الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

كلية الصيدلة

مقرر عملي الصيدلة الجرثومية

الجلسة الأولى

معنى المقرر وأهميته :

- ✓ يرتبط المقرر بعلم الجراثيم وتطبيقه الأساسي في المعامل الدوائية , حيث سندرس فيه دور المخبر الجرثومي في كل مرحلة من مراحل التصنيع الدوائي وكيفية التأكد من ملائمة المستحضر للمواصفات الدستورية لينتقل إلى مرحلة الطرح في الأسواق .
- ✓ يوجد في كل معمل دوائي مرخص , قسم رقابة جودة quality control مؤلف من مخبر جرثومي ومخبر كيميائي ومخبر فيزيائي , مهمة المخبر الجرثومي هو إجراء الاختبارات الجرثومية وفق الدستور و التأكد من خلو المستحضر من الجراثيم ومراقبة كل مرحلة من مراحل التصنيع وأخذ عينات ومسحات من المواد الداخلة في تحضير المستحضر والأدوات المستخدمة خلال التصنيع .
- ✓ محتوى المقرر : سندرس طرق مراقبة الجو المحيط لضمان خلوه من الجراثيم أثناء التصنيع وطرق مراقبة الماء المستخدم في تحضير الأشكال الصيدلانية العقيمة وغير العقيمة , المطهرات وقياس فعاليتها , قياس المحتوى الجرثومي للأشكال غير العقيمة , الفحوص الجرثومية للأشكال الصيدلانية غير العقيمة , قياس فعالية المادة الحافظة , طرق التعقيم , اختبار العقامة .
- ✓ كي نراقب الهواء والماء ومعرفة ملاءمتهم للاستخدام الصيدلاني علينا أولا معرفة طرق قياس المحتوى الجرثومي في العينات المأخوذة .

طرق قياس المحتوى الجرثومي في عينة ما

هناك عدة طرق لمعرفة التغير في المحتوى الجرثومي في عينة ما :

✓ طرق قياس كتلة الجراثيم :

1. *طرق فيزيائية مباشرة* : قياس الوزن الرطب (حساب الوزن قبل نمو الجراثيم وبعد نموها حيث تستهلك الجراثيم الرطوبة فينقص الوزن) أو الوزن الجاف (الفرق بين عينة عقيمة وعينة تحوي جراثيم) و يمكن تثفيل العينة لتجميع الخلايا الجرثومية وسهولة القياس .
2. *طرق كيميائية مباشرة* : نقيس مكونات الخلية الجرثومية مثل DNA بتقنية الـ PCR .
3. *طرق كيميائية غير مباشرة* : كما نعلم الجرثوم يحتاج لغذاء وأوكسجين , وعند استهلاكه لهذه المواد ينتج غازات مثل CO_2 أو H_2S وبقياس هذه الغازات يمكن معرفة المحتوى الجرثومي .
4. *قياس العكر* ***Turbidimetric*** : كلما زاد العكر في المحلول كان عدد الجراثيم أكبر , مبدأ الجهاز هو إسقاط ضوء على العينة فيتشتت جزء وينفذ جزء , يقيس الجهاز شدة الضوء النافذ ومنه يحسب الضوء المتشتت وبالتالي يحسب التركيز , أي كلما كان الضوء النافذ أكبر كلما كان التركيز أقل والعكس صحيح .

(من الملاحظ أن كل الطرق السابقة تقيس كتلة الجراثيم في الوسط المراقب ولا تقيس عدد الجراثيم) .

✓ طرق قياس عدد الخلايا الجرثومية :

1. *العد المباشر بالمجهر الضوئي* : نستخدم عدادة نيوبار بعد تمديد العينة المراد عد محتواها , مع ملاحظة أن عيوب هذه الطريقة :
   - أنها لا تميز بين الخلية الحية والخلية الميتة .
   - نستخدم التكبير 40 وبالتالي لا يمكننا رؤية بعض الجراثيم بسبب أبعادها الصغيرة جداً
   - هناك جراثيم متحركة قد تُعد مرتين .
2. *عداد الجزيئات الإلكتروني* ***Coulter counter*** : يعد الجهاز الجزيئات التي تعبر أمام خلية ضوئية وبالتالي ميزته الحصول على عدد الجزيئات وحجمها معاً , وعيبه أنه لا يميز الخلية الميتة من الحية من الشوائب .

3. *طريقة العد العيوش* : وهي الأهم , تعتمد هذه الطريقة على مبدأ أن كل خلية جرثومية حية عندما تنمو على وسط صلب مغذي ستشكل مستعمرة (Colony forming unit) CFU ترى بالعين المجردة وبالتالي تقيس هذه الطريقة الخلايا الحية فقط .

بما أن الأشكال الصيدلانية تتأثر سلباً بالخلايا الحية فقط فإن طريقة العد العيوش هي الأكثر مصداقية ودستورية ومعتمدة لقياس المحتوى الجرثومي للأشكال الصيدلانية ومكوناتها لتقييم جودتها من الناحية المبيكروبيولوجية .

- ✓ متطلبات طريقة العد العيوش , نحتاج إلى :

1. **وسط زرعي صلب** موضوع في علب بتري وملائم لنمو الخلايا الجرثومية الموجودة في العينة .
2. **أن يكون محتوى العينة ملائم للعد** : في حال كانت العينة كثيفة نلجأ للتمديد بمدد ملائم (مصل فزيولوجي عقيم) بطريقة التمديدات العشرية , أما في حال كان عدد الجراثيم قليلة فنلجأ للترشيح بمراشح جرثومية خاصة وثم زراعة المرشحة على وسط صلب ملائم , ويكون العدد الملائم للعد 30 – 300 مستعمرة .

- ✓ طرق العد بعد أن يصبح العدد ملائم للعد :

1. **الزرع على السطح** : تتم بطرق مختلفة تتفق في مبدأها الذي يقوم على أن كل خلية دقيقة (فطر أو جرثوم) عندما تنمو على وسط صلب تعطي مستعمرة واحدة مستقلة مميزة لنوع وجنس الخلية الدقيقة التي نشأت منها , يتم توزيع حجم معلوم من المعلق الجرثومي المفحوص (50 ميكرون قطرة واحدة أو بواسطة أوز معاير) على وسط صلب جاف وغير رطب , وبعد أن يتشرب الوسط العينة تقلب علبة البتري وتحضن بالشروط الملائمة ولمدة كافية ثم تعد المستعمرات النامية على الوسط والتي تمثل الخلايا الحية الموجودة في الحجم المعلوم المأخوذ من المعلق , ميزاتها أنها : سهلة - المستعمرات تكون واضحة - تفيد في عد الجراثيم الهوائية فقط , بينما عيوبها : حجم العينة صغير – لاتسمح بنمو الجراثيم اللاهوائية المجبرة .

2. **الزرع بطريقة الصب Pour Plate** : نأخذ 1 مل من المعلق الجرثومي ونضعه في علبة بتري عقيمة فارغة ثم يصب الوسط المعقم بالاتوكلاف والمبرد لدرجة حرارة 50 – 55 , تمزج العينة جيدا مع الوسط ويترك الطبق حتى يتصلب بحرارة الغرفة ثم تحضن بالشروط المناسب والمدة الكافية , بعد ذلك تعد المستعمرات المتشكلة في العمق وعلى السطح وبذلك نحصل على عدد الخلايا

الجرثومية في 1 مل من المعلق , ميزاتها : حجم العينة كبير نوعا ما - تفيد هذه الطريقة في عد الجراثيم الهوائية واللاهوائية معاً , أما عيوبها : لا تستخدم لفحص المعلقات – قد تكون المستعمرات شفافة فلا نراها ضمن الآغار – لا تستخدم للجراثيم الحساسة للحرارة .

ملاحظة : التمديد العشري يتم بتحضير سلسلة مكونة من عدد من الأنابيب كل أنبوب يحوي 9 مل من المحلول الممدد (ماء مقطر أو مصل فزيولوجي) ويضاف للأنبوب الأول 1 مل من المعلق الجرثومي فيصبح الحجم 10 مل ثم نأخذ من الأنبوب الأول 1 مل ويضاف للأنبوب الثاني وهكذا .

التجربة العملية :

- تحضير سلسلة عيارية مؤلفة من 6 أنابيب وإجراء تمديد عشري لعينة من معلق جرثومي .
- زرع عينة من المعلق الجرثومي بطريقتين (الزرع على السطح - الزرع في العمق) .
- عد المستعمرات المتشكلة وإجراء الحسابات اللازمة لتصحيح التمديد وتسجيل المعلومات على تقرير ورقي يسلم للمشرف .
- في حال كانت طريقة الزرع على السطح : حجم العينة يكون قطرة 50 ميكرون , وقانون تصحيح التمديد :

عدد المستعمرات الناتجة X $10^{\text{رقم الأنبوب}}$ X 20 (معامل التصحيح) = عدد المستعمرات قبل التمديد CFU\ml

- في حال طريقة الزرع في العمق : حجم العينة يكون 1مل وقانون تصحيح التمديد :

عدد المستمرات الناتجة X $10^{\text{رقم الأنبوب}}$ = عدد المستعمرات قبل التمديد CFU\ml

الجلسة الثانية: مراقبة الجو المحيط بتصنيع الشكل الصيدلاني

- ✓ الجو من أهم مصادر التلوث الجرثومي للأشكال الصيدلانية لذلك يجب مراقبة الجو المحيط خلال التصنيع .
- ✓ يقسم الجو المحيط إلى :

1. متبدل : وهو الهواء المحيط الذي يتم العمل به .
2. ثابت : هو السطوح التي تكون بتماس مباشر مع المستحضر (المغارف – مناخل - خلاطات ..) أو غير مباشر (كراسي – طاولات) .

- لذلك يجب مراقبة كل العوامل التي من المحتمل أن تكون مصدر تلوث كالهواء والسطوح الثابتة والمتحركة والأشخاص .
- تعد العلاقة بين الجو المتبدل والجو الثابت متبادلة ولايكفي اختبار عقامة أحدهما للحكم على الآخر.

مراقبة المحتوى الجرثومي للهواء :

تتم مراقبة الهواء في المعمل الدوائي إما بشكل كيفي أو كمي وفقا لنوع الشكل الصيدلاني فيما إذا كان عقيم او غير عقيم .

- ✓ *مراقبة كمية*: تتم بطرق مختلفة مبدؤها قياس محتوى حجم معين من الهواء ومن هذه الطرق :

1. يتم قياس المحتوى الجرثومي بشكل **كمي** في حجم معين من الهواء مأخوذ من المنطقة المراد مراقبة هواءها وذلك بزراعة محتوى العينة بالطريقة المناسبة التي تسمح بنمو كامل المحتوى من الأحياء الدقيقة المختلفة (هوائية – لاهوائية - فطور) على أوساط مناسبة وحضنها بالشروط المناسبة , يسمى الجهاز الذي يقوم بأخذ العينة RCS (Rotary centrifugal sampler) يعتمد هذا الجهاز على زيادة الجاذبية لسحب حجم معين من الهواء حيث يدخل الهواء إلى الأسطوانة ويتم دفع الجسيمات بواسطة قوى الطرد المركزي إلى شريط بلاستيكي يحوي آغار , نقوم بحضن الشريط وعد المستعمرات , يسحب هذا الجهاز أحجام مختلفة محددة من الهواء في الدقيقة وبالتالي يمكن حساب عدد المستعمرات لكل وحدة حجم من الهواء .

Video1

https://youtu.be/28EiB4JPSBE

2. STA (Slit to agar) : يمر الهواء بحجم معين عبر فتحة صغيرة إلى علبة بتري تحوي وسط مغذي ثم يحض الوسط وهكذا نعد الجراثيم القادرة على النمو فقط على هذا الوسط .

Video 2

https://youtu.be/ay8conAmNyY

3. جهاز Open faced filter holder : يعتمد على تمرير الهواء بحجم معين عبر مرشحة 0.22 ميكرون ويتم فحص المرشحة بعد تلوينها على صفيحة زجاجية تحت المجهر .

Video3

https://youtu.be/sm_Q-Jk04XY

4. طريقة غسل عينة الهواء : بتمرير عينة الهواء بواسطة مخلية عبر وسط من المصل الفزيولوجي ونستخدم رجاج لمساعدة عينة الهواء على نقل محتوياتها للمصل ونرشح الوسط ثم نزرع محتوى المرشحة على وسط صلب ملائم للنمو وبعد عملية الحضن المناسبة يتم قراءة المستعمرات المتشكلة.

تستخدم هذه الطرق في مناطق تصنيع الشكل الصيدلاني غير العقيم (النظيف) حيث تسمح دساتير الأدوية والقوانين الناظمة لعملية التصنيع الدوائي غير العقيم GMP بوجود حد أعظمي من الجراثيم يختلف هذا الحد باختلاف منطقة التصنيع وحسب مرحلة التصنيع (وزن – تحضير – تغليف) لذلك تعد المراقبة الكمية هي الأهم عند تصنيع هذه الأشكال الصيدلانية .

- ✓ *مراقبة كيفية* : بطريقة أطباق الرقود Settling plate (نضع أطباق تناسب نمو الجراثيم والفطور) ونقوم بحض الأطباق بالشروط الملائمة (هوائية – لاهوائية) والمدة الزمنية اللازمة , توضع الأطباق في أماكن مختلفة من المعمل شرط ألا تجف خلال مدة تعرضها للهواء التي تدوم 3- 4 ساعات , شروطها : توضع في مكان ثابت بعيدة عن تيارات الهواء (في الزوايا مثلا) , تتميز هذه الطريقة بسهولتها وقلة كلفتها , عيوبها : أنها تكشف الجراثيم التي ترقد على سطحها من الهواء القريب فقط أما العالقة في الجو فتبقى مجهولة , نعنون الطبق (الاسم – التاريخ – المكان – الوقت) .

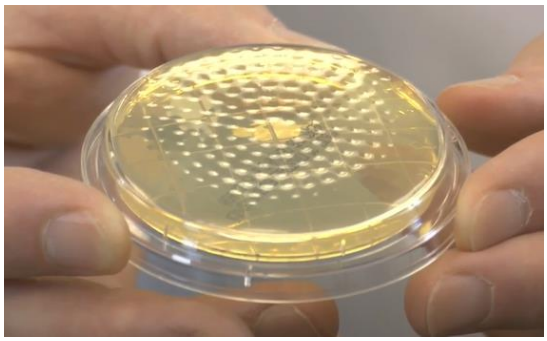
Video

https://youtu.be/Na3fJoz2Ytg

تعد المراقبة الكيفية والكمية مهمة في مناطق تصنيع الأشكال الصيدلانية العقيمة .

مراقبة المحتوى الجرثومي للسطوح :

1. *طرق كيفية :* نأخذ عينة بواسطة ماسحة قطنية Swab عقيمة ونزرعها على وسط سائل ملائم وفي حال ظهور أي نمو جرثومي نلجأ لتعقيم السطوح , تطبق هذه الطريقة على السطوح في منطقة تحضير الأشكال العقيمة وفي مناطق المراقبة بجهاز تدفق الهواء الصفائحي LAF .
2. *طرق كمية :*
   - بماسحة قطنية حيث نأخذ العينة من مساحة محددة وثم تغسل بسائل عقيم أو مصل فزيولوجي بهدف تفريغ كامل محتواها من الجراثيم ثم يرشح السائل وتزرع المرشحة على الوسط الملائم .
   - باستعمال وسط مغذي صلب لدن بشكل محدب convex surface الذي يمكن من التقاط الجراثيم الموجودة على مساحة معلومة من السطح المراد قياس محتواه من الجراثيم , تطبق هذه الطريقة على السطوح في مناطق تحضير الأشكال الصيدلانية غير العقيمة وفي المستشفيات لمعرفة فاعلية عملية التطهير .



Video5

https://youtu.be/KdndbLKHxmw

التجربة العملية :

- مراقبة كيفية :

1. فحص محتوى الهواء : أطباق الرقود ,عنونة أطباق بتري ووضعها في أماكن مختلفة (ثابتة وبعيدة عن التيارات) من المخبر لفحص المحتوى الجرثومي من الهواء في المخبر.
2. فحص السطوح : باستخدام ماسحة قطنية نمسح أي سطح في المخبر ونزرع الماسحة .

الجلسة الثالثة : مراقبة الماء ونظام توزيع الماء في المعمل الدوائي

- ✓ الماء هو العنصر الثاني الهام في الصناعة الدوائية وهو مصدر خطير للتلوث الجرثومي ,
- ✓ **أنواع الماء** المستخدم :

1. *الماء المنقى* *Purified water (PW)* : هو ماء خالي من الشوائب والملوثات والجراثيم والفطريات , يتم الحصور عليه باستخدام غشاء نصف نفوذ يمرر عبره الماء بتطبيق ضغط فينتقل الماء من المحلول ذو التركيز المرتفع للمحلول ذو التركيز المنخفض (تناضح عكسي) , والطاقة المستخدمة هي الضغط , استخداماته : مياه الشرب - تحضير الأشكال الصيدلانية غير العقيمة كالشرابات والمعلقات . video

https://youtu.be/4RDA_B_dRQ0

2. *الماء المقطر* *distilled water (DW)* : هو نوع من الماء المنقى خالي من الجراثيم والفيروسات والطفيليات و المعادن كالرصاص , يتم الحصول عليه بغلي الماء وجمع البخار الناتج وتكثيفه في أنبوب بواسطة التبريد وإعادته للشكل السائل , استخداماته : تحضير الكواشف في المخبر وغسل الأدوات . Video

https://youtu.be/VHZitT0-fCY

3. *الماء المعد للحقن* *WFI* : هو الماء الخالي من البيروجينات Endotoxin التي هي جزء من الجدار الخلوي للجراثيم سلبيات الغرام , يمكن الحصول عليه بطريقة vapor compression (VCD) مشابهة لطريقة التبخير مع تطبيق قوة ضغط وإعادة استخدام حرارة البخار المتشكل , يجب ان يكون محتوى الاندوتوكسين أقل من 0.25 Eu\ml , ويستخدم في تحضير الأشكال الصيدلانية العقيمة , في حال كان الاستخدام خلال 24 ساعة من التحضير فلاداعي لعملية حفظ , أما في حال الحاجة للاستخدام لفترة أطول يحفظ **بشروط خاصة ونظام خاص** . video

https://youtu.be/9lm2ubpOoL4

صفات النظام :

1. يتألف من (خزان كبير + سلسلة أنابيب توزع الماء) .
2. مصنوع من الستانلس ستيل 316 L .
3. خالي من النتوءات والزوايا الحادة والوصلات التي تحوي جوانات.

4. لايوجد أقسام ميتة وذلك من خلال جعل الماء موصول مباشرة على الخط الرئيسي

شروط الحفظ :

1. دوران مستمر للماء تحت ضغط عالي وذلك بهدف منع التصاق وتثبت الجراثيم وتشكيل البؤر .
2. درجة حرارة 80 درجة مئوية لمنع نمو الأشكال الإعاشية للجراثيم ولمنع البذيرات والأبواغ من الإنتاش .
3. وجود UV للحفاظ على العقامة ومنع تشكيل بؤر إنتانية .
4. تركيب مراشح 0.22 كارهة للماء عند خروج الماء من الخزان وعند عودته من دورانه في نظام توزيع الماء .
5. إضافة مادة مضادة للجراثيم بتراكيز منخفضة كمشتقات الكلور .

✓ يراقب الماء جرثومياً من خلال أخذ عينات من الماء وزراعتها لمعرفة فيما إذا كانت ملوثة أم لا وذلك وفق إحدى آليات الزرع الدستورية التالية :

A. *طريقة الرقم الأكثر احتمالاً MPN* : طريقة كيفية للخلايا الجرثومية الحية , نأخذ 3 مجموعات من الأنابيب كل مجموعة مكونة من 3 أنابيب , نضع في كل أنبوب من المجموعة الأولى 10 مل ماء , وفي كل أنبوب من المجموعة الثانية 1 مل ماء , وفي كل أنبوب من المجموعة الثالثة 0.1 مل ماء , تحضن الأنابيب ونلاحظ العكر , يوجد جدول الاحتمال يحدد عدد المستعمرات حسب عدد الأنابيب التي لوحظ فيها النمو .

B. نرشح حجم كبير من الماء مايقارب 1متر مكعب ومن ثم نزرع المرشحة بشكل كمي .

C. العد على السطح وفي العمق كما ذكر في الجلسة الأولى .

تطهير نظام حفظ الماء وتعقيمه فيما لوكان ملوثاً :

يتم ذلك حسب حجم نظام توزيع الماء وشكله .

- إذا كان حجم نظام توزيع الماء مناسب ويتحمل ضغط عالي يمكن تحويل النظام بكامله لصاد موصد ويعقم بالحرارة الرطبة .
- إذا كان هناك إمكانية للتعقيم بالحرارة الجافة , يتم ضخ ماء عالي الحرارة 170درجة ولمدة كافية (ساعة تقريبا) .
- استعمال معقمات كيميائية لتعقيم أنظمة توزيع الماء بكافة أنواعه .
- من المواد المستعملة في التعقيم :
  i. هيبوكلوريت الصوديوم وغاز الكلور بتركيز 5 ppm – o.5 لمعظم الأغراض إلا في حال الوصلات والأوعية والمضخات يستعمل بتركيز 100 ppm- 50 .
  ii. محلول الفورم ألدهيد 1 % لمعالجة أنظمة الماء المقطر والماء المحضر بالتحال العكسي .
- يجب الانتباه عند التعقيم بالمواد الكيميائية إلى المناطق البعيدة في نظام توزيع الماء والتي لاتصلها المواد المعقمة .
- يفضل استعمال مواد صلبة (خرزات زجاجية) ضمن تيار السائل للمادة المطهرة والذي يدور بسرعة مناسبة من أجل إزالة المواد المتراكمة بما فيها البؤر الانتانية في حال وجودها .
- يجب أن يزال الأثر المتبقي من المادة المطهرة بالغسيل بالـ WFI ويجب أن يتم التأكد من أن عملية التطهير فعالة من خلال الزرع المتكرر لسوائل الغسيل والشطف بعد انتهاء عملية التطهير مع عدم نسيان إبطال فاعلية المادة المطهرة من سوائل الغسيل واستخدام الشاهد الإيجابي .

التجربة العملية :

- زرع عينة من الماء المقطر \ ماء معد للحقن .
- زرع عينة من ماء الصنبور .

الجلسة الرابعة : قياس فاعلية المادة المضادة للجراثيم غير الصادات الحيوية

- ✓ بداية سنميز بين مفهومين :
  1. التطهير : تخفيض عدد الجراثيم إلى الحد اللامؤذي .
  2. العقامة : مفهوم مطلق يدل على عدم وجود أي شكل قابل للحياة .
- ✓ تقسم مضادات الجراثيم Antimicrobial agent إلى :
  1. صادات حيوية Antibiotic : مصدرها طبيعي أو صناعي أو نصف صناعي , آلية تأثيرها انتقائية على الخلايا الجرثومية أي لاتؤثر على العضوية الحية, سميتها انتقائية وغير سامة للإنسان , تؤثر على الجدار الخلوي أو بروتينات الجراثيم , فعاليتها غير مرتبطة بالتركيز (المثبط يبقى مثبط والقاتل يبقى قاتل) .
  2. المطهرات non -antibiotic : مواد كيميائية ذات فعالية مضادة للجراثيم ,آلية تأثيرها غير انتقائية على الخلية الجرثومية أي أنها تؤثر على الخلايا الحية الجرثومية وغير الجرثومية (تؤثر على الغشاء الحيوي وتسبب تخريش له) وترتبط سميتها وفعاليتها بالتراكيز المستخدمة منها (زيادة أو نقصان) .
- ✓ نقيس المادة المطهرة من خلال قياس فعاليتها أي من خلال الأثر الذي تقوم به وليس من خلال البنية.
- ✓ تقسم المطهرات إلى :
  1. Disinfectant : بتراكيز عالية تستخدم لتعقيم السطوح غير الحية فقط بشرط ألا تؤذي هذه السطوح (مثل حمض كلور الماء – حمض الخل الثلجي) .
  2. Antiseptic : لتعقيم السطوح الحية ولا تسبب أذية كالكحول .
  3. Preservative : لها فعالية مطهرة بتراكيز قليلة , ليس لها سمية , تستخدم لحفظ المواد الغذائية والأدوية مثل hydrogen peroxide .
- ✓ تعرف دساتير الأدوية المادة المطهرة على أنها تخفض المستوى الجرثومي إلى الحد اللامؤذي الذي يتغير بتغير نوع الجرثوم ودرجة إمراضيته وفوعته (10^5 من السلمونيلا تعتبر مؤذية , 10 جراثيم من الشيغلا مؤذية , جرثومة واحدة من السل مؤذية) ولنكون أكثر دقة عرف دستور الأدوية البريطاني BP فاعلية المادة المطهرة على أنها النقص بدرجة التلوث بحدود 99.999%

أو خفض درجة التلوث بمقدار 5 log cycle أي خفض عدد المستعمرات الجرثومية بمقدار 99.999% وذلك في الزجاج مع الأخذ بعين الاعتبار **شروط التطبيق** .

العوامل المؤثرة في فاعلية المواد المطهرة :

تتأثر فعالية المواد المطهرة بشروط التطبيق التي هي :

1. تركيز المادة المطهرة .
2. درجة PH .
3. الحرارة .
4. مدة التطبيق .
5. وجود مواد عضوية (صوابين - منظفات) تؤثر بشكل أو بآخر على فاعلية المادة المطهرة (تآزر أو تنافر) .

✓ سنميز بين مفهوم فاعلية التطهير وفاعلية المادة المطهرة :

1. فعالية التطهير : هي فعالية العملية والمادة بالشروط المتاحة في المخبر دون معرفة نوع الجرثومة.
2. فعالية المادة المطهرة : تطبيق المادة بالشروط المثالية التي حددها المصنع (تركيز – زمن) وتكون الجرثومة معلومة النوع .

طرق قياس فاعلية المادة المطهرة وقدرتها المضادة للميكروبات :

1. تحديد الحد الأدنى المثبط للنمو الجرثومي :Minimum inhibitory concentration (MIC)
نحضر سلسلة أنابيب تحوي 9 مل مصل فزيولوجي عقيم (أو ماء مقطر عقيم) ونختار مادة مطهرة يكون الجرثوم حساس لها (نوع الجرثوم معروف) , نضع في كل أنبوب كمية متزايدة من المادة المطهرة (2-4-6-8- ...الخ) ملغ , نضيف 1 مل من المعلق الجرثومي معروف التركيز لكل أنبوب ونمزج جيدا ونحضن مدة كافية , ونلاحظ العكر في كل أنبوب , تناقص العكر دليل على أن المادة المطهرة قد بدأت بعملها , نراقب الأنابيب ونلاحظ تركيز المادة المطهرة في أول أنبوب اختفى فيه العكر يكون هو الـ MIC .

ملاحظة هامة : MIC هو قيمة خاصة بالجرثومة وليس المادة المطهرة فهذا التركيز من المادة قد يكون غير كاف لجرثومة أخرى .

بما أن العين لا تلاحظ العكر إلا إذا كان تركيز الجراثيم 10^6 لذلك نلجأ لتحديد MBC .

2. تحديد التركيز الأدنى القاتل للجراثيم minimum bacteriocidic concentration (MBC)

هو القادر على قتل 99.999 % من الجراثيم , نأخذ أنبوب الـMIC وكافة الأنابيب التالية له ونزرع كل منها على طبق بتري ونحضن بوسط عقيم ولمدة كافية ونلاحظ النمو في أطباق البتري , وأول طبق لانلاحظ فيه نمو يكون دالا على الأنبوب الذي يحوي MBC من المادة المطهرة

ملاحظة : يمكن أن يكون MBC = MIC

3. منحنيات القتل Killing curve : تحدد استجابة الجراثيم لتراكيز محددة من المواد المطهرة خلال أسبوع لـ 10 أيام , نزرع الجراثيم على عدة اطباق ونطبق على كل طبق تركيز معين من المادة المطهرة , ثم نفحص عدد الجراثيم تحت المجهر (نراقب الموت الجرثومي) عند كل تركيز ونرسم مخطط بياني يفيدنا بمعرفة التركيز المطلوب عند تحديد عدد المستعمرات .

فاعلية التطهير :

- ✓ المقصود هو أن المادة المطهرة قد أدت دورها وأعطت النتيجة المطلوبة , كما ذكرنا أن الفعالية ترتبط بعدة عوامل فقد تكون المادة المطهرة جيدة ولكن بسبب اختلاف أحد الشروط لم تقم بالدور المطلوب على أكمل وجه لذلك لابد من قياس فاعلية التطهير .
- ✓ يتم اختبار فاعلية التطهير بأخذ مسحات من مساحات معلومة من السطوح التي تم تطهيرها ونخلصها من محتواها من الجراثيم ونبطل فعالية المادة المطهرة ونزرعها بشكل كمي وتقدر النتيجة بعدد المستعمرات في وحدة المساحة ومقارنة النتيجة مع الحدود المسموحة والمقررة من الجهات المنظمة لعملية مراقبة التلوث (معمل أو مشفى) .
- ✓ هناك اختبارات مختلفة تقيس فاعلية المادة المطهرة على بعض الجراثيم :

1. فاعلية المادة المطهرة ضد البذيرات الجرثومية أو الأبواغ الفطرية , حيث تضاف المادة المطهرة بشروط التطبيق المثلى إلى معلق من البذيرات أو الأبواغ ومن ثم دراسة الفاعلية من خلال معرفة مقدار النقص في عدد البذيرات أو الأبواغ مع ملاحظة أن فترة الحضن يجب ان تكون أطول للسماح للبذيرات والأبواغ بالإنتاش .

2. فاعلية المادة المطهرة المضادة للمتفطرات التي هي من أكثر الأنواع مقاومة للمطهرات بالإضافة لكونها بطيئة النمو وفوعتها الإمراضية عالية جداً لذلك تستبدل بنوع من المتفطرات له نفس المقاومة للمطهرات لكن دون قدرة إمراضية وبسرعة نمو مقبولة تعرف باسم M.terra .
3. فاعلية المواد المطهرة ضد الفيروسات : يتم تطبيق المادة المطهرة على مزروع نسيجي لأحد الفيروسات قليلة القدرة الإمراضية ومن ثم نرشح المستنبت الخلوي بهدف الحصول على الفيروسات فقط وبعد إلغاء فاعلية المادة المطهرة من الرشاحة تزرع من جديد على مستنبت خلوي مناسب ويلاحظ فيما إذا حدث نمو أم لا .

التجربة العملية :

- نحضر معلق جرثومي معلوم التركيز 10^6 (C_0), نأخذ منه 1 مل .
- نضيف له 1 مل كحول وننتظر 2 دقيقة (مدة التطبيق) .
- نحضر سلسلة عيارية يحتوي كل منها على 9 مل من محلول (ماء مقطر عقيم + توين 1-5%) لإلغاء فعالية المادة المطهرة بالادمصاص , نمدد العينة السابقة (معلق جرثومي + كحول) تمديد عشري لتصبح العينة قابلة للعد ونزرع بطريقة الزرع على السطح ونحضن بالشروط المناسبة ثم نحسب C_1 .
- نحسب الفرق $C_0 - C_1$ يجب أن يكون بمقدار 5 log cycle .
- يجب ان يكون عدد الجراثيم بنفس المرتبة عند المقارنة بين C_0 وC_1 .
- مثلاً : $150 * 10^7$ و$20 * 10^3$, نحول 150 لتصبح $15 * 10^8$ ثم نقارن .

الجلسة الخامسة : قياس المحتوى الجرثومي للأشكال الصيدلانية غير العقيمة والمواد الأولية المكونة لها

- ✓ تختلف الأشكال الصيدلانية غير العقيمة عن بعضها بالحد المسموح به من الجراثيم وبنوع الجرثومة , فالجرثوم المسموح به في الكريمات مثلاً يختلف عن المسموح به في الشرابات والمعلقات , وكل دستور يحدد Microbial Limit حد جرثومي معين للجراثيم , فالدستور البريطاني يحدد الحد المسموح به في:
  - الشرابات 100 CFU\ml بينما وفق وزارة الصحة يكون الحد 500 CFU\ml .
  - الكريمات والمراهم 10^3 CFU\mg .
  - مضغوطات 10^3 CFU\mg
  - تحاميل 10^4 CFU\mg
- ✓ لكي نحضر مستحضر فعال وسليم ومقبول دستورياً يجب فحص المواد الأولية المكونة لهذا المستحضر حيث تخضع المواد الأولية سواء فعالة أو سواغات لعدة فحوصات منها الحمل الحيوي Bioburden ,
- ✓ الحمل الحيوي Bioburden : يعرف بأنه عدد الجراثيم الفعلية في الشكل الصيدلاني والناتج عن العد العيوش ويقدر بـ CFU\mg أو CFU\ml .
- ✓ بينما الـ Microbial limit يعرف بأنه الحد الأعظمي من الجراثيم الذي يسمح الدستور بوجوده ضمن الأشكال الصيدلانية غير العقيمة أو المواد الأولية بشرط عدم وجود أي جرثومة مرفوضة ويقدر بـ CFU\ml أو CFU\mg .
- ✓ يتم الزرع على أوساط انتقائية لتحديد وجود الجراثيم المرفوضة كالـ Ecoli (مكونكي) .
- ✓ ويجب ألا يتجاوز الحمل الحيوي الحد الجرثومي حتى نقبل الشكل الصيدلاني ويقدر بـ CFU\mg أو CFU\ml .

Bioburden > Microbial limit → Rejected , need to be sterilized .

Bioburden < Microbial limit → accepted .

- ✓ هناك مواد كالحموض والقلويات تعد أوساط غير مناسبة لنمو الجراثيم لذلك لاداعي لإجراء الاختبار لها , أما المستحضر النهائي finished product فلابد من إجراء فحص جرثومي له قبل طرحه في الأسواق.

تحديد المحتوى الجرثومي للمواد الأولية للأشكال النظيفة (غير العقيمة) :

- نأخذ عينة (كمية معلومة) من المواد الأولية Raw Material موزونة بالغرام في حال كانت صلبة كالباراسيتامول والفالسارتان وغيرها ... وبالملليتر في حال كانت سائلة كالزيوت , وتزرع في أوساط نوعية مناسبة (هوائي – لاهوائي – فطور) وتحضن بالشروط المناسبة والمدة الكافية وبعد التأكد من خلوها من الجراثيم المرفوضة كالـ Ecoli يقدر عدد المستعمرات في وحدة القياس المستخدمة وتحاكم النتيجة كالتالي :

1. إذا كان عدد الجراثيم > من الحد المسموح به ترفض المادة الأولية أو تعالج بالطريقة المناسبة بالحرارة مثلا لتصبح مطابقة للمواصفات أو تحول لتصنيع شكل صيدلاني آخر يسمح بوجود مستوى أعلى من التلوث الجرثومي شريطة أن تكون الجراثيم من النوع غير المرفوض .
2. إذا كان عدد الجراثيم < من الحد الأعظمي المسموح به نقبل المادة شريطة ألا تكون حاوية على جراثيم مرفوضة .
3. في حال كانت العينة تحوي على إحدى الجراثيم المرفوضة يتم رفض المادة الأولية حتى لو كان محتواها من الجراثيم قليل العدد ومطابق للدستور .

- في حال كانت المادة الأولية تملك فعالية تعيق نمو أو تثبط نمو أو تقتل الجرثوم , يجب إبطال الفاعلية المضادة للجراثيم لتلك المادة بالطريقة المناسبة شريطة إجراء اختبار التأكد من إبطال الفاعلية .
- في حال وجود فطور في المادة الأولية أو الشكل الصيدلاني النهائي يتم رفضهما مباشرة حيث لايمكن التعقيم ولايمكن تحويله لشكل آخر .

تحديد المحتوى الجرثومي للأشكال الصيدلانية النظيفة :

1. **الشرابات والمعلقات والمحاليل المائية وحيدة أو ثنائية الطور :** هي أشكال غير عقيمة أي أنها تحوي حد من الجراثيم حددته دساتير الأدوية والجهات المشرفة على عملية التصنيع , ولكي لايتخرب الشكل الصيدلاني نتيجة نمو هذه الجراثيم الموجودة فيه أو التي تدخل إليه أثناء الاستعمال يحفظ الشكل الصيدلاني بآلية تسمى نظام الحفظ الذي يعتمد على إضافة مادة كيميائية إلى الشكل الصيدلاني ذات تأثير مضاد للجراثيم تسمى المادة الحافظة , لذلك عند تطبيق اختبار قياس المحتوى

الجرثومي لهذه الأشكال الصيدلانية يتوجب التأكد من أن عملية إلغاء فاعلية المادة الحافظة قد تمت بالشكل الذي لايؤثر على نمو الجراثيم , يتم إلغاء فاعلية المادة الحافظة بإحدى الطرق التالية :

i. *التمديد :* من خلال إضافة مصل فزيولوجي يخفض تركيز المادة الحافظة دون الحد الأدنى المثبط للنمو MIC لهذه المادة وبالتالي تتحرر الجراثيم ضمن عينة الشكل الصيدلاني من تأثير المادة الحافظة ويسمح بنموها .

ii. *مواد مدمصة :* من خلال إضافة مواد تقوم بادمصاص المادة الحافظة على سطحها وبالتالي تخفض تركيزها الحر الفعال في الوسط الحاوي على الجراثيم وتقلل من التأثير المثبط لها على الجراثيم الموجودة في العينة .

iii. *مواد نوعية :* استخدام مواد نوعية تعاكس بشكل انتقائي فاعلية المادة المضادة للجراثيم كالبنسليناز في حال البنسلين .

iv. *الغسيل على سطح مرشحة :* يتم من خلال ترشيح الشكل الصيدلاني مباشرة او بعد الحل بمذيب مناسب (عقيم وليس له فعالية مضادة للجراثيم) عبر مرشحة جرثومية ذات قطر 0.45 ملم ومن ثم الغسيل المتكرر لسطح المرشحة باستخدام مصل فزيولوجي عقيم وثم زرع الجراثيم المحتجزة على سطح المرشحة بشكل كمي على الوسط المناسب وحضنها بالشروط الملائمة ولمدة كافية .

- يتم التأكد من نجاح عملية إبطال فاعلية المادة الحافظة باستخدام الشاهد الإيجابي الذي هو عبارة عن جرثوم حساس للمادة المبطل فاعليتها المضادة للجراثيم , يزرع هذا الجرثوم بكمية قليلة في وسط يحتوي جزء من العينة المراد إجراء الاختبار لها , ونلاحظ النمو , في حال تشكلت مستعمرات هذا يدل على أن عملية الإبطال ناجحة أما في حال عدم نمو الجراثيم فهذا يدل على أن عملية الإبطال فاشلة .

2. الأشكال الصيدلانية متعددة الأطوار كالكريمات والأشكال الصيدلانية اللامائية كالمراهم :

- يوجد في هذه الأشكال طور لامائي إضافة إلى المادة الفعالة على السطح والتي ربما كان لها تأثير مضاد للجراثيم , لذلك نلجأ لتفكيك الشكل الصيدلاني إلى مكوناته الأساسية باستخدام الطريقة الملائمة , مثلا إذا كان كريم نمط زام يحل الكريم في كمية كافية من مصل فزيولوجي عقيم أما إذا كان كريم مام نستخدم مذيب عضوي عقيم وليس له فاعلية مضادة للجراثيم من أجل تخريب الشكل

الصيدلاني ثم ترشح العينة ويغسل سطح المرشحة للتخلص من تأثير المادة الحافظة وتزرع المرشحة بمافيها من الجراثيم بشكل كمي على الأوساط الزرعية الملائمة وتحضن بالشروط المثلى.

- تعامل المراهم العينية والمراهم المستخدمة في معالجة الحروق الكبيرة على الجلد كما في حال كريمات من نمط م\ز .

✓ تعتمد دساتير الأدوية في قياس المحتوى الجرثومي للأشكال غير العقيمة على طريقة العد العيوش حيث أن طبيعة الشكل الصيدلاني هي التي تحدد الطريقة المستخدمة , وقد حدد دستور الأدوية 4 طرق للعد :

1. *العد على السطح :* لعد الجراثيم الهوائية وهي مناسبة للأشكال التالية (شرابات – معلقات – مضغوطات – كبسولات) , بعد معاملة العينة أو المادة الأولية المراد فحصها والوصول لمرحلة تنمية الجراثيم نزرع حجم من العينة قدره 0.5- 0.1 مل على سطح علبة بتري تحتوي وسط صلب جاف وتحضن بالشروط المناسبة ولمدة كافية .
2. *العد في العمق Pour plate :* لعد الجراثيم الهوائية واللاهوائية , غير ملائمة للجراثيم الحساسة للحرارة , بعد معالجة العينة لتصبح جاهزة للعد , نضع 1 مل من العينة في طبق بتري فارغ ويصب الوسط الزرعي ونمزج العينة جيدا مع الوسط وتترك ليتصلب الوسط بحرارة الغرفة وتحضن بالشروط المناسبة والمدة الكافية وتعد المستعمرات المتشكلة على السطح وفي العمق .
3. *العد على سطح مرشحة :* مناسبة للشرابات والكريمات والأحجام الكبيرة وغير مناسبة للمعلقات , يرشح الشكل الصيدلاني أو المادة الأولية أو محاليلهم في مذيب مناسب عقيم وغير فعال ضد الجراثيم بهدف تجميع الجراثيم الموجودة في العينة والتخلص من تأثير المادة الحافظة ثم تزرع المرشحة بما فيها من الجراثيم بشكل كمي وعلى أوساط ملائمة وبشروط ملائمة .
4. *طريقة العد الأكثر احتمالاً :* نصف كمية وتعتمد على العكر .

التجربة العملية :

- نحل 1غ من مادة أولية دوائية ونزرع على طبق بتري بعد إجراء التمديد العشري .
- نزرع عينة من شراب سائل جاهز للاستخدام على طبق بتري بطريقة الزرع على السطح ونحضن بالشروط المناسبة .

الجلسة السادسة : تحري الجراثيم المرفوضة في الأشكال الصيدلانية غير العقيمة

- ✓ كما ذكرنا سابقاً يوجد شرطين لقبول المستحضر الصيدلاني جرثومياً :
  1. خلوه من الجراثيم المرفوضة .
  2. الحمل الحيوي أقل من الحد الجرثومي الدستوري .
- ✓ سنتحرى عن الجراثيم المرفوضة كيفياً لأن وجود جرثومة واحدة يقتضي رفض المستحضر .
- ✓ تختلف الدساتير بالحدود الميكروبية لكنها تتفق جميعها على أنه يوجد 7 أنواع من الجراثيم , وجود جرثومة واحدة منها يستدعي رفض المستحضر .
- ✓ هذه الجراثيم هي :
  1. مكورات عنقودية مذهبة Staphylo coccus aureus
  2. الايشريشيا الكولونية E.coli
  3. سالمونيلا salmonella .
  4. الجراثيم المقاومة للصفراء – سلبية الغرام كالكليبسيلا .
  5. الزائفة الزنجارية pseudomonas aeruginosa .
  6. المطثيات clostridia
  7. فطور المبيضات البيض candida albicans .

التحري عن الجراثيم المرفوضة :

1. **التكثير** : هي الخطوة الأهم , لأنه عند الزرع باللوب يكون حجم العينة صغير 5 ميكرون فاحتمال كشف الجرثومة قليل وبما أن الكشف كيفي فلا مشكلة بزيادة العدد . video

https://youtu.be/XJQNU9o3fhI

- نزرع العينة على وسط (Tryptic soya broth) TSB الغني بالمواد المغذية وبعد الحضن نزرع على أوساط انتقائية , نأخذ 1 مل من الشكل السائل أو 1 غ من الشكل الصلب ونكمل الحجم لـ 10 مل بإضافة 9 مل TSB , في حال كان عدد الجراثيم المتوقع قليل نلجأ لعملية ترشيح حيث نأخذ 10 مل من الشراب ونكمل الحجم لـ 100 مل بالوسط المغذي ثم نرشح وتفيد عملية الترشيح أيضاً في

إلغاء فاعلية المادة الحافظة , الشرط في عملية التكثير أن تكون نسبة التمديد 1:10 , ثم نحضن لمدة 20 – 18 ساعة بحرارة 30 -35 درجة .

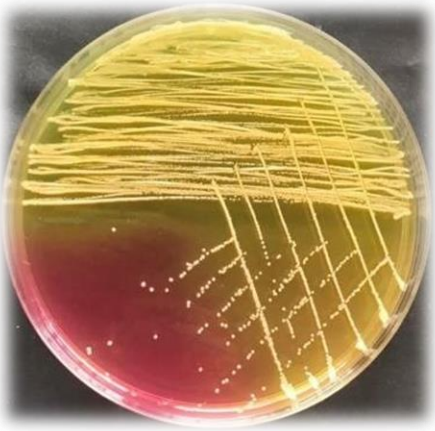
- إذا كانت العينة لمستحضر سائل ← نضيفها مباشرة للمرق المغذي .
- إذا كانت العينة لمستحضر صلب ← نحلها ثم نضيفها للمرق المغذي .
- إذا كانت العينة لمرهم ← نحله بمذيب عضوي ثم نستخدم مرشحة جرثومية , أبعاد المرشحة 0.45 ميكرون ثم نضع المرشحة في وسط مغذي TSB .

اختبارات التحري عن الجراثيم المرفوضة :

المكورات العنقودية المذهبة

Staphylococcus aureus

1. نقوم بتكثير العينة مرة واحدة (10 مل عينة لـ 90 مل TSB) , ونحضن بحرارة 30 - 35 لمدة 18 – 24 ساعة .
2. بعد انتهاء فترة الحضن نأخذ بالأوز ونزرع على وسط شابمان (MSA(mannitol salt agar ذو اللون الأحمر المكون من كلور صوديوم وسكر مانيتول ومشعر أحمر الفينول الذي يعطي لون أحمر في الوسط القلوي وأصفر في الوسط الحامضي, ونحضن لمدة 18 – 72 ساعة بحرارة 30 – 35 درجة , ثم نقرأ النتيجة :



   - في حال نمو مستعمرات صفراء اللون محاطة بهالة صفراء وانقلاب لون الوسط للأصفر ← عنقوديات مذهبة فالعينة مرفوضة .
   - في حال نمو مستعمرات صفراء مع بقاء لون الوسط أحمر ← عنقوديات غير مذهبة غير مرفوضة .
   - غياب أي نمو جرثومي ← عدم وجود عنقوديات مذهبة .
3. التفسير : إن العنقوديات المذهبة هي الوحيدة القادرة على تخمير المانيتول وتعطي نواتج حمضية تغيرPH فيتغير لون الوسط من الأحمر للأصفر المذهب لوجود المشعر وبالتالي الوسط شابمان انتقائي للعنقوديات المذهبة .

Escherichia coli
(E.coli)

1. تعتبر هذه الجرثومة مشعر التلوث البرازي وتدل على التلوث بمياه الصرف الصحي .
2. بعد تكثير العينة بوسط TSB وانتهاء فترة الحضن 18 – 20 ساعة , نأخذ بشكل عقيم 1 مل من الوسط السابق المحضون ونضيفه لـ 99 مل من وسط مكونكي سائل (نوعي خاص بتكثير سلبيات الغرام المخمرة للاكتوز كالـ Ecoli والكليبسيلا) ونحضن بدرجة حرارة 42 – 44 لمدة 24 – 48 ساعة .

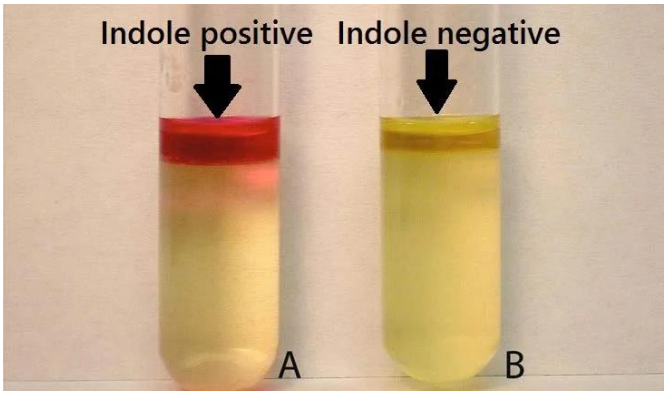
(تم رفع الحرارة لـ 44 درجة لزيادة الاصطفائية لجرثومة الـ Ecoli التي تتحمل الحرارة العالية).

3. بعد انتهاء فترة الحضن الثانية (عملية التكثير الثانية) نزرع بواسطة لوب عقيم على وسط صلب مكونكي (نوعي لسلبيات الغرام ومكون من كلور الصوديوم وسكر لاكتوز واملاح صفراوية مثبطة لإيجابيات الغرام ومشعر الحمرة المعتدلة الذي يعطي لون احمر في الوسط الحامضي و أصفر في الوسط القلوي) ونحضن لمدة 72 ساعة بحرارة 30 – 35 درجة ثم نقرأ نتيجة الاختبار:

- في حال عدم ظهور نمو ← الوسط خال من الجراثيم المخمرة للاكتوز وبالتالي خال من الـ Ecoli .
- في حال كانت المستعمرات حمراء اللون ← جراثيم مخمرة للاكتوز (Ecoli or klebsiella) .
- في حال كانت المستعمرات حمراء مخاطية مقببة لها خاصية التمطط ← كليبسيلا .

4. التفسير : إن الجراثيم المخمرة للاكتوز تغير لون الوسط من الأصفر إلى الأحمر وتعطي مستعمرات حمراء مع هالة وردية بسبب ترسب الأملاح الصفراوية .

5. وللتأكد من هوية الجرثومة يمكن أن نزرع عينة من مكونكي السائل التكثيري على وسط EMB وفي حال ظهور لمعة معدنية يودية خضراء يدل ذلك على وجود Ecoli.



6. كما يمكن أن نلجأ لاختبارات كيميائية حيوية للتأكد , كاختبار حلقة الإندول حيث يكون الوسط سائل يحوي حمض أميني تربتوفان الذي يتفكك هوائيا ليعطي حلقة الاندول في حال وجود Ecoli يظهر لون أحمر في الوسط بعد زرع مستعمرة فيه وهذا اللون دليل على أن الجرثومة فككت التربتوفان .

السالمونيلا
Salmonella

- ✓ عصيات سلبية الغرام من الأمعائيات لها عدة أنواع أهمها التيفية .
- ✓ تحتاج تكثير أكثر من مرة .

1. 10 مل شراب لـ 90 مل TSB وحضن بحرارة 30 – 35 لمدة 24 ساعة .
2. إضافة 0.1 مل من الوسط السابق بشكل عقيم إلى 10 مل من وسط نصف صلب انتقائي خاص بتكثير السالمونيلا يدعى RVSEB (Rappaport Vassiliadis salmonella enrichment broth) ونحضن بحرارة 30 – 35 لمدة 24 ساعة .
3. بعد انتهاء الحضن نزرع بلوب عقيم على وسط صلب انتقائي للعصيات سلبيات الغرام هو XLD (xelose lysin deoxy cholat agar) المكون من لاكتوز وسكرز واكسيلوز ومشعر أحمر الفينول ونحضن لمدة 24 ساعة حرارة 30 -35 ونقرأ النتيجة :

- نمو مستعمرات حمراء بمركز أسود ← سالمونيلا ونتأكد من خلال اختبارات كيميائية حيوية .

- يمكن أن نزرع على وسط S.S وفي حال نمو مستعمرات شفافة بمركز أسود بسبب إطلاق غاز كبريت الهيدروجين H_2S← سالمونيلا
- أو نزرع على وسط كليغلر KIA ونلاحظ ظهور راسب أسود ← سالمونيلا

سلبيات الغرام المقاومة للصفراء

مثال عليها الكليبسيلا .

1. مرحلة إنتاش : 1 مل من العينة ونكمل الحجم لـ 10 مل بوسط TSB ويحضن 2- 5 ساعة بحرارة 20 – 25 (فترة الحضن قصيرة بحرارة منخفضة لإنتاش الجراثيم دون تكثيرها وتضاعفها) .
2. مزج العينة جيدا ونقلها بشكل عقيم إلى وعاء مناسب يحوي وسط تكثيري خاص بالأمعائيات سلبية الغرام المقاومة للصفراء (mossel Enterobacteriaceae enrichment broth) MEEB ويكمل الحجم لـ 100 مل والحضن 24 ساعة بحرارة 30 – 35 .
3. بعد انتهاء الحضن نزرع بواسطة لوب عقيم على وسط زرع جديد violet red bile glucose) agar) ونقرأ النتيجة :

- وجود مستعمرات حمراء محاطة بهالة من رواسب محمرة دليل على وجود سلبيات الغرام المقاومة للصفراء ويتم التأكد منها باستكمال اختبارات تحديد الهوية .
- غياب أي نمو جرثومي ووجود مستعمرات بغير المواصفات السابقة يعني غياب هذا النوع من الجراثيم .

الزائفة الزنجارية

pseudomonas

1. تكثير العينة حيث نضيف 10 مل عينة لـ 90 مل TSB ونحضن بحرارة 30 – 35 لمدة 24 ساعة.
2. بعد انتهاء فترة الحضن نأخذ عينة من الوسط السابق ونزرع على وسط Cet سيتراميد آغار لونه أصفر يحوي مادة مطهرة من مشتقات الأمونيوم الرباعية حيث تعد البسودوموناس الجرثومة الوحيدة القادرة على المقاومة والنمو , ثم نحضن بحرارة 30 – 35 لمدة 24 ساعة ونقرأ النتيجة :

- نمو مستعمرات وتحول لون الوسط إلى الأزرق المخضر ← وجود بسودوموناس , حيث يكون التغير بسبب الأصبغة التي يفرزها وتنحل بالماء , ويتم التأكد من خلال استكمال الاختبارات الكيميائية الحيوية المحددة للهوية مثل اختبار الاوكسيداز الإيجابي . Video

https://youtu.be/W3RY8o6By-A

المطثيات Clostridium

✓ هي جراثيم لاهوائية إيجابية الغرام قادرة على تشكيل البذيرات بالشروط الصعبة لذلك من الضروري التحري عنها .

1. نحضر أنبوبين نضع في كل منهما 1 مل من العينة ونكمل الحجم لـ 10 مل بوقاء , ثم نسخن الأنبوب الأول لحرارة 80 لمدة 10 د ونبرده سريعاً , ثم نكمل الحجم في كل أنبوب بوسط RMC (Rein forced medium for clostridia) السائل الخاص بتكثير المطثيات لـ 100 مل .

- التسخين : لتحريض تشكيل البذيرات حيث يتم القضاء على كل الأشكال الإعاشية للجرثوم باستثناء التي ستتحول لبذيرات .

2. نحضن الأنبوبين (الأول يحوي بذيرات) والثاني (يحوي أشكال إعاشية) بحرارة 30 -35 لمدة 48 ساعة بوسط لاهوائي .
3. بعد انتهاء الحضن نزرع بواسطة لوب عقيم من الأنبوبين السابقين على وسط CAM(Columbia agar medium) ثم نحضن لمدة 48 ساعة بحرارة 30 – 35 بجو لاهوائي ونقرأ النتائج :

- وجود مستعمرات لعصيات إيجابية الغرام سلبية الأوكسيداز في كلا العلبتين دليل على وجود المطثيات .
- غياب أي نمو جرثومي أو وجود مستعمرات لجراثيم إيجابية الأوكسيداز يعني غياب المطثيات .
- وجود نمو في علبة بتري واحدة (من الأنبوب الذي لم يسخن) دون الأخرى دليل على وجود جراثيم لاهوائية غير المطثيات لأنها لو كانت مطثيات لنمت في العلبتين .

فطور المبيضات البيض
Candida albicanus

1. نأخذ 1 مل من العينة ونكمل الحجم لـ 10 مل بوسط SDB(sabouraud dextrose broth) الذي يحوي صادات حيوية تثبط نمو الجراثيم فلا تنمو عندها إلا الفطور وبالتالي أصبح هذا السائل انتقائي للفطور (عملية تكثيرية) .
2. نحضن بحرارة 30 – 35 لمدة 5 أيام .
3. نزرع من الوسط السابق بعد انتهاء الحضن بواسطة لوب عقيم على وسط صلب انتقائي للفطور هو SDA ونحضن بحرارة 30 – 35 لمدة 48 ساعة , ونقرأ النتيجة :

- وجود مستعمرات كريمية بيضاء مؤشر لوجود مبيضات بيض ونكمل التحري باختبارات تحديد الهوية الخاصة بالمبيضات .
- عدم نمو مستعمرات ← غياب فطور .

الجلسة السابعة : قياس فاعلية المادة الحافظة وفاعلية الحفظ

- ✓ المادة الحافظة هي مادة كيميائية ذات فاعلية مضادة للنمو الجرثومي غير سامة بالتراكيز المستخدمة ضمن الشكل الصيدلاني .
- ✓ تضاف للشكل الصيدلاني النظيف بهدف :

1. تثبيط نمو الجراثيم ضمنه أثناء وجوده على الرف نتيجة عدم عقامة المواد الأولية المكونة له .
2. حفظ الشكل الصيدلاني خلال فترة الاستخدام مما قد يتعرض له من تلوث خارجي نتيجة الاستعمال الخاطئ أو سوء التخزين .

- ✓ صفات المادة الحافظة :

1. فعالة في PH الشكل الصيدلاني (مثل بنزوات الصوديوم حيث تزداد فعاليته كلما انخفضت درجة الحموضة , وسوربات البوتاسيوم الفعال في PH<4.5) .
2. لها قدرة مضادة للجراثيم ذات طيف واسع (مثل phenoxyethanol المستخدم في اللقاحات)
3. آمنة وغير سامة حيث يكون تركيزها MIC و MBC أقل من التركيز المسموح وجوده من المادة ضمن العضوية .
4. رخيصة الثمن .
5. ألا تغير من الخواص الفيزيائية للشكل الصيدلاني ولا تقلل من فعاليته .
6. ألا تتداخل مع المواد الفعالة والسواغات .

العوامل المؤثرة في فاعلية المادة الحافظة :

1. PH الوسط .
2. درجة الحرارة .
3. التراكيز المستخدمة منها (ألا تكون مؤذية للشخص ولا للشكل الصيدلاني وفعالة بنفس الوقت) .

كيف نقيس فعالية المادة الحافظة :

نقوم بالاختبار في الزجاج in vitro وبشروط مماثلة لشروط الشكل الصيدلاني من حيث التركيز المستخدم والحرارة وPH وغيرها , وباستخدام جراثيم معيارية مرجعية بأشكالها المقاومة (بذيرات وأبواغ) وتحديد Mic ومنحنيات القتل لهذه الجراثيم تجاه المادة الحافظة , ثم نقارن هذه المعالم كتركيز مع التراكيز السموح إضافتها من المادة الحافظة ضمن الشكل الصيدلاني , فإذا كانت تلك التراكيز أي MIC وغيرها ضمن التركيز المسموح إضافته أو أقل منه ← المادة الحافظة فعالة ويمكن استخدامها .

نظام الحفظ وفعاليته :

- ✓ من المعروف في حفظ الأشكال الصيدلانية أن المادة الحافظة لوحدها غير كافية لاعتبارات عدة :
  1. عدم وجود مادة حافظة فعالة على كل العضويات الدقيقة بالتراكيز المسموح بها ضمن الشكل الصيدلاني .
  2. عدم الحرية في اختيار المادة الحافظة لاعتبارات خاصة بالشكل الصيدلاني والتي تحدد نوع المادة الحافظة الخاصة به (المواد المناسبة للمعلقات تختلف عن المواد المناسبة للكريمات) .
  3. المعالجات التي قد يتعرض لها الشكل الصيدلاني في المراحل اللاحقة من التصنيع كالحرارة .
- ✓ اعتمادا على النقاط السابقة يجب التفكير بعوامل مساعدة تساعد في عملية الحفظ , ومن هنا نشأ مصطلح نظام الحفظ الكامل (مادة حافظة + عوامل مساعدة) .
- ✓ نظام الحفظ يتضمن :
  1. المادة الحافظة .
  2. وجود هذه المادة في PH مناسب : حيث أن انخفاض الـ PH للشكل الصيدلاني يضمن جو غير ملائم للنمو الجرثومي .
  3. درجة حرارة الحفظ : الحرارة المنخفضة للشكل الصيدلاني تضمن جو غير ملائم للنمو الجرثومي.
  4. وجود المادة الحافظة مع الماء : نحاول قدر الإمكان تصنيع الشكل الصيدلاني بشكل بودرة تحل عند الاستخدام لضمان عدم النمو الجرثومي أثناء فترة وجوده على الرف .

هل نظام الحفظ قادر على حماية الشكل الصيدلاني ؟؟

يتم تحديد ذلك باختبار التحدي الذي هو إقحام عدد معين (تركيز معين) من الجراثيم المرجعية المعلومة في الشكل الصيدلاني ومراقبة تغير المحتوى الجرثومي خلال فترة من الزمن بوجود شرطين أساسيين :

1. تركيز الجراثيم النهائي ضمن الشكل الصيدلاني يجب أن يكون بين 10^6 CFU\ml – 10^5 :
   نحضر معلق جرثومي بتركيز 10^8 ثم نضيفه للشراب 100 مل فيصبح التركيز 10^6 وهو المطلوب.
   - نستثني مضادات الحموضة كالمالوكس فالتركيز النهائي المسموح به هو 10^4 CFU\ml- 10^3 لأن تحضيرها صعب وهي قلوية PH > 8 وبالتالي اختل شرط من شروط نظام الحفظ .
2. ألا يتجاوز حجم العينة المضاف 5 % من حجم العينة المدروسة (الحجم النهائي) وهذا الشرط محقق حيث نضيف 1 مل معلق لـ 100 مل شراب .

نتأكد من أن جملة الحفظ قادرة على تحقيق الهدف عند التأكد من أن الشكل الصيدلاني لم يتخرب ميكروبياً أي لم يزد عدد الجراثيم عن الحد المقبول في الأشكال النظيفة وعدم وجود أي نمو في حال كان الشكل عقيم .

الطريقة العملية لاختبار التحدي :

1. نضيف لعلبة شراب كاملة معلق جرثومي معلوم التركيز 10^8 ونراقب تغير العدد خلال فترة زمنية محددة حددها الدستور بـ 28 يوم وتختلف هذه المدة باختلاف الشكل الصيدلاني حسب فترة استخدامه مثلا الصادات فترة استخدامها 7 أيام .
2. نرسم مخطط بياني , محور السينات يعبر عن الزمن ومحور العينات يعبر عن العدد الجرثومي علما أننا نقيس الزمن من اللحظة 0 أي فور إضافة المعلق الجرثومي للشراب المدروس .
3. نأخذ 1 مل من الشراب المضاف له المعلق الجرثومي والذي أصبح تركيزه 10^6 , نجري سلسلة تمديدات لأن 10^6 غير قابلة للعد على طبق البتري و لإلغاء فعالية المادة الحافظة كي نسمح للجراثيم بالنمو على الطبق ونزرع من الأنبوب الأخير أوقبل الأخير , ثم نقوم بحساب C0 هي لحظة إضافة الجراثيم للشكل الصيدلاني ثم نحسب العدد بعد 3 ساعات ثم 6 ساعات ثم 12 ساعة ثم 24 ساعة ثم 3 أيام ثم 7 أيام ثم 14 يوم ثم 21 يوم ثم 28 يوم .

- الجراثيم المستخدمة لتحضير المعلق لهذا الاختبار حسب دستور الأدوية الأميركي هي الأكثر احتمالية لتلوث الشكل الصيدلاني (عنقوديات مذهبة – بسودوموناس – Ecoli) وتم ضافة الفطور بنوعيها خمائر (مبيضات بيض) خيطية (رشاشيات) لمعرفة فعالية نظام الحفظ ضدها .

- بعد الزرع يكون لدينا عدة احتمالات :

1. العدد ثابت طيلة فترة التجربة .
2. العدد ثابت لفترة معينة لأن النظام لم يتعرف بعد على الجراثيم وبعد فترة يتعرف عليها ويبدأ عمله فنلاحظ انخفاض العدد الجرثومي .
3. يزداد العدد الجرثومي حيث لم يستطع نظام الحفظ التعرف على الجراثيم فينهار .

- قسم دستور الأدوية الأميركي والبريطاني الأشكال الصيدلانية الموجودة على الرف لأربعة مجموعات :

1. **أشكال صيدلانية عقيمة متعددة الاستعمالات** : كالليدوكائين وابر الانسولين والقطورات , كي يُقبل الشكل الصيدلاني من هذه المجموعة ونقول أن نظام الحفظ فعال يجب أن يحقق شرطين :
   a) أن ينخفض العدد الجرثومي في اليوم 14 بمقدار 3 log cycle .
   b) وأن يبقى العدد ثابت باقي فترة التجربة إلى اليوم 28 .
2. **أشكال صيدلانية موضعية** : كالكريمات والمراهم والمضامض , كي يُقبل الشكل الصيدلاني ونقول أن نظام الحفظ فعال , يجب أن :
   a) ينخفض العدد الجرثومي في اليوم 14 بمقدار 2 log cycle .
   b) ويبقى العدد ثابت باقي التجربة لليوم 28 .
3. **الأشكال الفموية ماعدا مضادات الحموضة**: كي يُقبل الشكل الصيدلاني من هذه المجموعة ونقول أن نظام الحفظ فعال يجب أن :
   a) ينخفض عدد الجراثيم في اليوم 14 بمقدار 1 log cycle
   b) ويبقى العدد ثابت لليوم 28 .
4. **مضادات الحموضة :** بما أن الـ PH قلوي فهو مناسب للنمو الجرثومي ويكون العدد الجرثومي المسموح به $10^4 - 10^3$ وبالتالي يقبل الشكل الصيدلاني إذا بقي العدد ثابت في اليوم 14 وباقي فترة التجربة لليوم 28 .

1. نحضر معلق جرثومي بتركيز 10^8 من الجراثيم الدستورية .
2. نأخذ 1 مل من المعلق ونضيفه لعلبة شراب 100 مل فيصبح التركيز 10^6 وهو المطلوب .
3. نحضر سلسلة تمديدات من 6 أنابيب كل أنبوب يحوي 9 مل (ماء + توين) للتمديد والحصول على علبة بتري قابلة للعد وإلغاء فعالية المادة الحافظة .
4. نأخذ 1 مل من علبة الشراب الحاوية على المعلق الجرثومي ونمدد تمديد عشري بالسلسلة السابقة .

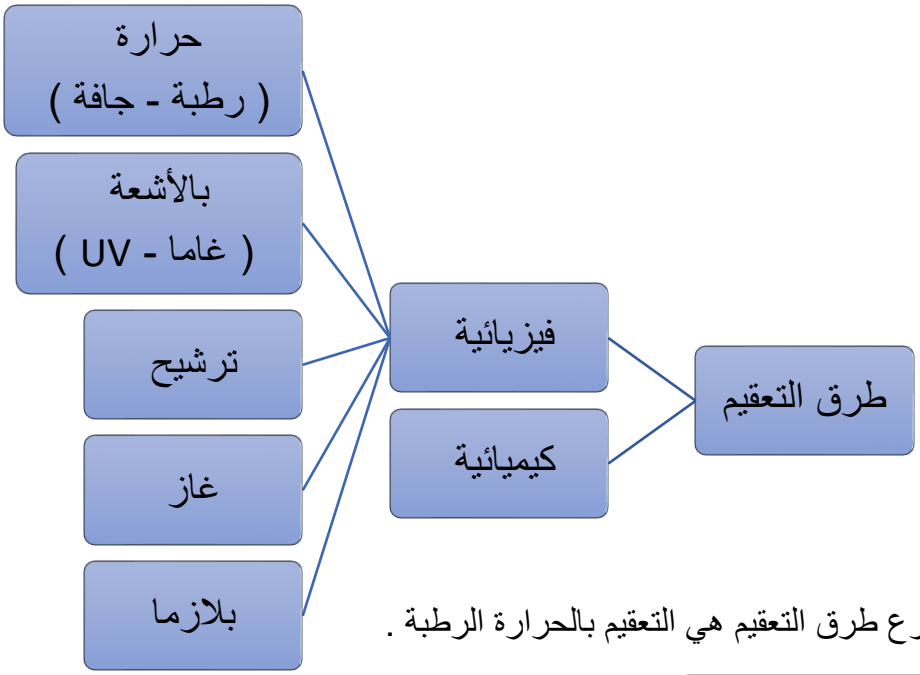
لاحظ أنه تم إلغاء فاعلية المادة الحافظة في الأنابيب فقط لأننا لم نضف توين للعلبة كاملة .

5. نزرع من آخر أنبوبين لنحصل على تركيز C0 .

الجلسة الثامنة : التعقيم

✓ *العقامة sterility :* هي غياب أي شكل قادر على الحياة في الجملة المدروسة وهو مفهوم مطلق لايقبل التجزئة فالأشياء إما أن تكون عقيمة أو غير عقيمة .

✓ *التعقيم sterilization :* هي العملية التي يتم فيها إزالة أو تخريب أي شكل قادر على الحياة كالعضويات الدقيقة (جراثيم – فطور – خمائر) .



✓ أسرع طرق التعقيم هي التعقيم بالحرارة الرطبة .

التعقيم بالحرارة الرطبة

- تعد من أفضل الطرق , عامل التعقيم هو بخار الماء , ومبدأ التعقيم تفاعل حلمهة يتم على البنى العضوية للخلية الجرثومية مثل الأنزيمات أو الجدار الخلوي لتعطيل وتخريب البنى الحياتية .
- شروطها : حرارة 121 وضغط 1.5 بار .
- الأجهزة المستخدمة بالتعقيم :

1. صاد موصد autoclave كبير الحجم يتسع لـ 200 لتر .
2. صاد موصد محمول Portable autoclave صغير الحجم يتسع لـ 20 لتر .

<u>أقسام جهاز الصاد الموصد :</u>

1. حجرة التعقيم : نضع فيها الأدوات التي نريد تعقيمها .

2. مصفاة أو شبكة تتوضع أسفل حجرة التعقيم .
3. وشيعة تكون مغمورة بالماء وتعتبر المصدر لبخار الماء .
4. ميزابة موصولة بصمام التخلية .
5. صمام الأمان (دوره التخلص من الفائض من البخار وضمان درجة حرار 121 طوال فترة التعقيم).
6. ساعة لقياس الضغط والحرارة .

طريقة عمل الجهاز :

1. عند غمر الوشيعة بالماء ووصل الجهاز بالمقبس الكهربائي ترتفع درجة الحرارة وتؤدي إلى غليان الماء , صمام الأمان مغلق وصمام التخلية مفتوح .
2. حجرة التعقيم تحوي هواء قبل أن نبدأ بالعمل وعند التشغيل يخرج بخار الماء بشكل متقطع وبعد مدة من الزمن يصبح بخار الماء مستمر (دليل على أن كامل حجرة التعقيم أصبحت تحوي بخار الماء) والحرارة لم تبلغ 121 C بعد .
3. بعد الخروج المستمر لبخار الماء نغلق صمام التخلية وننتظر لتصبح الحرارة داخل الحجرة 121 .
4. وعند الوصول للحرارة 121 نعير 15 دقيقة .
5. عند انتهاء الزمن نفصل الجهاز عن المقبس .
6. نخرج الأدوات ونتركها مغلفة حتى وقت الاستخدام للحفاظ على عقامتها .

صفات بخار الماء ليكون عامل تعقيم جيد :

1. أن يلامس الخلية الجرثومية .
2. الصفة الحدية : أن يكون بحالة توازن بين الطورين المائي والغازي بحيث يكون بخار الماء قادر على التخلي عن 80 % من طاقته ويقدمها للجسم المراد تعقيمه عند ملامسته .

أنواع بخار الماء :

1. بخار رطب مشبع : يتجمع في منطقة قريبة من الماء الذي تولد منه (مثل قطرات الماء المتولدة على غطاء ابريق الشاي) .

2. بخار جاف مشبع : يؤثر في منطقة بعيدة نسبيا عن الماء الذي تولد منه (البخار الذي يخرج من صمام ابريق الشاي)
3. بخار محمص super heated steam : هو هواء ساخن ليس عامل تعقيم جيد , لايملك صفة حدية , يجب ألا تتجاوز نسبته 5 % , ونحافظ على هذه النسبة بواسطة صمام الأمان .

أطوار عملية التعقيم :

1. دورة التسخين : ليس لها زمن معين وإنما تستمر حتى تصل الحرارة لـ 121 C .
2. دورة الثبات holding stage : تبدأ عندما تصبح الحرارة 121 وتستمر لـ 15 د بنفس الدرجة ثم نفصل منبع الحرارة بعد انتهاء المدة .
3. دورة التبريد : ليس لها زمن معين بل تستمر حتى يبرد الجهاز لدرجة حرارة الغرفة .

يتم تعقيم المحاليل المائية – أكياس السيرومات – فيالات – الأمبولات - أدوات زجاجية وأي شكل صيدلاني يتحمل حرارة بالحرارة الرطبة .

تقييم عملية التعقيم :

- ✓ لضمان أن عملية التعقيم ناجحة يجب إجراء validation للجهاز المستخدم بهدف التأكد من أن البخار قد وصل لكل زوايا الجهاز لمدة 15 د وبحرار 121 والتأكد من أن ساعة الجهاز تعمل بالشكل الصحيح .
- ✓ لتقييم عملية التعقيم يوجد 3 مشعرات :
  1. **مشعرات فيزيائية** : مجسات تقيس درجات الحرارة في أماكن متفرقة داخل الحجرة .
  2. **مشعرات كيميائية** : أنابيب تحوي سائل يتغير لونه بدرجة الحرارة 121 من أصفر لأحمر أو شمع يذوب بحرارة 121 أو حبيبات ملونة توضع بأنابيب شعرية .
- توضع المشعرات الكيميائية في كل زوايا حجرة التعقيم لضمان أن كل الزوايا قد تعرضت لحرارة 121 .
3. **مشعرات بيولوجية :** تعتبر من أهم المشعرات وأفضلها , وهي بذيرات جراثيم مقاومة لعملية التعقيم بالحرارة الرطبة مثل bacillus sterothermophilus توضع البذيرات بنفس الأدوات المراد تعقيمها (فيال – أنبوب) وبعد انتهاء دورة التعقيم نقوم بالزرع ونلاحظ النتائج :

i. إذا نمت البذيرات ← عملية التعقيم فاشلة .

ii. إذا لم تنمو البذيرات ← عملية التعقيم ناجحة .

- سلبيات المشعرات البيولوجية :

a) تحتاج لأيدي خبيرة .

b) البذيرات تحتاج إلى فترة حضن طويلة لنحصل على نتائج دقيقة .

c) قد لاتنمو البذيرات بسبب الوسط الزرعي أو شروط الحضن مما يعطي إيجابية كاذبة .

ملاحظات :

- ❖ التعقيم بالحرارة الرطبة يعطل الجرثومة ويثبطها ويخربها أما التعقيم بالحرارة الجافة يقضي نهائيا عليها .
- ❖ لاتوجد طريقة تعقيم تناسب جميع الأشكال الصيدلانية لذلك نختار الطريقة المناسبة للشكل بحيث لاتؤثر على المادة الفعالة أو السواغات .

التعقيم بالحرارة الجافة

- ✓ مبدأ التعقيم : الأكسدة التي تخرب الجراثيم .
- ✓ عامل التعقيم : الهواء الساخن .
- ✓ مصدر الحرارة : وشيعة معدنية في ظهر الجهاز .
- ✓ درجة الحرارة تختلف باختلاف طبيعة المواد المعقمة بالحرارة الجافة وكلما ارتفعت درجة الحرارة قلت المدة اللازمة للتعقيم كالتالي :

درجة الحرارة	المدة الزمنية
170	ساعة
160	ساعتين
150	ساعتين ونصف
140	3 ساعات

- ✓ ميزتها القضاء على البيروجينات بسبب زيادة زمن التعرض .
- ✓ نستخدمها لتعقيم المواد التي تتحمل حرارة ولاتتحمل رطوبة (حيث يكون التعقيم بالحرارة الرطبة هو الخيار الأول) كأدوات أطباء الأسنان والأدوات المصنوعة من الستانلس ستيل الخاصة بالمعامل والأدوات الزجاجية المصنوعة من البيركس الأصلي , قطن , شاش , أعواد خشبية , الاشكال الصيدلانية ذات القوام الزيتي فقط .

لابد من إجراء عملية تقييم لأي طريقة تعقيم يتم استخدامها

الجلسة التاسعة : التعقيم بالترشيح والغازات

1. تعقيم السوائل بالترشيح :

لتعقيم السوائل بطريقة الترشيح نحتاج لأغشية بمواصفات محددة تكون مصنوعة من العديد من المتماثرات أهمها (استرات السيللوز MCE و فلور بولي فينيليدين PVF وبولي تترافلورو إيثيلين PTFE) وأن يكون قطر مسام المرشحة بأبعاد 0.22 - 0.2 ميكرون , إضافة إلى أن عمق غشاء الترشيح Depth of membrane وحشوته charge وتمعجات الأقنية tortuosity كلها عوامل تميز بين غشاء ترشيح وآخر .

ملاحظة : الأغشية بقطر 0.45 ميكرون تستخدم لعزل الجراثيم كبيرة الأبعاد والجزيئات الكبيرة وليس للتعقيم .

- كما نستخدم قيمة الاحتجاز (النقص) reduction value التي تعبّر عن نسبة الجراثيم التي يحتجزها الغشاء ضمن شروط محددة (فرق ضغط 30) إلى الجراثيم التي تمر عبره, للتمييز بين غشاء وآخر .
- تطبق عملية الترشيح دائما مع ضغط إيجابي الذي يقدم سرعة جريان أعلى ويتجنب حدوث التلوث الذي يمكن أن يسببه الضغط السلبي.
- لكل محلول نوع خاص من المراشح مناسب لترشيحه مثلاً :

المحاليل المائية	PVF \ MCE
الزيوت	PVF \ MCE
المذيبات العضوية	PVF \ PTFE
المحاليل المائية ذات PH قلوية	PVF
الغازات	PVF \ PTFE

Video (https://youtu.be/Q2MjtPbE07Y)

- كما ذكرنا في المحاضرات السابقة بأن كل طريقة تعقيم تحتاج لعملية تقييم Validation لأدوات المستخدمة في التعقيم , فلا بد من إجراء تقييم لأغشية الترشيح لضمان سلامة الغشاء ومعايرته ويتم ذلك وفق عدة طرق :

I. طريقة (HIMA (Health industry manufactures Association حيث تستعمل جراثيم البسودوموناس المزروعة على وسط مرق الغلوكوز في مصل فزيولوجي والتي تعطي

في هذا الوسط خلايا جرثومية أبعادها 0.3 ميكرون وهي مناسبة لعملية تقييم المراشح بأبعاد 0.22 , ولكي يكون الغشاء فعال يجب أن يحجز 10^7 خلية\سم^2 بوجود فرق ضغط 30 وتحسب فعالية الاحتجاز Retention efficiency بأخذ لوغاريتم قيمة النص .

بعض المراجع مثل الدستور البريطاني تفرض أن يحتجز 10^9 \سم^2 خلية جرثومية .

II. اختبار الفقاعة أو الانتشار the bubble point or diffusion : يستعمل قبل وبعد عملية التعقيم , وهو اختبار غير مخرب للغشاء ويستعمل بشكل روتيني للتأكد من سلامة غشاء الترشيح . https://youtu.be/RDjSCb4sC2c video

2. تعقيم الغازات بالترشيح :

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 غرف العمليات في المشافي وحجرات العناية المركزية في الحروق , مادة هذه المراشح تكون مؤلفة من نسيج مسطح من ألياف زجاجية دقيقة microfiber glass تتخلله دعائم عبارة عن ألواح متموجة من الورق المقوى أو الألمنيوم .

مراشح الهواء ذات الفعالية العالية HEPA (high efficiency particular air) تستطيع أن تزيل أكثر من 99.97% من الجزيئات التي أبعادها أكبر من 0.3 ميكرون , يدفع الهواء للعبور ضمن هذه المراشح بواسطة مروحة قبل المرشحة وفي الغالب يخضع الهواء لعمية ترشيح أولية لتخليصه من الجزيئات الكبيرة العالقة وذلك لإطالة عمر مرشحة HEPA .

تتم مراقبة فعالية الترشيح وسلامة مراشح الغازات منخلال فرق ضغط الهواء قبل وبعد المرشحة وكذلك اختبار دخان ديوكتيل فتلات (DOP) Dioctyl phathalate .