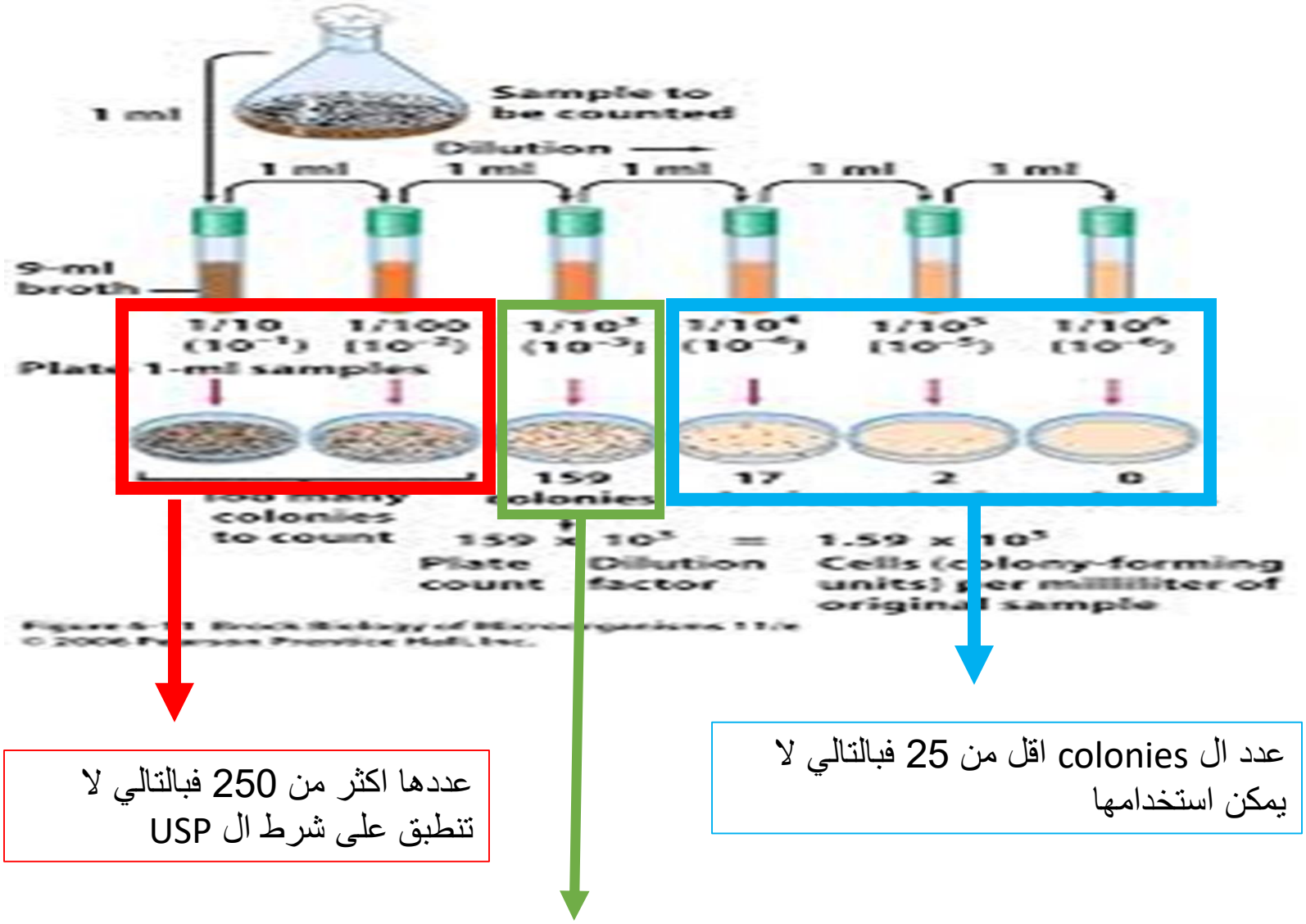


Figure 4-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

1)نحضر9ml من ال agar mediumو
يسمى broth ⟵ هو liquid agar
ويعتبر سائل غذائي لل MO

2) بناخد 1ml of sample وبنعمل serial dilution

3)بنعمل spreading ثم incubation
وبشوف ال number،بعتمد ال petri desh اللي فيه ال coloniesعددها ما بين 25 الى 250 واللي حقق الشرط هو ال petri deshاللي مخطط عليه بالاخضر



عددها اكثر من 250 فبالتالي لا تنطبق على شرط ال USP

عدد ال colonies اقل من 25 فبالتالي لا يمكن استخدامها

Plate count × dilution factor = number of cells

$159 \times 10^3 = 159000$

- الشغل اللي حكينا رح نعمله بالسلايدات اللي فوق لازم يكون في Biosafety cabinet

عبارة عن cabinet بتضمنلنا ان تبقى البيئة الداخلية معقمة ،فـ لو ما اشتغلنا في Septically environment رح نكون سبب لنمو ال MO و رح ما نعرف هل مصدر ال MO من بيئة عملنا الغير معقمة و لا من المستحضر ذات نفسه!

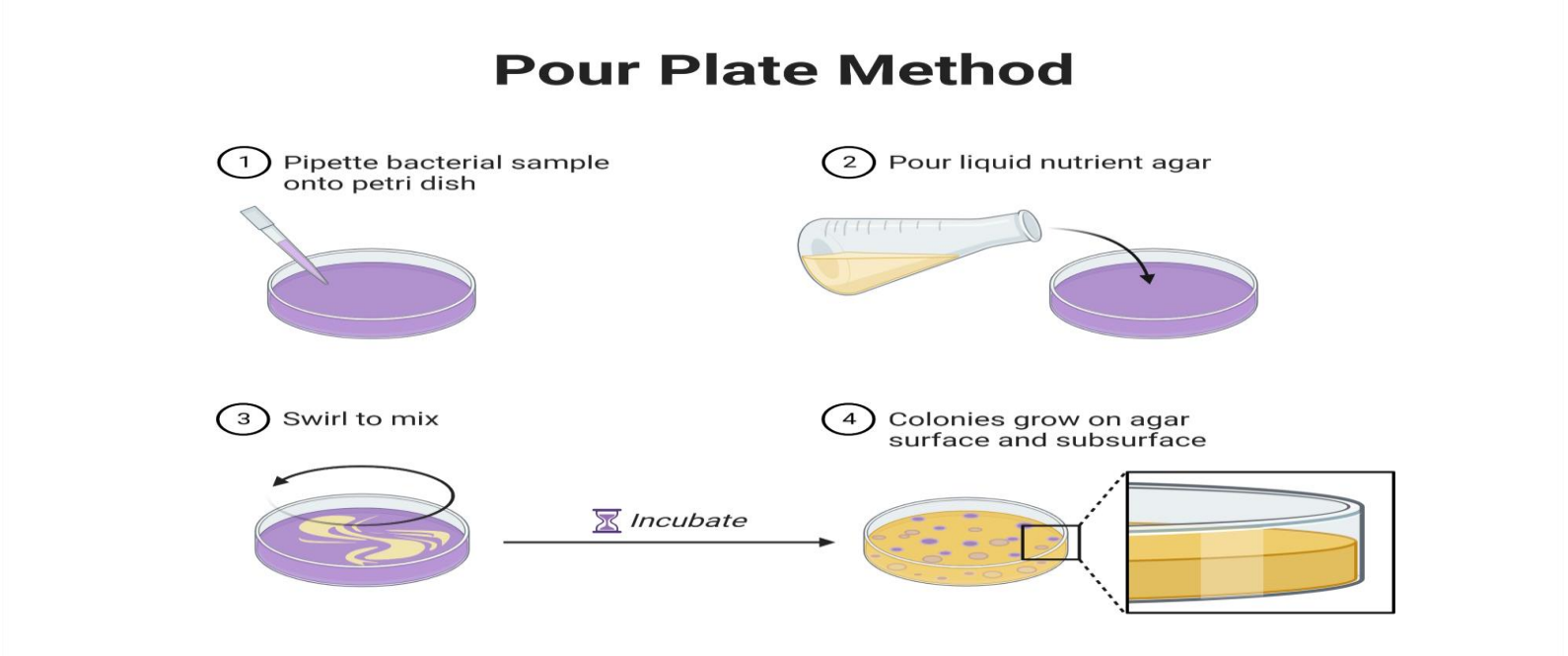
Traditional counting methods:

1. Pour plates (most popular)

من اكثر الطرق المستخدمة هي و ال spread plate method

نخلط العينة بـ Liquid broth (agar) بعدين بعمل pour to plate وبعملincubation
و هون خلطنا جوا ال sample فـ أكيد لو في بكتيريا رح تعيش كمان جوا و ما رح نقدر نشوفها أو اعمللها Counting وما في أكسجين فيعني عملية نموها غير واضحة

في هذه الطريقة نخلط ال sample مع ال agar قبل ال solidification

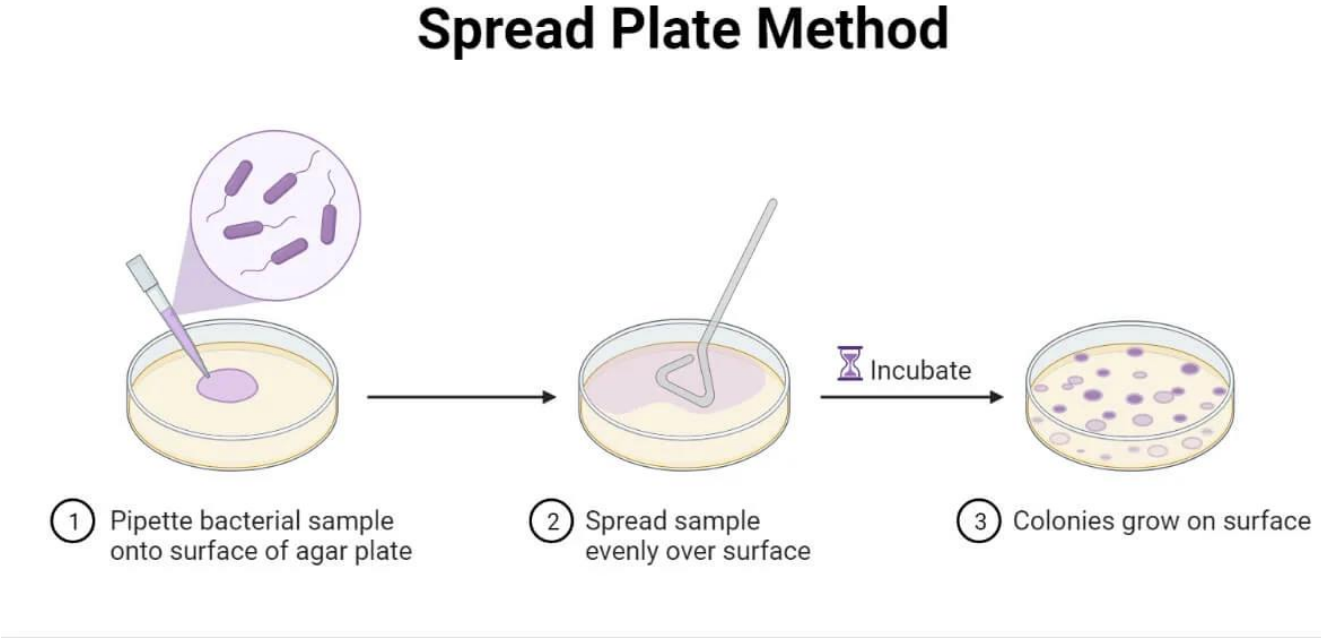


2.Spread plates

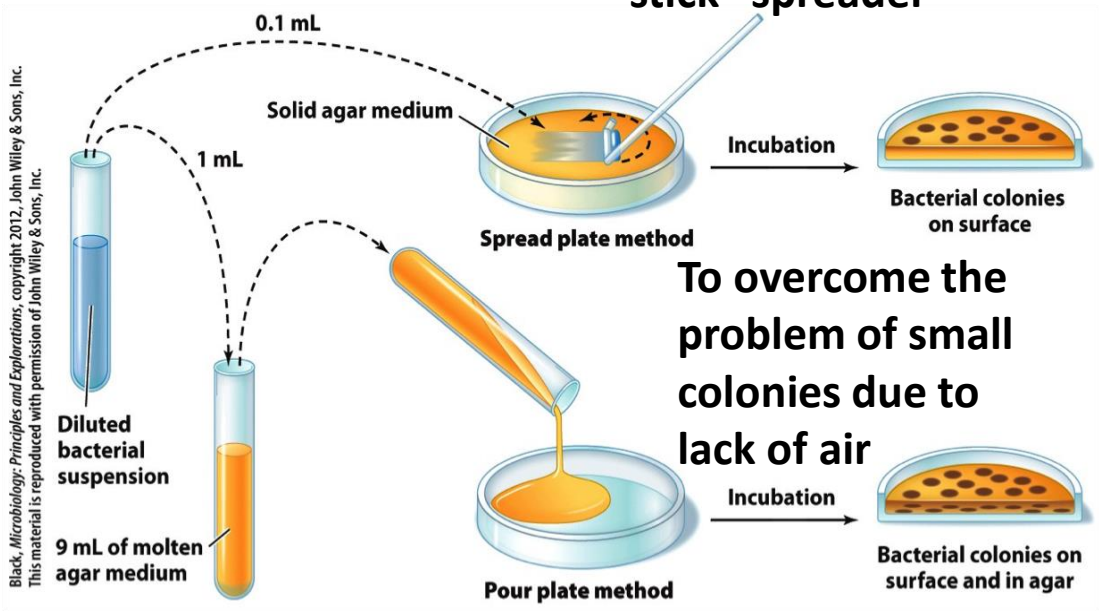
من اكثر الطرق المستخدمة هي و ال spread plate method

نحط كمية معينة من ال diluted bacterial suspension بعدين بنعمل spread it on agar plate و بعدين incubation ، طبعا هون كل البكتيريا و كله بقدر اشوف نموه على عكس pour plate method

هون خلينا يصير solidification لل agar بالأول



Sterile glass or plastic “hockey-stick” spreader



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

نتذكر شو الخطوات من أول:

✓ عملنا serial dilution

هسا بعدها عندي طريقتين ممكن أعملهم :

Pour plate

بحط volume معين من ال diluted bacterial suspensionو بنخلطه جوا ال agar وهو لسا Liquid وبعدين بعمل mixing منيح و بعدين بنعمل incubation

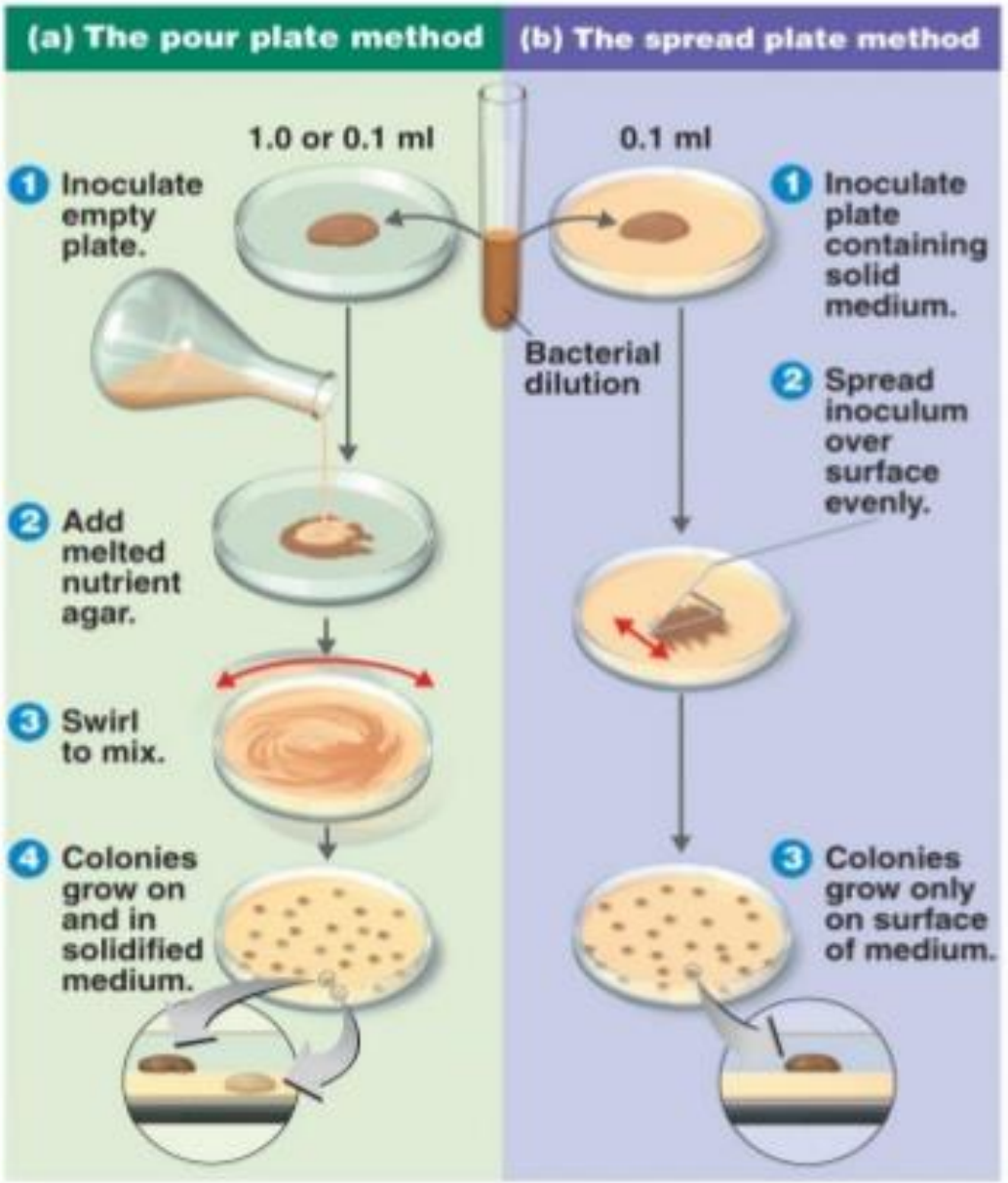
Spread plate

نحط كمية معينة من ال diluted bacterial suspension بعدين بنعملspread it on agar plate و بعدين incubation

- Plating serial dilutions of the specimen

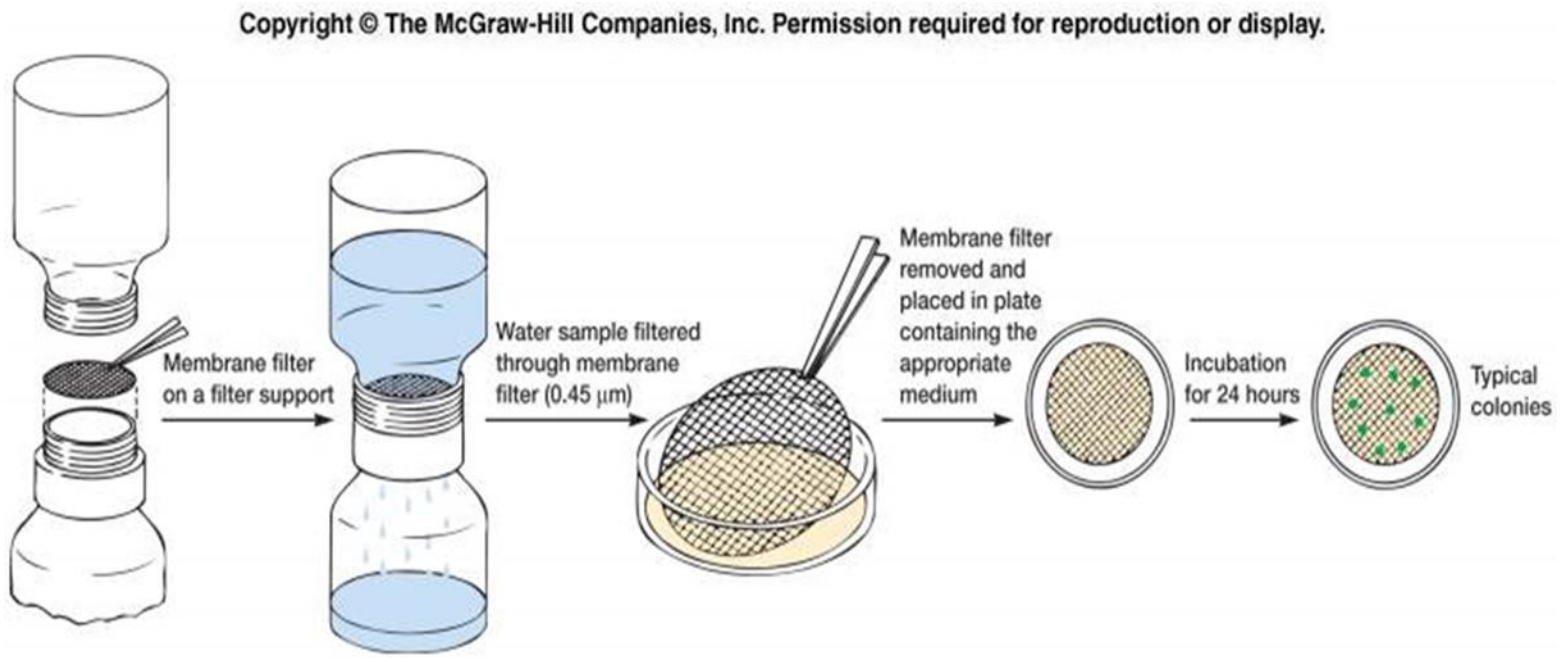
- **Pour plate method**
- **Spread plate method**

هون زي ما حكينا قبل عنهم بس بدكم تعرفوا انه هالطريقتين بنقدر نستخدمهم حسب ال usp و همه من اكثر الطرق المستخدمة



3. Membrane filter method

من اسمها مبين في عملية filtration من خلال membrane



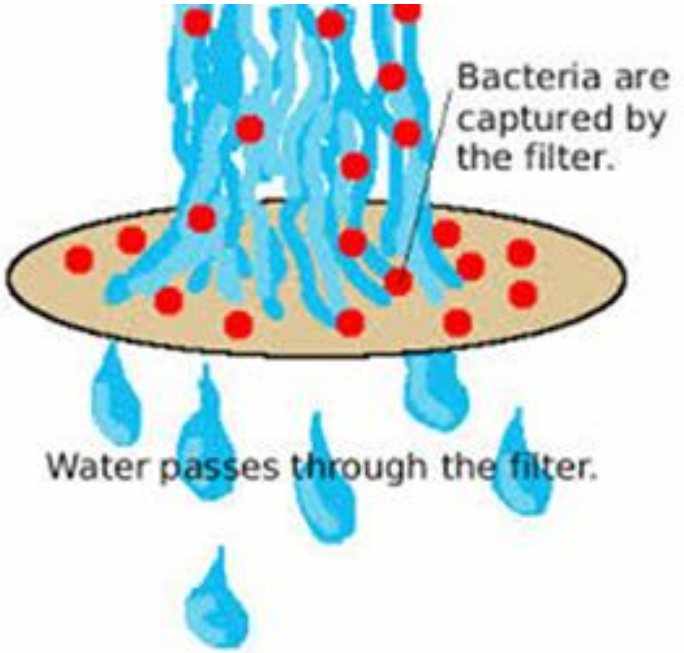
- Why I do need the membrane filter ?

تستخدم بمصانع الأدوية To assist the quality of water حيث انه
مسموح نزرع على مقدار معين من ال agar يعني اكيد مش 100 ml!!
فشو بنروح بنعمـل؟؟؟

1) بنفلتر ال 100 ml
2) بنزرع اللي فلترناه على ال agar وبنعد ال colony

طبعا هيك بنكون جمعنا البكتيريا على ال filter وعملنا counting لل filter و بطلع عنا عدد ال MO to 100 ml of water اللي فلترته

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)



كثير صغيرة يعني بحدود Pores ال filter
0.45pores و في مصانع ممكن توصل حجم ال
عندها لـ 0.1 و هاد طبعا احسن واحسن

- **Advantages of membrane filter method:**

1. **For low bioburden material like Purified water EP → required to have no more than 100 CFU/ml**

يعني لو جبنا ال purified water اللي بنستخدمه بمصنعنا و مصنعي بعتمد على انه يحقق ال EP stanards فلازم ال المياه اللي بستخدمها ما تكون بتحتوي اكثر من 100 CFU /ml

2. **Can be used to determine concentration of organisms in oils or ointments (after dispersing it in oil)**

بتفيدني لما بدي اشوف ال oils & ointments لانه هدول لما بدي ازرعهم على ال agar بمنعوا وصول الأكسجين فهيك بنكون ما حققنا الظروف الصحيحة لتعيش ال MO

ممكن نكون ما حققنا MO يعني المادة ما فيها agar مش دايما اذا طلع ما طلع شي على ال الظروف الصحيحة

بال oil & ointments ما بنخاف من ال contamination بهمني احقق Quality control صح لكن بس انزلها عالسوق ما بصيرلها Contaminationبسهولة لأنه ال Oils & ointments لا توفر البيئة المساعدة لنمو ال MO

3. The best method if the sample is likely to contain antimicrobial chemicals (preservatives)

اذا المحلول تاعنا بحتوي على مادة حافظة يعني مثلا في محلول دوائي solution مثلا دوا اطفال و بدنا ننزله عالسوق و بدنا نعمله bioburden تاعه بالاصل لازم يكون فيه مادة حافظة، لو استخدمت ال pour plate ما رح يطلع MO فمن احدى الطرق هو استخدام ال membrane filter لان متى ما فلترنا بنكون شلنا المادة الحافظة ضل اذا بس في بكتيريا بزرعها و ببين اذا في بكتيريا

فالهدف نتخلص من المادة الحافظة لكن هذا لا يعني ان بالمستحضر الصيدلاني في مادة حافظة يعني انه طريقة ال filter membrane هي الطريقة الوحيدة!
لأنه في طريقة ثانية رح نشوفها لقدام

المادة الحافظة (Preservative):

لا تستخدم للمحافظة على ال sterility لكن يتم استخدامها عشان لو حد استخدم ملعقة الدوا و رجع حطها فيه وقتها المادة الحافظة تمنع من نمو هي البكتيريا اللي اجت من الملعقة وليس قتل البكتيريا الموجودة من قبل استخدام الدوا،فهي لا تعالج مشاكل ال raw material اللي اصلا بالمستحضر يعني ممكن توقف نمو لكن لا تقتل او تقضي على البكتيريا اللي مصدرها من ال raw material

هون هي الطريقة الثانية للتخلص من المادة الحافظة

Antimicrobial agent	inactivator
Quaternary ammonium compounds, parabens and chlorhexidine	Lecithin with or without Polysorbate (Tween) 80
Thimerosal and other mercurials	Sodium thioglycolate
Beta-Lactam antibiotics Such as: penicillin	Beta-lactamase يقوم بتكسير ال Beta lactam ring الموجودة في مجموعة Beta lactam drugs مثل ال penicillin
Phenols, alcohols and weak acid preservatives	Dilution alone

رح نشرح على اول مثال و الباقي نفس الطريقة لكن يختلف نوع ال antibacterial agent و ال inactivator .

هسا لما بدي استخدم ال pour plate or spread plate نستخدم ال inactivator

يعني هو ببساطة بثبط عمل المادة اللي بتقتل هاد ال MO اللي بدي كشف عن نوعه، وعدده فبهمني يكون بظروف تساعد على نموه

مثل ال tween 80 بوقف عمل ال parabens

Tween 80 is a surfactant

4. MPN

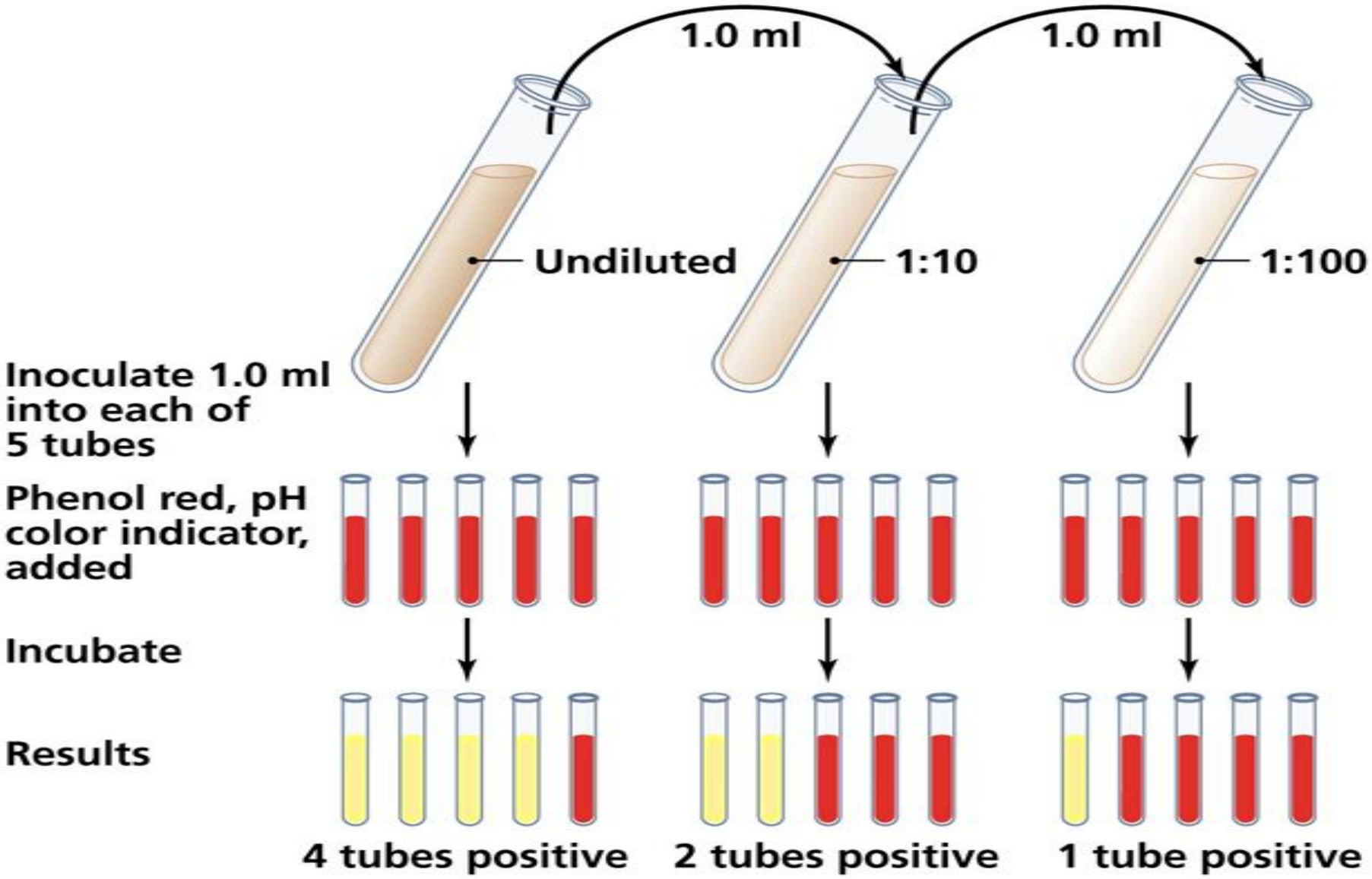
MPN is used when the sample contains insoluble material that would interfere with plate counts as in herbal products

MPN : Most probable number

لا نستخدمها دائما ، يعني نستخدمها بحالة اذا ال sample contain insoluble materia
ففرضا لو عنا مسحوق عشبي و رحنا حضرنا sample منه و زرعناها على agar ما رح
تذوب الاعشاب فـ رح تكون كـعشب على الـ agar plate فما رح نقدر نعد الـ colony

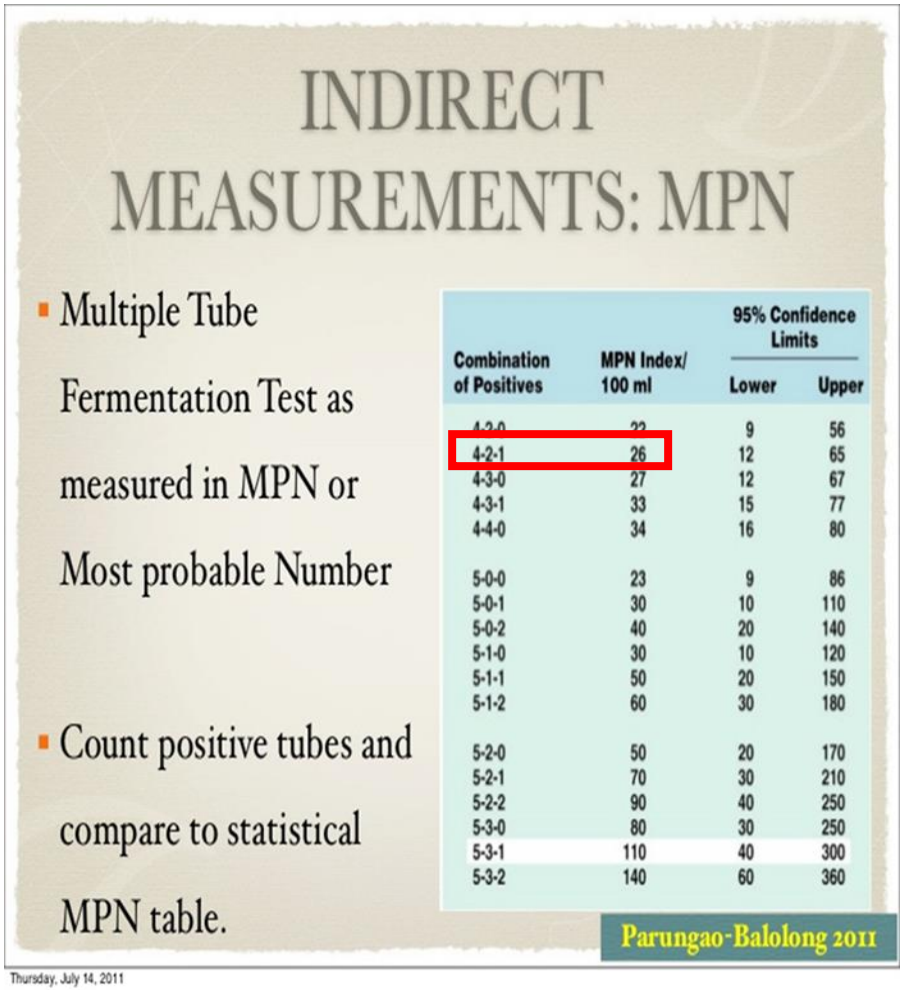
indirect هي الطريقة تعتمد التوقعات على التوقعات الاحصائية فهي عبارة عن
للعدد measurement

الشرح بالسلايد اللي بعد هاي



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

You have to plate multiple tubes



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

1) بنحط 5 tubes فيها ال media اللي بتعيش فيها البكتيريا مع indicator عشان يتغير اللون لو عاشت اي بكتيريا و كانت موجودة

2) بنجيب ال sample الاصلية ال (undiluted) و ال diluted sample

3) بناخد من كل وحدة 1 ml و بنزرعها بال 5 tubes

4) بنشوف ال result فرضا كان 4 tubes نمى بكتيريا (positive) و 2 tube من التركيز الثاني كانوا positive و واحد بس positive من التركيز الأخير يعني النسبة 4:2:1 فبنروح بنشوف ال index بطلع يساوي 26 CFU

Calculation of concentration of MOs in a sample

الشرح بالسلايد اللي بعد هاي

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[a]	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

[a]TNTC = too numerous to count

Viable count of original sample= $\frac{Mean\ colony\ count}{Volume\ of\ dilution\ used} \times dilution\ factor$

هاي ال calculation اصلا رح نطبقها بالمختبر

هسا حكينا عنا Different test tubes الها Different dilution factor
- أول واح A كان اله 10 (9 وحطيت فيها 1) و نكمل dilution 1:10 , 1:100 , 1:1000
فيعني معي ال Dilution factor لكل ال test tube بعدين زرعتهم و شفت ال colony

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[a]	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

[a]TNTC = too numerous to count

هسا رح نعتمد D لان عدد ال colony فيها ما بين 25 و 250

1) نحسب ال mean
Mean = (85+79+81)/3=81.6
2) نقسم ال mean على volume of dilution used و غالبا يكون 1 ml
3) ثم نضرب بال Dilution factor
(81.6/1)×10 to power 4=816000

هاد القانون اللي اشتغلنا و حلينا عليه

هذا الرقم قبوله او رفضه (fail or pass) حسب ال pharmacopeia

$$\text{Viable count of original sample} = \frac{\text{Mean colony count}}{\text{Volume of dilution used}} \times \text{dilution factor}$$

Detection of objectionable MOs

- **Non sterile dosage forms may contain some Mos**

حكينا **non sterile** لانه لو **sterile** فمباشرة دون فحص بتكون **fail**

* هسا ال **non sterilae** ممكن شي يعيش فيها بس عشان اسمح يكون موجود فيها لازم يكون **non objectionable**

نهاية المحاضرة الأولى