Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Quality Control of Non-Sterile Drug Product According to United States Pharmacopeia Instruction

Aiesheh Gholizadeh-Hashjin[1], Farzaneh Lotfipour[1], Somayeh Hallaj-Nezhadi[*1]

1. *Drug & Food Control Department, Pharmacy Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

10.30699/ijmm.13.5.321

ABSTRACT

Pharmaceutical products are classified into two groups according to the microbiological point of view: 1) sterile products and 2) non-sterile products. The sterilized term refers to the products that are free of any microorganisms. Their production is done under aseptic conditions, but the production of non-sterile products is not under aseptic conditions and therefore, they are not free of microorganisms; for this type of products legal authorities defined microbial limit ranges. The contamination of medicinal products by microorganisms can lead to adverse changes such as: change in physical attribute (appearance, color, smell, and viscosity), reduction of therapeutic effects, development of disease and ultimately the loss of consumer reliance. There have been reports about presence of unauthorized microorganisms in non-sterile medicinal products, which has led to more research and attention in this regard. In this paper, the methods for controlling the microbial quality of non-sterile drug products have been reviewed based on the latest version of United States Pharmacopoeia (USP), including <61>, <62>, and <1111> general chapters that can be used as a reliable source for researchers in the pharmacy industry and drug control labs.

Keywords: Quality control, Non-sterile drug products, United States Pharmacopoeia

Received: 2019/08/10; **Accepted**: 2019/11/14; **Published Online:** 08 Feb 2020;

Corresponding Information: **Somayeh Hallaj-Nezhadi**, Drug & Food Control Department, Pharmacy Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran **E-mail:** hallajnezhadis@tbzmed.ac.ir

Copyright © 2019, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Gholizadeh-Hashjin A, lotfipour F, Hallaj-Nezhadi S. Quality Control of Non-Sterile Drug Product According to United States Pharmacopeia Instruction. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (5) :321-345

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Pharmaceutical products are classified into two groups according to the microbiological point of view: 1) sterile products and 2) non-sterile products. The sterilized term refers to the products that are free of any microorganisms. Their production is done under aseptic conditions, but the production of non-sterile products is not under aseptic conditions **(1,2)** and therefore they are not free from microorganisms; for this type of products legal authorities defined microbial limit ranges.

The requirements for non-sterile products acceptance may vary slightly depending on the legal authorities of different countries or even different pharmaceutical companies. "Microbial limit Test" is a phrase used to evaluate the microbial content of non-sterile products and has four steps: sample preparation, preliminary testing, counting and identification, each step is described in the following.

A review study from 2004-2011 revealed that 75% of the non-sterile products recalls were from OTC (over the counter) and self-care products. Most of recalls are because of **(3)**:

- The presence of objectionable microorganisms (72%)
- Over load of microorganisms (15%)
- Errors in sterilizing equipment or diagnostic kit (7%)
- Failure of microbiological tests (5%)
- Manufacturing defects (1%)

Objectionable microorganism refers to a pathogenic opportunistic microorganism, with specific characteristics such as production of endotoxin, exotoxin, spore and so on. These microorganisms can grow under certain temperature and nutritional conditions and could affect the quality and safety of the product. Contamination at any stage of the process can represent a serious risk to the final product and must be controlled to maintain the quality and safety of the product **(4)**. Very few products, such as syrup and elixir, have a preservative nature. Other products contain preservatives to keep the safety of the product **(5)**.

Failure to comply the aseptic conditions with regard to sterile products, especially in the hospital, has led to the emergence of nosocomial infections such as *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter* in propofol - *Pseudomonas aeroginosa* and *Enterobacter* in dextrose vial (for multiple-dose purposes) which was unfortunately led to two deaths in each of these cases **(6,7)**. A review study in 2019 showed that extemporaneous medicine which was made in hospital and community pharmacies in some cases has led to the emergence of infection such as meningitis in people consuming these contaminated products **(8)**. A study by Hosseyni *et al.* in 2014 on the gastric juice production process of a pharmaceutical company in Iran indicated the presence of some unauthorized microorganisms during the manufacturing process **(9)**. Also, a study by Mohammadi *et al.* warned of the presence of unauthorized microbial agents in cosmetics **(10)**. In 2015, Ratajczak *et al.* investigated 1285 non-sterile products in Saudi Arabia and found that microbiological criteria were not approved in 1.87% of the non-sterile products. Also naturally products were more contaminated (5.7%) **(11)**. Table 1 lists the studies tested microbial limit in non-sterile products in Iran. There are low numbers of such studies in Iran and also the results indicated that most of the products had not met the requirements of the Pharmacopoeia. Therefore, there is a necessity for more attention to such studies domestically. Most contaminants of non-sterile raw materials and products include bacteria, mold and fungi **(3)**. This indicates that quality control of non-sterile pharmaceutical products requires high precision at all stages of the process that include: raw materials, during manufacturing, final product and after market entry. There are some differences between the FDA (US Food and Drug Administration) guidelines and the US Pharmacopoeia (USP) **(12)**. In this paper, microbial quality control methods for non-sterile products have been reviewed based on the latest USP revision, chapters <61>, <62> and <1111> **(13)** which can be used as a reliable source by researchers and practitioners in the pharmaceutical industry and laboratories.

Tests related to these chapters of the USP address how to quantify and identify mesophilic bacteria and fungi that may grow under aerobic conditions. The purpose of these tests is to investigate the properties of the drug's raw material and product in terms of microbial quality.

It is worth noting that the methods described in this section are not applicable to compounds that contain live microorganisms for therapeutic purpose. Also, the guidelines introduced in the USP deal only with target microorganisms and do not cover all the objectionable microorganisms represented by the FDA **(14)**. Appendices 16 in British Pharmacopoeia (BP) **(15)**, Chapters 2.6.12, 2.6.13 and 5.4.1 in European Pharmacopoeia (EP) **(16)** and Chapters 4.05 and 5.02 in Japanese Pharmacopoeia **(17)** have also described microbial limit test. Recent editions of these books have been more harmonized so the differences between these books are very minor in new editions **(18)**.

Overall, common detection methods involve bacterial culture and biochemical tests, a procedure that usually takes 5–6 days to be completed. Thus, fast and sensitive methods are required for bacterial detections in the field of pharmaceutical sciences. For example, in one study a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay was developed for simultaneous detection and identification of four indicator pathogenic bacteria in a single reaction **(19)**.

Microbiological Examination of Nonsterile Products: Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use

Acceptance criteria for non-sterile pharmaceutical products based on total aerobic microbial count (TAMC) and total yeast and mold count (TYMC) and tests for the absence of specified organisms (due to the route of administration) is shows in Table 2.

According to Table 2, the interpretation of the results will be as follows:
If the number of 10^1cfu, 10^2cfu, 10^3cfu is stated in the table, the highest acceptable level of microorganisms in the counting method is 20, 200, 2000 and so on.

This table is not necessarily comprehensive and in specific cases may include the presence of other microorganisms depending on the nature of the raw material and the production process.

Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests

General considerations

All tests should be carried out under sterile conditions to prevent the entry of other microorganisms during

Table 1. Studies on microbial limit test in non-sterile drug products in Iran – (Institute of Standards and Industrial Research of Iran: ISIIR)

Title	Samples	Observations	Results	Experiments guidance	Year	Reference
Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran	8 cosmetic creams both used and unused, were tested	High percentage of samples contaminated by Gram-positive bacilli, *S.aureus* and Gram-negative bacteria (except *E. coli*)	the quality of the samples did not generally meet the standards for microbial limits	FDA, USP & BP	2000	٢٠)
Microbial quality of some herbal solid dosage forms	20 samples include tablets, powders and capsules	TAMC>1100 cfu/mL in all samples Contamination of all samples with *Salmonella* Absence of other microorganism	the quality of the samples did not generally meet the standards for microbial limits	USP	2010	٢١)
Microbial quality survey of sunscreen products in Iranian market	90 random samples of indoor, imported and prepared sunscreen at the pharmacy; at time 0, 3 and 6 months after opening	Contamination of Iranian, imported and pharmacy prepared samples with at least one of the unauthorized microorganisms at all times of sampling	the quality of the samples did not generally meet the standards for microbial limits	USP, ISIIR	2013	(٢٢)
Characterization of Iranian bentonites to be used as pharmaceutical materials	10 samples of bentonite extracted from different regions of Iran	Absence of pathogenic bacteria	the quality of the samples generally meets the standards for microbial limits	USP, EP	2015	(٢٣)
(1)	7 sunscreen creams (5 foreign creams from informal market and 2 creams as control from Iranian products)	Total microbial count is more than authorized level Contamination with *Enterobacter* in all samples and *S. aureus* in one of 7 samples	the quality of the samples did not generally meet the standards for microbial limits	USP	2015	(٢٤)
Microbial Content in some Foundation Creams in Iran's Market	7 creams (6 creams from informal market and 1 cream as control from Iranian market)	83.3% of samples and control sample were contaminated. Unauthorized fungal contam-ination was observed in 42.8% of samples. All samples were contaminated with pathogenic microorganisms (especially *S. aureus*).	the quality of the samples did not generally meet the standards for microbial limits	USP	2015	(٢٥)

testing. If the medicinal product contains antimicrobial activity, the effect of the antimicrobial agent should be eliminated or neutralized (Table 3); if the neutralizing agents are used for this purpose their effect on non-toxicity to the microorganisms must be ensured (to avoid false negative results). If surfactants are used in

Table 2. Acceptance Criteria for Microbiological Quality of Nonsterile Dosage Forms and Substances for Pharmaceutical Use

Route of Administration	TAMC (cfu (colony forming unit)/mL or cfu/g)	TYMC (cfu/mL or cfu/g)	Specified Microorganism(s)
Nonaqueous preparations for oral use	10^3	10^2	Absence of *E. coli* (1 g or 1 mL)
Aqueous preparations for oral use	10^2	10^1	Absence of *E. coli* (1 g or 1 mL)
Rectal use	10^3	10^2	……
Oromucosal use	10^2	10^1	Absence of *S.aureus* (1 g or 1 mL)
			Absence of *P.aeruginosa* (1 g or1 mL)
Gingival use	10^2	10^1	Absence of *S. aureus* (1 g or 1 mL)
			Absence of *P. aeruginosa* (1 g or 1 mL)
Cutaneous use	10^2	10^1	Absence of *S. aureus* (1 g or 1 mL)
			Absence of *P. aeruginosa* (1 g or 1 mL)
Nasal use	10^2	10^1	Absence of *S. aureus* (1 g or 1 mL)
			Absence of *P. aeruginosa* (1 g or 1 mL)
Auricular use	10^2	10^1	Absence of *S. aureus* (1 g or 1 mL)
			Absence of *P. aeruginosa* (1 g or 1 mL)
Vaginal use	10^2	10^1	Absence of *P. aeruginosa* (1 g or 1 mL)
			Absence of *S. aureus* (1 g or 1 mL)
			Absence of *Candida albicans* (1 g or 1 mL)
Transdermal patches (limits for one patch including adhesive layer and backing)	10^2	10^1	Absence of *S. aureus* (1 patch)
			Absence of *P. aeruginosa* (1 patch)
Inhalation use (special requirements apply to liquid preparations for nebulization)	10^2	10^1	Absence of *S. aureus* (1 g or 1 mL)
			Absence of *P. aeruginosa* (1 g or 1 mL)
			Absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria (1 g or 1 mL)
Substances for pharmaceutical use	10^3	10^2	……

the preparation of the sample, its non-toxicity to the microorganisms and its compatibility with the neutralizing agent should be determined.

First Step: Sample Preparation

The sample preparation depends on the physical properties of the drug product. For each sample, 10 g or 10 cc of the product is tested (unless otherwise specified in the relevant monograph). For liquid and solid aerosols and transdermal patches 10 aerosol containers or 10 patches should be tested. The dilution of the samples should be such that the possible errors are minimized and the errors are predictable, so the method should be validated (26).

In some specific cases the amount to be tested may be reduced.

Second step: Preliminary Test, Bacterial Inoculation and Dilution

The purpose of preliminary test is to find out if the preservation of samples has been removed in first step or not. Thus, sufficient amounts of bacterial suspension were added to the sample and control

(without sample material) to produce less than 100 cfu bacterium.

If the antimicrobial effect of preservative persists, re-addition of bacterial suspensions should be performed after neutralization, dilution, or repeated filtration.

Filtration

The size of membrane filters should be less than 0.45 µm. For the determination of TAMC, the filter membrane is transferred to the surface of Soybean–Casein Digest Agar and for the determination of TYMC the membrane is transferred to the Sabouraud Dextrose Agar surface. The plate is incubated according to the conditions in Table 4 and then counted.

Third step: counting

There are several methods for counting, including:

1. Colony counting methods on plates
2. Filtration
3. And MPN (most probable number) methods (Figure 1).

The MPN method is less accurate than other methods, although it may be the most appropriate method for specific product with low microbial loads.

Table 3. Common neutralizing agents/methods for interfering substances

Potential Neutralizing Agents/Method	Interfering Substance
Sodium hydrogen sulfite (Sodium bisulfite)	Glutaraldehyde, mercurials
Dilution	Phenolics, alcohol, aldehydes, sorbate
Glycine	Aldehydes
Lecithin	Quaternary ammonium compounds (QACs), parahydroxybenzoates (parabens), bisbiguanides
Polysorbate	QACs, iodine, parabens
Thioglycollate	Mercurials
Thiosulfate	Mercurials, halogens, aldehydes
Mg or Ca ions	EDTA

Table 4. Preparation and Use of Test Microorganisms

		Growth Promotion		Suitability of Counting Method in the Presence of Product	
Microorganism	**Preparation of Test Strain**	**TAMC**	**TYMC**	**TAMC**	**TYMC**
Staphylococcus aures such as ATCC 6538	Soybean–Casein Digest Agar or Soybean–Casein Digest Broth 30-35°C 18–24 hours	Soybean–Casein Digest Agar and Soybean–Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 3 days		Soybean–Casein Digest Agar/MPN Soybean–Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 3 days	
Pseudomonas aeruginosa such as ATCC 9027	Soybean–Casein Digest Agar or Soybean–Casein Digest Broth 30-35°C 18–24 hours	Soybean–Casein Digest Agar and Soybean–Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 3 days		Soybean–Casein Digest Agar/MPN Soybean–Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 3 days	
Bacillus subtilis such as ATCC 6633	Soybean–Casein Digest Agar or Soybean–Casein Digest Broth 30-35°C 18–24 hours	Soybean–Casein Digest Agar and Soybean–Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 3 days		Soybean–Casein Digest Agar/MPN Soybean–Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 3 days	
Candida Albicans such as ATCC 10231	Sabouraud Dextrose Agar or Sabouraud Dextrose Broth 20-25°C 2-3 days	Soybean–Casein Digest Agar ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 5	Sabouraud Dextrose Agar ≤100 cfu 20-25°C ≤ 5 days	Soybean–Casein Digest Agar ≤100 cfu 30-35°C ≤ 5 days MPN: not applicable	Sabouraud Dextrose Agar ≤100 cfu 20-25°C ≤ 5 days
Aspergillus brasiliensis such as ATCC 16404	Sabouraud Dextrose Agar or Potato–Dextrose Agar 20-25°C 5-7 days, or until good sporulation is achieved	Soybean–Casein Digest Agar ≤ 100 cfu 30-35°C ≤ 5	Sabouraud Dextrose Agar ≤100 cfu 20-25°C ≤ 5 days	Soybean–Casein Digest Agar ≤100 cfu 30-35°C ≤ 5 days MPN: not applicable	Sabouraud Dextrose Agar ≤100 cfu 20-25°C ≤ 5 days

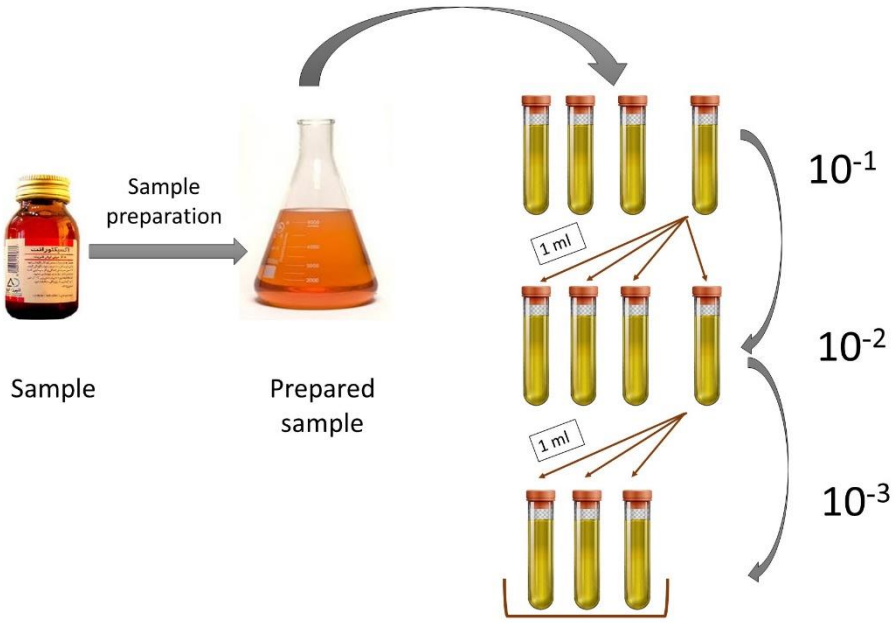


Figure 1. Scheme of MPN method

Table 5. Aerobic microorganisms in identification test (NCTC :National Collection of Type Cultures)

NCTC	Aerobic microorganisms
Such as ATCC 6538	*Staphylococcus aureus*
Such as ATCC 9027	*Pseudomonas aeruginosa*
Such as ATCC 8739	*Escherichia coli*
Such as ATCC 14028	*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium or,
Such as NCTC 6017	as an alternative, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony
Such as ATCC 10231	*Candida albicans*

Table 6. Interpretation of Results

	Results for Each Quantity of Product		
Probable Number of Bacteria per g or mL of Product	0.001 g or 0.001 mL	0.01 g or 0.01 mL	0.1 g or0.1 mL
more than 10^3	+	+	+
less than 10^3 and more than 10^2	-	+	+
less than 10^2 and more than 10	-	-	+
less than 10	-	-	-

Generally, common detection methods involve bacterial culture as well as biochemical tests **(27)**, Table 5 describes aerobic microorganisms in identification tests. For instance, Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) as an important human pathogen is responsible for infection in hospitals as well as the community **(28)**.

Identification test for *Escherichia coli*

Dilute the sample 10 times that equal to 1 g or 1 cc of the product, then transfer it to the soy bean casein digest broth and mix, incubate for 18-24 hours at 35-30°C.

Subculture: After incubation, 1 mL of the soy bean casein digest broth was transferred to 100 mL of MacConkey broth (incubation at 42-44°C, 24-48 h); finally the sample was transferred from MacConkey

Table 7. Growth promoting, inhibitory, and indicative properties of media

Test Strains	Property	Test/Medium
Test for **bile tolerant Gram negative bacteria**		
E. coli	Growth promoting	Enterobacteria Enrichment Broth Mossel
P. aeruginosa		
S. aureus	Inhibitory	
E. coli	Growth promoting+ Indicative	Violet Red Bile Glucose Agar
P. aeruginosa		
Test for ***Escherichia coli***		
E. coli	Growth promoting	MacConkey Broth
S. aureus	Inhibitory	
E. coli	Growth promoting+ Indicative	MacConkey Agar
Test for *salmonella*		
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium or	Growth promoting	Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abony		
S. aureus	Inhibitory	
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium or	Growth promoting+ Indicative	Xylose Lysine Deoxycholate Agar
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abony		
Test for Pseudomonas aeruginosa		
P. aeruginosa	Growth promoting	Cetrimide Agar
E. coli	Inhibitory	
Test for ***Staphylococcus aureus***		
S. aureus	Growth promoting+ Indicative	Mannitol Salt Agar
E. coli	Inhibitory	
Test* for *Clostridia		
Cl. sporogenes	Growth promoting	Reinforced Medium for Clostridia
Cl. sporogenes	Growth promoting	Columbia Agar
Test for ***Candida albicans***		
C. albicans	Growth promoting	Sabouraud Dextrose Broth
C. albicans	Growth promoting+ Indicative	Sabouraud Dextrose Agar

broth to the MacConkey agar medium (incubation 18–72 h, 30–35°C).

The product is acceptable when no colony growth is observed and the identification test is negative.

Identification Test for *Salmonella*

Prepare the sample which is equal to 10 g or 10 cc of the product. After transferring the sample to the soy bean casein digest broth medium and mixing, incubation perform for 24 to 18 hours at 30-35°C.

0.1 mL of soy bean casein broth was transferred to 10 mL of Rappoport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth medium and incubated for 18-24 h at 30-35°C. Then transfer to Xylose lysine Deoxycholate Agar medium and incubate at 30-35°C for 18-72 hours.

The presence of Salmonella is characterized by the growth of red colonies with or without black centers, which is confirmed by complementary identification tests. The product is acceptable when no colony growth is observed and the complementary identification tests is negative.

Identification Test for *Pseudomonas aeruginosa*

Dilute the sample 10 times that at least equal to 1 g of the product. Use 10 cc or any other amounts which is equal to 1 g or 1 cc of the product and mix with appropriate volume of soy bean casein digest broth medium.

When the transdermal patch is tested, a volume of the sample is filtered through a sterile membrane filter to make it equivalent to one transdermal patch and then transferred to 100 mL of soy bean casein digest broth medium and Incubate for 24-28 hours at 30-35°C.

Subculture: transferred to the Citrimide Agar media and incubated for 18-72 hours at 30-35°C.

Colony growth indicates the possibility of *Pseudomonas aeruginosa* presence and is confirmed by complementary identification tests. The product is acceptable when no colony growth is observed and the complementary identification tests is negative.

Identification test for *Staphylococcus aureus*

As same as identification test for *Pseudomonas aeruginosa* but the *Staphylococcus aureus* is sub cultured in mannitol salt agar medium.

The growth of yellow or white colonies surrounded by yellow halo indicates the possibility of *S. aureus* presence and is confirmed by complementary identification tests. The product is acceptable when no colony growth is observed and the complementary identification tests is negative.

Identification test for Clostridia

The sample was diluted for 10 times (at least up to 20 cc) which at least equaled to 2 g or 2 cc of the product, it was then divided into two part. One of these parts was heated to 80°C for 10 minutes and cooled rapidly while the other part should not heated.

Subculture: 10 cc or the amount which was equals to 1 g or 1 cc of the product (for each of the two parts) was mixed with suitable amount of refined Clostridia culture medium and is incubated under anaerobic conditions at 35-35°C for 48-72 hours. After incubation for each of two samples, subculture were done in Columbia Agar medium and then incubated under anaerobic conditions at 30-35°C for 48-72 hours.

Anaerobic growth of rod bacteria (with or without endospores) and negative catalase test, indicated the presence of Clostridia, and were confirmed by complementary identification tests. The product was acceptable when no colony growth was observed and the complementary identification tests were negative.

Identification Test for *Candida albicans*

10 cc or any other amounts which was equal to 1 g or 1 cc or more of the product was mixed with appropriate volume of sabouraud dextrose broth and incubated for 3-5 days at 30-35°C.

Subculture: subculture was done on sabouraud dextrose agar medium and incubated for 4-4 hours at 35-30°C.

The growth of white colonies can indicate the presence of *Candida albicans* and is confirmed by complementary identification tests. The product is acceptable when no colony growth is observed and the complementary identification tests is negative

Table 7 describes the growth promoting, inhibitory, and indicative properties of media.

Conclusion

Non-sterile products should be within the permissible range of microbial content in order to maintain the safety, efficacy and quality of the product. Objectionable microorganisms can be counted and identified using methods described in detail in chapters <61> and <62> of USP in relation to sample preparation, counting and identification. However, the pharmaceutical industry must also pay attention to such microorganisms that are not listed on the USP, but could contaminate the product depending on their production conditions. Products with low aqueous activity may be resistant to bacterial growth, but contaminating microorganisms may survive and have the potential risk to contaminate the product. Adhering to the principles of cGMP leads to preventing contamination during production which causes the producing of the products that have high quality and stability, and as a result greater satisfaction and confidence from consumers will be achieved. Due to the fact that there are very few studies on the evaluation of non-sterile products in terms of microbial content in Iran, there is a greater need for such studies domestically.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۵ ـ آذر و دی ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقاله مروری

کنترل کیفیت میکروبی فرآورده‌های دارویی غیر استریل بر اساس دستورالعمل فارماکوپهٔ ایالات متحده

عایشه قلی‌زاده هشجین[۱]، فرزانه لطفی‌پور[۱]، سمیه حلاج نژادی[۱*]

۱- گروه کنترل دارو و غذا ، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۲

پذیرش:۱۳۹۸/۱۰/۱۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

موضوع:

میکروب‌شناسی پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

سمیه حلاج نژادی، گروه کنترل دارو و غذا ، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

ایمیل:

hallajnezhadis@tbzmed.ac.ir

چکیده

فرآورده‌های دارویی از لحاظ وجود میکروارگانیسم، به دو گروه دسته بندی میگردند: ۱) فرآورده‌های استریل و ۲) فرآورده‌های غیراستریل. اصطلاح استریل به فرآورده‌هایی اطلاق می‌شود که عاری از هرگونه میکروارگانیسم بوده و تولید آنها تحت شرایط آسپتیک صورت گیرد، اما تولید فرآورده‌های غیر استریل تحت شرایط آسپتیک نیست؛ بنابرین این فرآورده‌ها عاری از میکروارگانیسم نیستند؛ برای این دسته از فرآورده‌ها توسط نهادهای قانونی محدودهٔ مجاز میکروبی تعریف شده است. آلودگی محصولات دارویی توسط میکروارگانیسم‌ها می‌تواند سبب تغییرات نامطلوب فیزیکی در فرم دارویی (تغییر در ظاهر، رنگ، بو، گرانروی)، کاهش اثرات درمانی، ایجاد بیماری و در نهایت سلب اعتماد مصرف کنندگان شود. وجود گزارش هایی مبنی بر حضور میکروارگانیسم‌های غیرمجاز در فرآورده‌های دارویی غیر استریل، منجر به توجهات و تحقیقات بیشتری در این زمینه گردیده است. در این مقاله روش‌های کنترل کیفیت میکروبی فرآورده‌های دارویی غیر استریل براساس آخرین ویرایش فارماکوپهٔ ایالات متحده (USP)، فصول <۶۱>، <۶۲> و <۱۱۱۱> مورد بررسی قرار گرفته است که می‌تواند به عنوان منبع موثقی برای محققان و شاغلان در صنعت داروسازی و آزمایشگاه های کنترل دارو، مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: کنترل کیفیت، فرآورده‌های دارویی غیر استریل، فارماکوپهٔ ایالات متحده

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

فرآورده‌های دارویی از دیدگاه میکروبی به دو گروه دسته بندی می‌گردند: ۱) فرآورده‌های استریل و ۲) فرآورده‌های غیراستریل. اصطلاح استریل به فرآورده‌هایی اطلاق می‌شود که عاری از هرگونه میکروارگانیسم بوده و تولید آنها تحت شرایط آسپتیک صورت گیرد، تست صورت گرفته به‌منظور ارزیابی میکروبی این فرآورده‌ها تست استریلیتی نام دارد (۱، ۲).

ولیکن تولید فرآورده‌های غیر استریل تحت شرایط آسپتیک نبوده و بنابرین این فرآورده‌ها عاری از میکروارگانیسم نیستند؛ برای این دسته از فرآورده‌ها توسط نهادهای قانونی محدودهٔ مجاز میکروبی تعریف شده است. این قوانین ممکن است با توجه به نهادهای قانونی کشورهای مختلف و یا حتی کارخانجات دارویی مختلف تفاوت‌هایی جزئی داشته باشند. "تست محدودیت میکروبی" عبارتی است که به ارزیابی محتوای میکروبی فرآورده‌های غیر استریل اطلاق می‌شود و دارای چهار مرحلهٔ: آماده‌سازی نمونه، تست مقدماتی، شمارش باکتری‌ها و شناسایی آنها است که در ادامه هرکدام از مراحل به تفصیل شرح داده خواهند شد.

مطالعه‌ای مروری در سال‌های ۲۰۰۴-۲۰۱۱ نشان داد که ۷۵٪ جمع‌آوری فرآورده‌های دارویی غیر استریل مربوط به محصولات OTC (over the counter) و بهداشتی بوده است. اغلب جمع‌آوری‌ها به علل ذیل صورت گرفته‌اند (۳):

- وجود میکروارگانیسم خطرناک (۷۲٪)
- آلودگی بیش از حد مجاز (۱۵٪)
- خطا در استریلیزاسیون تجهیزات و یا خطاهای کیت‌های تشخیصی (۷٪)
- خطا در تست‌های میکروبیولوژیکی (۵٪)
- ایرادات پروسهٔ ساخت (۱٪)

منظور از میکروارگانیسم خطرناک میکروارگانیسم بیماری‌زا، میکروارگانیسم فرصت‌طلب با ویژگی‌هایی خاص نظیر تولید

اندوتوکسین، اگزوتوکسین، اسپور و... است. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند تحت شرایط دمایی و تغذیه ای خاصی رشد کرده و بر کیفیت و ایمنی فرآورده تاثیر گزارند. آلودگی در هر مرحله از تولید می‌تواند بیانگر خطر جدی در پروسه باشد و برای حفظ کیفیت و ایمنی محصول می‌بایست آلودگی کنترل شود (۴). تعداد بسیار کمی از محصولات از جمله برخی از شربت‌ها و الگزیرها خاصیت پرزرواتیوی دارند. سایر محصولات، به‌منظور بهبود ایمنی فرآورده حاوی پرزرواتیو هستند (۵). عدم رعایت شرایط آسپتیک، در رابطه با محصولات استریل خصوصا در بیمارستان منجر به ظهور عفونت‌های بیمارستانی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروباکتر* در پروپوفل – *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* در ویال دکستروز (به‌منظور مصارف متعدد) شده است که متاسفانه در هرکدام از این موارد دو مورد مرگ در افراد گزارش شده است (۶, ۷). مطالعه‌ای مروری در سال ۲۰۱۹ نشان داد داروهای تهیه شده (extemporaneous medicine) در داروخانه‌های بیمارستان و شهری در چندین مورد به سبب آلودگی‌های میکروبی منجر به ظهور بیماری‌هایی نظیر مننژیت در افراد مصرف کنندهٔ این گونه فرآورده‌ها گردیده‌اند (۸). مطالعهٔ صورت گرفته توسط Hosseyni و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی مراحل تولید شربت معدهٔ یک شرکت دارویی در ایران حاکی از حضور برخی از میکروارگانیسم‌های غیر مجاز در طی روند ساخت بود (۹) همچنین مطالعهٔ انجام شده توسط Mohammadi و همکاران در مورد حضور عوامل میکروبی غیر مجاز در فرآورده‌های آرایشی بهداشتی هشدار داد (۱۰). در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای در کشور عربستان توسط Ratajczak و همکاران به بررسی ۱۲۸۵ محصول غیر استریل پرداخت و نشان داد در ۱/۸۷٪ فرآورده‌های غیر استریل، ضوابط میکروبیولوژیکی مورد تایید نیست و این مورد در رابطه با داروهایی که منشا طبیعی دارند بیشتر مشهود بود (۵/۷٪) (۱۱). جدول شمارهٔ ۱ به مطالعاتی که تا کنون به تست محدودیت میکروبی در فرآورده‌های غیراستریل در ایران پرداخته است، اشاره می‌کند. با توجه به این امر که تعداد چنین مطالعاتی بسیار اندک است و نتایج حاکی از آن است که غالب محصولات ضوابط فارماکوپه را برآورد نکرده‌اند، نیاز بیشتری به چنین مطالعاتی در داخل کشور احساس می‌شود. غالب آلودگی‌های محصولات و مواد اولیهٔ غیراستریل شامل باکتری، کپک و قارچ هستند (۳). این امر نشان میدهد که کنترل کیفیت فرآورده‌های دارویی غیر استریل در تمام سطوح مراحل: مواد اولیه، حین تولید، محصول نهایی و پس از ورود به بازار نیازمند دقت بالایی است. لازم به ذکر است که در خصوص عدم وجود برخی میکروارگانیسم‌ها، تفاوت هایی ما بین گایدلاین های مربوط به FDA (سازمان غذا و داروی آمریکا) و فارماکوپهٔ ایالات متحده (USP) به چشم می‌خورد (۱۲). در این مقاله روش‌های کنترل کیفیت میکروبی فرآورده‌های دارویی غیر استریل براساس آخرین ویرایش USP، فصول <۶۱>، <۶۲> و <۱۱۱۱> بررسی شده است (۱۳) که می‌تواند به عنوان منبعی موثق توسط محققان و شاغلان در صنعت داروسازی و آزمایشگاه‌های کنترل دارو، مورد استفاده قرار گیرد. تست‌های مربوط به این فصول از USP، به نحوهٔ شمارش کمی و شناسایی باکتری‌های مزوفیلیک و قارچ‌هایی که ممکن است تحت شرایط هوازی رشد کنند می‌پردازد. هدف از طراحی این تست‌ها بررسی ویژگی‌های مادهٔ اولیهٔ دارو و محصول دارویی از لحاظ کیفیت میکروبی است. شایان ذکر است که روش‌های معرفی شده در این بخش برای ترکیباتی که خود حاوی میکروارگانیسم زنده به‌منظور کاربردهای درمانی هستند قابل استفاده نیست. همچنین دستورالعمل‌های معرفی شده در USP صرفا به میکروارگانیسم‌های شاخص پرداخته‌اند و تمام میکروارگانیسم‌های خطرناک از دیدگاه FDA را پوشش نمی‌دهند (۱۴). فارماکوپهٔ انگلستان (BP) در ضمیمهٔ شمارهٔ ۱۶ (۱۵)، فارماکوپهٔ اتحادیهٔ اروپا (EP) در فصول 2.6.12 ، 2.6.13 و 5.4.1 (۱۶) و فارماکوپهٔ ژاپن در فصول 4.05 و 5.02 (۱۷) به تست محدودیت میکروبی پرداخته‌اند که در چاپ‌های اخیر این کتب مرجع تلاش بر یکسان‌سازی قوانین مربوط در این حیطه بوده است، لذا تفاوت‌های این کتب در ویرایش‌های جدید بسیار جزئی هستند (۱۸).

در کل روش های تشخیص رایج شامل آزمایشات بیوشیمیایی به همراه کشت باکتریها است که به طور معمول ۵-۶ روز طول می کشد که از معایب این روشها محسوب می شود. بنابراین، تکنیک های سریع و حساس برای تشخیص عوامل بیماری زا در صنعت داروسازی دارای اهمیت زیادی است. به عنوان مثال، در یک مطالعه با استفاده از روشهای نوین (روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه ((multiplex polymerase chain reaction)) تشخیص و شناسایی همزمان چهار باکتری بیماری زایی که در تست محدودیت میکروبی فارماکوپه آمریکا ذکر شده است، انجام شده است (۱۹).

بررسی فصل <۱۱۱۱> USP

ارزیابی میکروبیولوژیک محصولات غیر استریل

ضوابط پذیرش برای محصولات دارویی و مواد مورد استفاده در صنعت داروسازی

حضور میکروارگانسیم‌های بخصوصی در فرآورده‌های غیر استریل می‌توانند منجر به کاهش یا حذف اثر دارو شوند و یا عوارض

جانبی مضری در فرد مصرف‌کننده ایجاد کنند. کارخانجات داروسازی می‌بایست با انجام قوانین cGMP (Current good manufacturing practice) طی مراحل تولید، نگه‌داری و توزیع از وجود حداقل بار میکروبی در فرم نهایی اشکال دارویی اطمینان حاصل کنند.

معیارهای پذیرش فرآورده‌های غیر استریل دارویی بر اساس تعداد تام میکروب‌های هوازی (TAMC: total aerobic microbial count) تعداد تام قارچ‌ها و مخمرها (TYMC: total yeast and mold count) و تست‌هایی برای عدم حضور ارگانیسم‌های مشخص شده (با توجه به راه تجویز) است (جدول ۲). همچنین معیارهای پذیرش براساس نتایج منحصر به فرد و یا اگر تکرار صورت گرفته باشد؛ بر اساس میانگین تعداد تکرارها است (مانند روش شمارش مستقیم در پلیت).

جدول ۱. مطالعات مربوط به تست محدودیت میکروبی در فرآورده‌های غیر استریل در ایران

	نمونهٔ مورد هدف مطالعه	مشاهدات	منبع روش آنالیزی	نتیجه گیری	سال مطالعه	منبع
ارزیابی آلودگی باکتریایی کرم‌های آرایشی	۸ نمونه، کرم‌های دست و صورت و مرطوب کنندهٔ خریداری‌شده و کرم‌های استفاده شده توسط افراد سالم	آلودگی درصد بالایی از نمونه‌ها توسط باسیل‌های گرم مثبت، *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های گرم منفی (به غیر از *E. coli*)	FDA, USP و BP	عدم انطباق کیفیت محصولات با ضوابط مربوطه	۱۳۷۸	(۲۰)
بررسی کنترل کیفیت میکروبی برخی از اشکال دارویی گیاهی موجود	۲۰ نمونهٔ قرص، پودر و کپسول	TAMC>1100 cfu/mL در تمامی نمونه‌ها - آلودگی تمامی نمونه‌ها با *سالمونلا* عدم حضور سایر میکروارگانیسم‌ها	USP	عدم انطباق کیفیت محصولات با ضوابط USP	۱۳۸۸	(۲۱)
بررسی کنترل کیفیت میکروبی ضدآفتاب‌های موجود	۹۰ نمونهٔ تصادفی از ضدآفتاب‌های داخلی، وارداتی و تهیه‌شده در داروخانه؛ در زمان صفر، ۳ و ۶ ماه پس از باز شدن درب	آلودگی نمونه‌های ایرانی، وارداتی و تهیه شده در داروخانه با حداقل با یکی از میکروارگانیسم‌های غیر مجاز در تمام زمان‌هایی که نمونه‌گیری صورت گرفته است	سازمان استاندارد ایران	عدم انطباق کیفیت محصولات با ضوابط سازمان استاندارد	۱۳۹۱	۲۲)
ارزیابی ویژگی های بنتونیت های ایرانی مورد استفاده در صنایع دارویی	۱۰ نمونهٔ بنتونیت استخراج شده از مناطق مختلف ایران	عدم حضور باکتری‌های پاتوژن و برآورد کردن الزامات فارماکوپه برای مادهٔ اولیه	USP, EP	انطباق کیفیت محصولات با ضوابط مربوطه	۱۳۹۳	(۲۳)
ارزیابی محتوای میکروبی در برخی کرم‌های ضدآفتاب‌های موجود	۷ نمونهٔ ضدآفتاب (۵ نمونهٔ غیر رسمی و ۲ فرآوردهٔ رسمی)	میزان باکتری تام و میزان قارچ بیش از حد مجاز اعلام گردید آلودگی با انتروباکتر در تمامی نمونه‌ها و آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* در یکی از ۷ نمونه مشاهده گردید	USP	عدم انطباق کیفیت محصولات با ضوابط مربوطه	۱۳۹۳	(۲۴)
بررسی محتوای میکروبی برخی از کرم پودر های موجود	۷ نمونه (۶ نمونهٔ غیر رسمی و ۱ نمونهٔ رسمی)	۸۳/۳٪ درصد از نمونه‌ها و نمونه شاهد دارای آلودگی خارج از محدوده بودند. آلودگی غیر قابل قبول قارچی در ۴۲/۸٪ نمونه‌ها مشاهده گردید. تمامی نمونه‌ها آلوده به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (علی الخصوص *استافیلوکوکوس اورئوس*) بوده‌اند.	USP	عدم انطباق کیفیت محصولات با ضوابط مربوطه	۱۳۹۳	(۲۵)

جدول ۲. ضوابط پذیرش کیفیت میکروبی اشکال دارویی غیر استریل و مواد اولیهٔ دارویی

راه تجویز	TAMC (cfu (colony forming unit)/mLor cfu/g)	TYMC (cfu/mL or cfu/g)	میکروارگانیسم‌های خاص
محصولات غیرمائی برای مصرف خوراکی	۱۰۳	۱۰۲	عدم حضور *E. coli* (1g or 1mL)
محصولات مائی برای مصرف خوراکی	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *E. coli* (1g or 1mL)
مصرف رکتالی	۱۰۳	۱۰۲	----------
مصارف مخاطی	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
مصرف دندانی و لثه	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
مصرف پوستی	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
مصرف بینی	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
مصرف گوشی	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
مصرف واژینال	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
			عدم حضور *C. albicans* (1g or 1mL)
پچ‌های ترانس درمال، محدوده ها برای یک پچ (لایه چسبنده و پشت آن) است	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
مصرف استنشاقی (الزامات خاصی برای فرم مایع جهت نبولایز، نیاز است)	۱۰۲	۱۰۱	عدم حضور *S. aureus* (1g or 1mL)
			عدم حضور *P. aeruginosa* (1g or 1mL)
			عدم حضور باکتری‌های گرم منفی مقاوم به اسیدهای صفراوی (1g or 1mL)
ماده اولیه جهت مصارف دارویی	۱۰۳	۱۰۲	----------

با توجه به جدول ۲ تفسیر نتایج به صورت ذیل خواهد بود:

در صورتی که تعداد 10^1cfu، 10^2cfu، 10^3cfu در جدول قید شده باشد بالاترین میزان قابل قبول میکروارگانیسم در روش شمارش به‌کار رفته به ترتیب؛ 20، 200، 2000 عدد است و به این ترتیب ادامه خواهد داشت.

این جدول لزوما جامع و فراگیر نیست و ممکن است حضور برخی میکروارگانیسم‌ها با توجه به ماهیت مواد اولیه و پروسهٔ تولید مورد ارزیابی قرار گیرد. علاوه بر میکروارگانیسم‌های قیدشده در جدول ۲، اهمیت سایر میکروارگانیسم‌های بازیابی شده نیز می‌بایست به‌صورت ذیل بررسی شود:

- نحوهٔ استعمال محصول: خطراتی که با توجه به راه مصرف می‌تواند متوجه فرد شود (راه چشمی، بینی، مسیر تنفسی)
- ماهیت محصول: قابلیت محصول برای پرورش باکتری و اینکه آیا محصول، پرزرواتیو کافی برای جلوگیری از رشد میکروب‌ها در خود دارد یا خیر.
- روش استفاده
- جمعیت هدف: ریسک خطر می‌تواند از نوزاد به کودک متفاوت باشد.
- استفاده از مواد تضعیف کنندهٔ سیستم ایمنی: همانند کورتیکواستروئیدها
- وجود بیماری، زخم، آسیب به ارگان خاص

بررسی فصل <۶۱> USP: تست‌های شمارش میکروبی

ملاحظات کلی

تمام آزمایشات انجام شده می‌بایست تحت شرایط استریل انجام شوند تا از ورود میکروارگانیسم خارجی در حین انجام تست جلوگیری شود. در صورتی که فرآوردهٔ دارویی حاوی فعالیت ضد میکروبی باشد، اثر مادهٔ ضد میکروب می‌بایست حذف یا خنثی شود. در صورتی که مواد خنثی‌کننده به این منظور استفاده می‌شوند، می‌بایست از تاثیرگذاری آنها بر حذف مادهٔ ضد میکروبی و عدم سمیت آنها بر روی میکروارگانیسم‌ها اطمینان حاصل کرد (تا از بروز نتیجهٔ منفی کاذب جلوگیری شود).

در صورتی که هنگام آماده‌سازی نمونه از مواد فعال سطحی (از قبیل سورفکتانت‌ها) استفاده شده باشد، می‌بایست عدم سمیت آن برای میکروارگانیسم و سازگاری آن با مادهٔ خنثی‌کننده تعیین شود.

روش‌های شمارش

روش‌های مختلفی برای شمارش بار میکروبی وجود دارند؛ از جمله: روش‌های شمارش کلونی‌ها در پلیت، فیلتراسیون و روش MPN (most probable number). در این بین روش MPN نسبت به سایر روش ها از صحت کمتری برخوردار است، هرچند برای فرآورده‌هایی خاص با بار میکروبی پایین می‌تواند مناسب‌ترین روش باشد.

انتخاب روش شمارش به فاکتورهای مختلفی از جمله ماهیت فرآورده و محدودهٔ میکروبی مجاز برای آن فرآورده وابسته است. نکتهٔ حائز اهمیت این است که روش شمارش منتخب می‌بایست قادر به انجام تست بر روی تعدادی کافی از نمونه باشد تا بتوان دربارهٔ کیفیت میکروبی محصول قضاوت نمود.

گام اول: آماده‌سازی نمونه

روش آماده‌سازی نمونه به خصوصیات فیزیکی محصول دارویی مد نظر وابسته است. در ادامه روش‌های آماده‌سازی برای هر فرم دارویی به تفکیک قید شده‌اند. اگر هیچ یک از روش‌های ذیل رضایت‌بخش نبود، می‌بایست روش جایگزین مناسبی توسط محقق تعیین شود.

محصولات محلول در آب: محصول مدنظر در محلول بافری سدیم کلراید-پپتون با pH ۷، بافر فسفات با pH ۷/۲ یا محیط کشت مایع سوی بین کازئین دایجست براث حل یا رقیق می‌شود (غالبا رقت ۱ به ۱۰ اعمال می‌شود). در صورت نیاز pH را می‌توان در محدودهٔ ۶-۸ تنظیم نمود. اگر رقت ۱:۱۰ کافی نبود، می‌توان توسط مادهٔ رقیق‌کنندهٔ استفاده شده در مرحلهٔ اول، رقت‌های بیشتر را اعمال نمود. رقیق‌سازی نمونه‌ها می‌بایست به نحوی صورت گیرد که خطاهای احتمالی به حداقل میزان خود کاهش یافته و میزان این خطاها قابل پیش‌بینی باشند، بدین منظور روش استفاده‌شده باید معتبرسازی شود (۲۶).

محصولات غیر چرب نامحلول در آب: از محصول مدنظر در محلول بافری سدیم کلراید-پپتون با pH ۷، بافر فسفات با pH ۷/۲ یا سوی بین کازئین دایجست براث با رقت ۱:۱۰ سوسپانسیون تهیه می‌شود. می‌توان برای بهبود سوسپانسیونه شدن موادی که ترپذیری ضعیفی دارند از مواد فعال سطحی (همچون پلی سوربات ۸۰ با غلظت 1g/L) استفاده کرد. در صورت نیاز می‌توان pH را در محدودهٔ ۶-۸ تنظیم نمود. اگر رقت ۱:۱۰ کافی نبود، می‌توان توسط مادهٔ رقیق‌کنندهٔ استفاده شده در مرحلهٔ اول، رقت‌های بیشتر را اعمال نمود.

محصولات چرب: این محصولات را می‌توان در ایزوپروپیل میریستات (استریل شده با فیلتراسیون) حل کرده و یا محصول را با حداقل مقدار مورد نیاز پلی سوربات ۸۰ استریل یا یک مادهٔ فعال سطحی غیرمهاری دیگری مخلوط نمود. در صورت نیاز و برای اختلاط بهتر می‌توان مخلوط را حرارت ملایم (کمتر از 40°C) داد و در موارد استثنا می‌توان حتی دما را تا ۴۵°C بالا برد، جهت ثابت نگه داشتن دما حمام آبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مرحلهٔ همزدن می‌بایست با دقت انجام پذیرد. پس از این مرحله؛ از رقیق‌کننده‌ای که از قبل گرم شده به حدی به نمونه افزوده می‌شود تا رقت ۱:۱۰ از محصول اولیه حاصل شود. در حالی که دما در کوتاه‌ترین زمان ممکن برای تشکیل امولسیون ثابت نگه داشته شده است؛ نمونه با دقت هم زده می‌شود. ممکن است رقت‌های ۱۰ برابری دیگر توسط رقیق‌کنندهٔ منتخب حاوی غلظت مناسب از پلی سوربات ۸۰ استریل یا یک مادهٔ فعال سطحی غیرمهاری دیگر تهیه شوند.

مایعات یا جامدات داخل فرم آیروسل: این محصولات را می‌توان بصورت آسپتیک به یک دستگاه غشای فیلتری یا ظرف نگه‌داری استریل برای نمونه‌گیری‌های بعدی منتقل کرد. در ادامه می‌توان از کل محتوا و یا تعداد معین از دوزهای اندازه‌گیری شده از هر ظرف، جهت انجام تست‌ها استفاده شود.

پچ‌های پوستی ترنس درمال: در مورد این دسته از اشکال دارویی ابتدا پوشش‌های محافظ پچ باید برداشته شوند (لایهٔ

آزادکننده)، سپس پچ‌ها طوری روی یک شیشه یا سینی پلاستیکی استریل قرار میگیرند که قسمت چسبندهٔ آنها رو به بالا قرار گیرد. این قسمت چسبندهٔ پچ با مواد استریل متخلخلی همچون گاز استریل پوشانده شده تا از چسبیدن پچ‌ها به یکدیگر جلوگیری شود. در نهایت تمامی پچها به حجم مناسبی از مادهٔ رقیق کننده که حاوی مواد غیرفعال‌کننده چون پلی سوربات/لسیتین هستند، منتقل شده و این مخلوط حداقل به مدت ۳۰ دقیقه به شدت هم زده می‌شود.

مقدار مورد نیاز از شکل دارویی برای انجام تست

برای هر نمونه ۱۰ گرم یا ۱۰ سی سی از محصول تست می‌شود (مگر اینکه در مونوگراف مربوطه عدد دیگری قید شده باشد). برای آئروسل‌های مایع و جامد ۱۰ عدد ظرف حاوی آئروسل و برای پچ‌های ترنس درمال ۱۰ عدد پچ می‌بایست تست شوند.

ممکن است مقداری که می‌بایست تست شود تحت شرایط ذیل کاهش یابد:

- مقدار دارو در هر واحد دارویی (قرص، کپسول، تزریقی) کمتر یا مساوی 1mg باشد یا مقدار در هر گرم یا میلی‌لیتر (برای فرم هایی که در واحد دوز ارائه نمی شوند) کمتر از 1mg باشد. در چنین مواردی مقداری از نمونه که می‌بایست تست شود نباید از مقدار ماده موثرهٔ دارویی در ۱۰ واحد، ۱۰ گرم یا ۱۰ سی سی از محصول دارویی کمتر باشد.
- برای موادی که بعنوان مواد فعال دارویی استفاده می شوند وقتی مقدار نمونه خیلی کم باشد یا سایز بچ بسیار کوچک باشد (به عنوان مثال کمتر از ۱۰۰۰ گرم یا ۱۰۰۰ سی سی)، مقدار تست شده باید ۱٪ کل بچ باشد مگر اینکه مقادیر کمتری توصیه شده باشد. برای محصول‌هایی که تعداد کل کمتر از ۲۰۰ باشد (مانند نمونه‌های آزمایشی در مطالعات بالینی)، حجم نمونه به ۲ واحد یا یک ۱ واحد دارو (برای محصول‌هایی که تعداد کل کمتر از ۱۰۰ باشد) کاهش می‌یابد. نمونه یا نمونه‌های مورد آزمایش می‌بایست به‌صورت تصادفی از حجم کل ماده یا بسته‌بندی‌های در دسترس انتخاب شوند. برای به‌دست آوردن مقدار مورد نیاز، محتوای تعداد مناسب از هر بسته‌بندی با یکدیگر مخلوط می‌شوند.

گام دوم: تست مقدماتی

تلقیح باکتری به نمونه‌ها و رقیق سازی

هدف از این مرحله پی بردن به حذف اثر مادهٔ ضد میکروبی، در نمونه‌های تهیه‌شده در مرحلهٔ قبلی (بخش آماده‌سازی نمونه) است. به همین دلیل به نمونهٔ مد نظر و نمونهٔ کنترل (بدون مادهٔ تست شونده) مقادیر کافی از سوسپانسیون باکتری اضافه شده تا تعداد کمتر از ۱۰۰ cfu باکتری حاصل شود. حجم سوسپانسیون باکتری نباید بیشتر از ۱٪ از حجم محصول رقیق شده باشد.

جهت نشان دادن بازیابی قابل قبول میکروبی از محصول، کمترین فاکتور رقت ممکن می‌بایست از نمونه استفاده شود. زمانی که این امر به دلیل عدم خنثی شدن فعالیت ضدمیکروبی پرزرواتیو یا محلولیت کم ممکن نبود، باید پروتوکل‌های دیگری امتحان شوند. اگر اثر ضد میکروبی پرزرواتیو همچنان باقی مانده باشد، افزودن دوبارهٔ سوسپانسیون‌های باکتری می‌بایست پس از خنثی‌سازی، رقیق سازی یا فیلتراسیون مجدد پرزرواتیو صورت گیرد.

خنثی سازی/ حذف فعالیت ضدمیکروبی

تعداد میکروارگانیسم‌های رشد یافته در نمونه‌های تهیه شده که مطابق مرحلهٔ قبل رقیق شده و سپس انکوبه شده‌اند با تعداد میکروارگانیسم‌های نمونهٔ کنترل مقایسه می‌شوند.

در صورتی که رشد مهار شده باشد، روش می‌بایست اصلاح شود تا نتایج معتبر حاصل شود. اصلاحات روش می‌توانند شامل موارد زیر باشند:

۱. افزایش رقیق‌کننده یا محیط کشت
۲. افزودن مادهٔ خنثی‌کننده خاص یا عمومی به مادهٔ رقیق‌کننده
۳. فیلتراسیون
۴. ترکیبی از روش‌های قیدشده

مواد خنثی‌کننده

مواد خنثی‌کننده ممکن است برای خنثی کردن فعالیت عوامل ضد میکروبی استفاده شوند (جدول ۳). این مواد می‌توانند قبل از استریلیزاسیون به رقیق‌کنندهٔ منتخب افزوده شوند. در صورتی که از مواد خنثی‌کننده استفاده شود، کارایی و عدم سمیت آنها بر روی میکروارگانیسم می‌بایست ثابت شود. برای اثبات این امر از نمونهٔ بلانک حاوی مادهٔ خنثی‌کننده استفاده می‌شود.

اگر هیچ روش مناسبی برای خنثی کردن یافت نشد، عدم رشد باکتری به خاصیت میکروب کشی محصول دارویی نسبت داده

می‌شود. با وجود این اطلاعات می‌توان صریحا اعلام کرد که آلودگی محصول دارویی با آن دسته از باکتری‌های بخصوصی که به‌صورت دستی به محصول افزوده می‌شوند محتمل نیست. اما این نکته حائز اهمیت است که با وجود اینکه محصول می‌تواند رشد میکروارگانیسم‌های تعیین شده در USP را مهار کند، اما ممکن است رشد میکروارگانیسم‌هایی که در USP قید نشده‌اند مهار نشود

فیلتراسیون غشایی

بدین منظور فیلترهای غشایی با سایز کمتر از ۰/۴۵µm استفاده می‌شوند. نوع جنس فیلتر طوری انتخاب می‌شود که کارایی فیلتر، توسط اجزاء داخل نمونهٔ مورد آزمایش، تحت تاثیر قرار نگیرد. برای هرکدام از میکروارگانیسم‌های لیست شده یک نوع فیلتر غشایی استفاده می‌شود.

مقدار مناسب از نمونهٔ آماده‌شده را (اگر مقدار بالایی از cfu انتظار رود؛ ترجیحا معادل ۱ گرم از محصول یا کمتر) فیلتر کرده و فیلتر با حجم مناسب از رقیق‌کننده شستشو داده می‌شود.

برای تعیین TAMC، غشای فیلتر به سطح محیط کشت سوی بین کازئین دایجست آگار و برای تعیین TYMC غشای فیلتر به سطح سابرود دکستروز آگار انتقال داده می‌شود. پلیت مطابق شرایط جدول ۴ انکوبه شده و سپس شمارش انجام می‌گیرد.

بازیابی میکروارگانیسم‌ها در حضور محصول

برای هرکدام از میکروارگانیسم‌های لیست‌شده در USP تست‌های جداگانه ای صورت می‌گیرد که در ادامه (فصل <۶۲>) اشاره خواهند شد. در تست شمارش، صرفا گونهٔ میکروارگانیسمی که اضافه شده، شمرده می‌شود.

گام سوم: شمارش میکروارگانیسم‌ها

Pour plate methods: این روش حداقل در دو پلیت انجام می‌پذیرد و میانگین تعداد میکروارگانیسم در دو پلیت به‌عنوان نتیجه گزارش می‌شود. در این روش ۱سی سی از نمونه‌ای که تحت شرایط USP (آماده‌سازی *نمونه، تلقیح باکتری، رقیق‌سازی و خنثی سازی/حذف فعالیت ضدمیکروبی)* تهیه شده است، وارد پلیت‌هایی با قطر ۹cm شده و سپس با ۲۰-۱۵ سی سی سوی بین کازئین دایجست آگار یا سابرود دکستروز آگار مذاب که حرارت آن کمتر از ۴۵°C است، مخلوط می‌شود. در صورتی که ابعاد پلیت استفاده شده بزرگتر باشد؛ مطابق با آن محیط کشت بیشتری افزوده می‌شود. برای هر میکروارگانیسم لیست شده در جدول ۴ حداقل دو پتری دیش استفاده می‌شود.

انکوباسیون مطابق شرایط جدول ۴ صورت گرفته و میانگین تعداد میکروارگانیسم در دو پلیت محاسبه میشود، در نهایت باتوجه به حجم انتخاب شده از نمونه در ابتدای کار؛ تعداد cfu در نمونهٔ اصلی محاسبه می‌شود.

Surface spread method

این روش حداقل در دو پلیت انجام می‌پذیرد و میانگین تعداد میکروارگانیسم در دو پلیت به عنوان نتیجه گزارش می‌شود. در این روش ابتدا محیط کشت جامد تهیه شده و سپس نمونه افزوده می‌شود. برای پلیت‌های با قطر ۹cm، ۱۵-۲۰ سی سی از سوی بین کازئین دایجست آگار یا سابرود دکستروز آگار به هر پلیت اضافه شده و زمان داده می‌شود تا جامد شود. در صورتی که ابعاد پلیت استفاده شده بزرگتر باشد؛ مطابق با آن محیط کشت بیشتری افزوده می‌شود. پلیت‌ها در کابینهایی با جریان هوای لامینار یا در انکوباتور خشک می‌شوند. مانند روش pour plate در این جا نیز برای هر میکروارگانیسم لیست شده در جدول ۴ حداقل دو پلیت استفاده می‌شود. حجم نمونهٔ استفاده شده در این روش ۰/۱ میلی‌لیتر است که بر روی سطح محیط کشت جامد پخش‌شده و پس از انکوباسیون، شمارش مشابه روش پور پلیت انجام می‌پذیرد.

روش MPN

دقت و صحت روش MPN از دو روش قبلی کمتر است و نتایج غیر قابل اتکا (خصوصا در رابطه با شمارش قارچ‌ها) بدست می آید. این روش برای شمارش TAMC تحت شرایطی که هیچ روش دیگری موجود نباشد مورد استفاده قرار می گیرد.

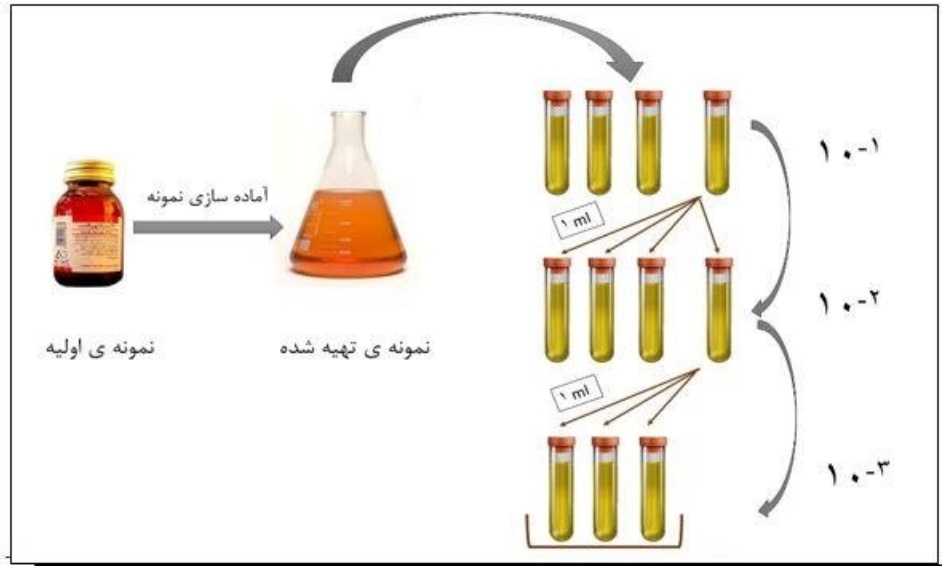
روش کار به این صورت است: حداقل سه سری رقت ۱۰ از نمونه تهیه می‌شود، سپس از هر سری ۱ میلی‌لیتر یا ۱ گرم برداشته با ۱۰-۹ میلی‌لیتر از محیط کشت سوی بین کازئین دایجست براث رقیق می‌شوند. در صورت نیاز می‌توان از مواد فعال سطحی چون پلی سوربات ۸۰ یا مواد غیر فعال کنندهٔ پرزرواتیو استفاده نمود. پس از سه بار مرحلهٔ رقیق سازی ۱۰ برابری، ۹ لولهٔ تلقیح شده خواهیم داشت (شکل ۱). تمام نمونه‌ها در دمای ۳۰-۳۵°C به مدت حداکثر ۳ روز انکوبه خواهند شد. در صورتی که تفسیر نتایج به‌دلیل ماهیت محصول، مشکل و یا نامطمئن بود، کشت ثانویه در محیط کشت براث یکسان یا سوی بین کازئین دایجست آگار به مدت ۱-۲ روز در همان دما صورت خواهد گرفت و از این نتایج استفاده خواهد شد. از جدول ۵ برای تعیین تعداد محتمل میکروارگانیسم‌ها در هر mL یا g از محصول استفاده می‌شود..

جدول ۳. عوامل رایج جهت خنثی کردن مواد ضد میکروبی مداخله کننده

مواد یا روش‌های خنثی‌کننده	مواد مداخله کننده
سدیم هیدروژن سولفیت (سدیم بی سولفیت)	گلوتارآلدهید، ترکیبات جیوه
رقیق‌سازی	ترکیبات فنولیک، الکل، آلدهیدها و سوربات
گلایسین	آلدهید
لسیتین	ترکیبات آمونیوم چهارتایی (QACs)، پاراهیدروکسی بنزوات (پارابن‌ها)، بیس بی گوانیدین‌ها
پلی سوربات	QACs، پارابن‌ها، ید
تیوگلیکولات	ترکیبات جیوه
تیوسولفات	ترکیبات جیوه، هالوژن‌ها، آلدهیدها
یون‌های منیزیم و کلسیم	EDTA

جدول ۴. نحوهٔ آماده‌سازی و استفاده از میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش. (ATCC: American Type Culture Collection)

تناسب روش شمارش در حضور محصول		تقویت رشد			
TYMC	TAMC	TYMC	TAMC	آماده‌سازی گونهٔ تست	میکروارگانیسم
	سوی بین کازئین دایجست آگار/MPN سوی بین کازئین دایجست براث ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۳ روز		سوی بین کازئین دایجست آگار یا سوی بین کازئین دایجست براث ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۳ روز	سوی بین کازئین دایجست آگار یا سوی بین کازئین دایجست براث ۳۰-۳۵°C ۱۸-۲۴ساعت	*Staphylococcus aures* such as ATCC 6538
	سوی بین کازئین دایجست آگار/MPN سوی بین کازئین دایجست براث ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۳ روز		سوی بین کازئین دایجست آگار یا سوی بین کازئین دایجست براث ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۳ روز	سوی بین کازئین دایجست آگار یا سوی بین کازئین دایجست براث ۳۰-۳۵°C ۱۸-۲۴ساعت	*Pseudomonas aeruginosa* such as ATCC 9027
	سوی بین کازئین دایجست آگار/MPN سوی بین کازئین دایجست براث ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۳ روز		سوی بین کازئین دایجست آگار یا سوی بین کازئین دایجست براث ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۳ روز	سوی بین کازئین دایجست آگار یا سوی بین کازئین دایجست براث ۳۰-۳۵°C ۱۸-۲۴ساعت	*Bacillus subtilis* such as 6633 ATCC
سابرود دکستروز آگار ≤100 cfu ۲۰-۲۵°C کمتر مساوی ۵ روز	سوی بین کازئین دایجست آگار ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۵ روز MPN: غیر قابل استفاده	سابرود دکستروز آگار ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۵ روز	سوی بین کازئین دایجست آگار ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۵ روز	سابرود دکستروز آگار یا سابرود دکستروز براث ۲۰-۲۵°C ۳-۲ روز	*Candida Albicans* such as ATCC 10231
سابرود دکستروز آگار ≤100 cfu ۲۰-۲۵°Cکمتر مساوی ۵ روز	سوی بین کازئین دایجست آگار ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۵ روز MPN: غیر قابل استفاده	سابرود دکستروز آگار ≤100 cfu ۲۰-۲۵°C کمتر مساوی ۵ روز	سوی بین کازئین دایجست آگار ≤100 cfu ۳۰-۳۵°C کمتر مساوی ۵ روز	سابرود دکستروز آگار یا پوتیتو دکستروز آگار ۲۰-۲۵°C ۷-۵ روز و یا تا زمانی که اسپورولیشن خوبی حاصل شود	*Aspergillus brasiliensis* such as ATCC 16404



شکل ۱. نمای کلی از روش MPN

جدول ۵. تعداد میکروارگانیسم‌های محتمل در نمونه توسط روش MPN

حد اطمینان ۹۵٪	MPN در هر g یا mL از محصول	تعداد لوله های کدر شده از هر سری رقت (که نشانگر رشد میکروارگانیسم هستند)		
		تعداد g یا mL از محصول در هر لوله		
		۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۱
۰-۹/٤	۳<	۰	۰	۰
۰/۱-۹/٥	۳	۱	۰	۰
۰/۱-۱۰	۳	۰	۱	۰
۱/۲-۱۷	٦/۱	۱	۱	۰
۱/۲-۱۷	٦/۲	۰	۲	۰
۳,٥-۳٥	۹/٤	۰	۳	۰
۰/۲-۱۷	۳/٦	۰	۰	۱
۱/۲-۱۷	۷/۲	۱	۰	۱
٤-۳٥	۱۱	۲	۰	۱
۱/۳-۲۰	۷/٤	۰	۱	۱
٤-۳٥	۱۱	۱	۱	۱
٤-۳٥	۱۱	۰	۲	۱
٥-۳۸	۱٥	۱	۲	۱
٥-۳۸	۱٦	۰	۳	۱

حد اطمینان ٪۹۵	MPN در هر g یا mL از محصول	تعداد لوله های کدر شده از هر سری رقت (که نشانگر رشد میکروارگانیسم هستند)		
۱/۵_۳۵	۹,۲	۰	۰	۲
٤_۳۵	۱٤	۱	۰	۲
۵_۳۸	۲۰	۲	۰	۲
٤_۳۸	۱۵	۰	۱	۲
۵_۳۸	۲۰	۱	۱	۲
۹_۹٤	۲۷	۲	۱	۲
۵_٤۰	۲۱	۰	۲	۲
۹_۹٤	۲۸	۱	۲	۲
۹_۹٤	۳۵	۲	۲	۲
۹_۹٤	۲۹	۰	۳	۲
۹_۹٤	۳٦	۱	۳	۲
۵_۹٤	۲۳	۰	۰	۳
۹_۱۰٤	۳۸	۱	۰	۳
۱٦_۱۸۱	٦٤	۲	۰	۳
۹_۱۸۱	٤۳	۰	۱	۳
۱۷_۱۹۹	۷۵	۱	۱	۳
۳۰_۳٦۰	۱۲۰	۲	۱	۳
۳۰_۳۸۰	۱٦۰	۳	۱	۳
۱۸_۳٦۰	۹۳	۰	۲	۳
۳۰_۳۸۰	۱۵۰	۱	۲	۳
۳۰_٤۰۰	۲۱۰	۲	۲	۳
۹۰_۹۹۰	۲۹۰	۳	۲	۳
٤۰_۹۹۰	۲٤۰	۰	۳	۳
۹۰_۱۹۸۰	٤٦۰	۱	۳	۳
۲۰۰_٤۰۰۰	۱۱۰۰	۲	۳	۳
	>۱۱۰۰	۳	۳	۳

ارزیابی محصولات

در روش فیلتراسیون غشایی باید فیلتر استفاده شده قابل انتقال بر روی محیط کشت باشد. نمونه‌ها مطابق پروتوکل قید شده آماده گردیده و مقدار مناسب از آنها را به هر کدام از دو فیلتر انتقال داده و سپس فیلتر می شوند. متعاقب آن هر فیلتر توسط روش مناسبی شستشو داده می‌شود. برای تعیین مقدار TAMC یکی از فیلترها به سطح سوی بین کازئین دایجست آگار منتقل گردیده و به مدت ۳-۵ روز در دمای ۳۰-۳۵°C انکوبه می‌شود و برای تعیین مقدار TYMC فیلتر دیگر به سطح سابرود دکستروز آگار منتقل گردیده، به مدت ۵-۷ روز در دمای ۲۰-۲۵°C انکوبه می‌شود. مقدار cfu/mL یا cfu/g پس از انکوباسیون و شمارش تعداد کلونی‌ها توسط دستگاه کلونی کانتر قابل محاسبه است. هنگام ارزیابی پچهای ترنس درمال؛ بصورت جداگانه ۱۰٪ حجم کل نمونهٔ آماده شده توسط دو فیلتر استریل، فیلتر می‌شود. برای تعیین مقدار TAMC یکی از فیلترها به سطح سوی بین کازئین دایجست آگار و برای تعیین مقدار TYMC فیلتر دیگر به سطح سابرود دکستروز آگار منتقل می‌شود.

در روش Pour plate نمونه مطابق پروتوکل مناسب آماده شده و برای هر سطح رقت حداقل دو پلیت تهیه می‌شود. پلیت سوی بین کازئین دایجست آگار به مدت ۳-۵ روز در دمای ۳۰-۳۵°C و پلیت سابرود دکستروز آگار به مدت ۵-۷ روز در دمای ۲۰-۲۵°C انکوبه می‌شود. پلیت‌های با رقت مشابه را انتخاب کرده و نشان می‌دهیم که بیشترین تعداد کلونی برای TAMC کمتر از ۲۵۰ و برای TYMC کمتر از ۵۰ است. میانگین شمارش پلیت ها را محاسبه کرده و تعداد cfu/mL یا cfu/g محاسبه می‌شود.

در روش Surface spread نمونه مطابق پروتوکل مناسب آماده می‌شود و حداقل دو پلیت برای هر محیط کشت و هر سطح رقتی باید فراهم شود. مراحل انکوباسیون و محاسبهٔ تعداد cfuها همانند روش Pour plate صورت می‌گیرد.

در روش Most probable number نمونه مطابق پروتوکل مناسب آماده می‌شود. تمام لوله ها به مدت ۳-۵ روز در دمای ۳۰-۳۵°C انکوبه خواهند شد. در صورت نیاز با استفاده از روش مناسبی کشت ثانویه انجام خواهد گرفت. برای هر سطح رقتی تعداد لوله‌هایی که میکروب در آنها رشد کرده ثبت شده و تعداد محتمل میکروارگانیسم در mL یا g طبق جدول ۵ تعیین می‌شود. حد اطمنیان ۹۵٪ بیانگر مقادیر حداقلی و حداکثری از تعداد میکروارگانسیم است و در واقع بازه‌ای را بیان می‌کند که با اطمینان ۹۵٪، می‌توان در مورد تعداد میکروارگانیسم در نمونه اظهار نظر کرد.

به عنوان مثال در صورتی که از هرسری رقت ها، دو لوله از سه لوله کدر شده باشند (جدول ۵)، با اطمینان ۹۵٪ می‌توان اظهار کرد که تعداد میکروارگانیسم‌ها در بازهٔ ۹۴-۹ cfu/mL یا cfu/g هستند.

تفسیر نتایج

TAMC مساوی با تعداد cfu یافت شده در محیط کشت سوی بین کازئین دایجست آگار در نظر گرفته می‌شود. در صورتی که کلنی های قارچ در این محیط کشت یافت شود، آنها بعنوان جزئی از TAMC در نظر گرفته می شوند. TYMC مساوی با تعداد cfu یافت شده در محیط سابرود دکستروز آگار در نظر گرفته می‌شود، اگر کلونی‌های باکتری در این محیط کشت یافت شوند به عنوان جزیی از TYMC در نظر گرفته می‌شوند. زمانی که انتظار می‌رود مقدار TYMC بیشتر از مقادیر قابل قبول باشد، امکان دارد سابرود دکستروز آگار حاوی آنتی بیوتیک استفاده شود.

در صورتی که شمارش با استفاده از روش MPN انجام شود، مقدار محاسبه شده معادل TAMC است.

بررسی فصل <۶۲> USP: تست‌های میکروارگانیسم‌های مشخص شده

تست‌های شناسایی

در صورتی که میکروارگانیسمی در محیط کارخانه، مواد اولیهٔ دارو، آب یا محصول نهایی مشاهده شود می‌بایست تعیین هویت شود. تست‌های شناسایی معمول شامل شناسایی براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی کلونی یا سلول (میله‌ای، کوکسی، تجمع سلول‌ها، اسپور، تحرک سلول‌ها و...)، رنگ‌آمیزی گرم یا سایر رنگ‌آمیزی های افتراقی و واکنش‌های بیوشیمیایی کلیدی (نظیر تست اکسیداز، کاتالاز، کوآگولاز و...) می باشد(۲۷).

تست‌های معرفی شده در این بخش، به تعیین حضور، عدم حضور یا وقوع محدود میکروارگانیسم‌های خاص، تحت شرایطی که توصیف خواهند شد می‌پردازد.

تهیهٔ سویه‌های باکتری‌ها

همان طور که در ادامه توضیح داده خواهد شد، سوسپانسیونهای پایدار و استاندارد شدهٔ سویه‌ها می‌بایست مورد استفاده قرار گیرند. بدین منظور تکنیک seed lot culture maintenance (seed lot system) مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابرین میکروارگانیسم‌های زندهٔ استفاده شده برای تلقیح نمونه‌ها، نباید بیش از ۵ بار پاساژ داده شوند.

میکروارگانیسم‌های هوازی

جدول ۶ به میکروارگانیسم‌های هوازی مورد استفاده در تست شناسایی می‌پردازد. به عنوان مثال یکی از این میکروارگانیسمها سودوموناس آئروژینوزا می باشد که به عنوان پاتوژن های مهم انسانی مسئول عفونت در بیمارستان ها و همچنین جامعه هستند (۲۸).

هرکدام از گونه‌های باکتری می‌بایست به‌صورت جداگانه در ظروفی که حاوی سوی بین کازئین دایجست براث یا سوی بین کازئین دایجست آگار است رشد کنند (۳۰-۳۵°C، ۱۸-۲۴ ساعت). *کاندیدا آلبیکنز* بصورت جداگانه در سابرود دکستروز آگار یا سابرود دکستروز براث می‌بایست رشد کند (۲۰-۲۵°C ، ۳-۲ روز).

جدول ۶. میکروارگانیسم‌های هوازی مورد استفاده در تست شناسایی (NCTC: National Collection of Type Cultures)

میکروارگانیسم‌های هوازی	NCTC
Staphylococcus aures	**Such as ATCC 6538**
Pseudomonas aeruginosa	**Such as ATCC 9027**
Escherichia coli	**Such as ATCC 8739**
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium or,	**Such as ATCC 14028**
as an alternative, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony	**Such as NCTC 6017**
Candida albicans	**Such as ATCC 10231**

جدول ۷. تفسیر نتایج - تعداد محتمل باکتری در هر g یا ml از نمونه

	نتایج برای هر مقدار از محصول		
تعداد محتمل باکتری در هر g یا mL	۰/۰۰۱g یا ۰/۰۰۱mL	۰/۰۱g یا۰/۰۱mL	۰/۱g یا ۰/۱mL
بیش از 10^3	+	+	+
کمتر از 10^3 و بیشتر از 10^2	-	+	+
کمتر از 10^2 و بیشتر از 10^1	-	-	+
کمتر از ۱۰	-	-	-

محلول بافری سدیم کلراید-پپتون با pH ۷ یا محلول بافری فسفات با pH ۷/۲ برای تهیهٔ سوسپانسیون باکتری‌ها استفاده می‌شود. در صورتی که این سوسپانسیون در دمای ۲-۸°C نگه داری شود، به مدت ۲۴-۲ ساعت قابل استفاده است.

CLOSTRIDIA

Clostridium sporogenes (Cl. Sporogenes) such as ATCC 11437 or ATCC 19404 (NCTC 532).

گونهٔ *کلستریدیا* می‌بایست در محیط کشت تقویت شده و تحت شرایط بی‌هوازی رشد کند (۳۰-۳۵°C ، ۴۸-۲۴ ساعت).

به عنوان جایگزین آماده سازی و سپس رقیق کردن سوسپانسیون حاوی سلولهای رویشیCl. Sporogenes ، می توان از سوسپانسیون حاوی اسپور پایدار برای تلقیح استفاده کرد.

استفاده از سوسپانسیون پایدار اسپورها برای تلقیح، روش جایگزین تهیه و رقیق‌سازی سوسپانسیون تازهٔ سلول‌های رویشی *Cl. Sporogenes* محسوب می‌شود. سوسپانسیون پایدار اسپور ها در دمای ۲-۸°C تا مدت زمان معتبر قابل نگه‌داری است. استفاده از نمونهٔ کنترل منفی در انجام تست‌های شناسایی توصیه می‌شود.

خصوصیات محیط کشت در تحریک یا مهار رشد باکتری

تست بررسی ویژگی محرک رشد بودن محیط کشت‌های مایع: مقدار مناسبی از محیط کشت توسط حجم کمی از میکروارگانیسم مدنظر (کمتر از cfu ۱۰۰) آلوده می‌شود. پس از انکوباسیون در شرایط مشخص و کوتاه ترین زمان توصیه شده، رشد واضح میکروارگانیسم در مقایسه با قبل از تلقیح باکتری بیانگر کارایی مناسب محیط کشت است.

تست بررسی ویژگی محرک رشد بودن محیط کشت‌های جامد: با استفاده از روش Surface spread، هر پلیت توسط مقدار مناسبی از میکروارگانیسم مدنظر آلوده خواهد شد. پس از انکوباسیون در شرایط مشخص و کوتاه ترین زمان توصیه شده، رشد واضح میکروارگانیسم در مقایسه با قبل از تلقیح باکتری بیانگر کارایی مناسب محیط کشت است.

تست بررسی ویژگی مهار کنندهٔ رشد بودن محیط کشت‌های جامد/مایع: مقدار مناسبی از محیط کشت را توسط حجم کمی از میکروارگانیسم مدنظر (حداقل cfu ۱۰۰) آلوده می‌شود. پس از انکوباسیون در شرایط مشخص و کوتاه‌ترین زمان توصیه شده، رشد میکروارگانیسم نباید مشاهده شود.

تست بررسی ویژگی تمایز دهندهٔ محیط کشت: با استفاده از روش surface spread، هر پلیت توسط مقدار مناسبی از میکروارگانیسم مدنظر (کمتر از cfu ۱۰۰) آلوده خواهد شد. پس از انکوباسیون در شرایط مشخص و کوتاه‌ترین زمان توصیه شده، کلونی‌های به‌دست آمده از لحاظ ویژگی‌های ظاهری می‌بایست مشابه تست‌های صورت گرفته باشد تا محیط کشت مورد تایید واقع شود.

تناسب روش تست

برای هر محصول جدیدی که قرار است مورد تست واقع شود، مراحل تهیهٔ نمونه که پیشتر توضیح داده شد، انجام می‌پذیرد. هر کدام از گونه‌های میکروارگانیسم‌های قیدشده به‌صورت جداگانه به محیط کشت توصیه شده افزوده می‌شوند و تعداد میکروارگانیسم نباید از 100cfu بیشتر باشد. تست‌ها در کمترین زمان انکوباسیون توصیه شده صورت می‌پذیرند. میکروارگانیسم مدنظر می‌بایست با ویژگی‌های مشخص خود شناسایی شود. در صورت حضور هر گونه فعالیت ضدمیکروبی فرآورده، می‌بایست اصلاحات لازم روی پروسه صورت گیرد. اگر فعالیت ضدمیکروبی فرآورده‌ای قابل خنثی کردن نبود، نتیجه‌گیری می‌شود که میکروارگانیسم‌های ممنوع‌شده قادر به رشد در این فرآورده نیستند.

بررسی محصولات از لحاظ وجود یا عدم وجود باکتری‌های گرم منفی مقاوم به اسیدهای صفراوی

نمونه با رقت ۱:۱۰ تهیه می‌شود (طوری که نباید کمتر از ۱ گرم از محصول آزمایش شود). رقیق کنندهٔ منتخب سوی بین کازئین دایجست براث است. پس از مخلوط کردن نمونه با رقیق‌کننده؛ انکوباسیون در دمای ۲۵-۲۰°C ، تا زمانی صورت می‌گیرد که باکتری‌ها احیا شوند (نه اینکه تکثیر گردند) این زمان کمتر از ۵ ساعت بوده و اغلب ۲ ساعت است.

به‌منظور بررسی عدم حضور باکتری، مانند مرحلهٔ قبل حجمی از محصول که معادل ۱ گرم باشد تهیه می‌شود (مگر در موارد استثنا) و به محیط کشت مغذی Enterobacteria Enrichment Broth Mossel انتقال داده می‌شود. انکوباسیون در دمای ۳۵-۳۰°C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت صورت میگیرد. سپس کشت ثانویه بر روی محیط کشت Violet Red Bile Glucose Agar صورت میگیرد (انکوباسیون ۳۵-۳۰°C ، ۴۸-۲۴ساعت). در صورتی محصول مورد قبول است که رشد هیچ گونه کلنی مشاهده نشود.

جهت کمی کردن نتایج می‌توان رقتهای مختلفی از نمونهٔ اصلی را در محیط کشت مغذی Enterobacteria Enrichment Broth Mossel تهیه نمود. به عنوان مثال رقت هایی که معادل ۰/۱g، ۰/۰۱g، ۰/۰۰۱g (و یا معادل ۰/۱ میلی‌لیتر، ۰/۰۱ میلی‌لیتر، ۰/۰۰۱ میلی‌لیتر) از نمونهٔ اصلی باشند. مانند مرحلهٔ قبلی انکوباسیون در دمای ۳۵-۳۰°C به مدت۴۸-۲۴ساعت انجام خواهد گرفت. سپس کشت ثانویه بر روی محیط کشت Violet Red Bile Glucose Agar صورت میگیرد (انکوباسیون ۳۵-۳۰°C، ۱۸-۲۴ ساعت). مطابق جدول ۷ تعداد محتمل باکتری تفسیر می شود (به مواردی که در رقت‌های پایین رشد کلونی صورت گرفته و در رقت‌های بالا رشدی مشاهده نشده می‌بایست توجه شود).

مراحل تست شناسایی برای *E. coli* (*Escherichia coli*)

نمونه را با رقت۱:۱۰ از محصول تهیه نموده طوری که معادل ۱ گرم یا ۱سی سی از محصول شود، پس از انتقال به محیط کشت مغذی سوی بین کازئین دایجست براث و اختلاط با آن، به مدت 18-24 ساعت در دمای ۳۵-۳۰°C انکوبه می‌شود.

کشت ثانویه. بعد از انکوباسیون، ۱ سی سی از محیط کشت سوی بین کازئین دایجست براث به ۱۰۰ سی سی محیط کشت مک کانکی براث منتقل شده (انکوباسیون ۴۴-۴۲°C، ۲۴-۴۸ ساعت)؛ در

نهایت از این محیط کشت به پلیت حاوی محیط کشت مک کانکی آگار منتقل می‌شود (انکوباسیون ۷۲-۱۸ ساعت، ۳۵°C-۳۰).

تفسیر: محصول زمانی مورد قبول است که رشد هیچ گونه کلونی مشاهده نشود و تست شناسایی منفی باشد.

مراحل تست شناسایی برای *Salmonella*

نمونه را همانند مراحل توضیح داده شده در بخش قبلی <فصل ۶۱> تهیه کرده و باید مقداری از محصول استفاده شود که معادل ۱۰ گرم یا ۱۰ سی سی باشد. پس از انتقال نمونه به محیط کشت سوی بین کازئین دایجست براث و اختلاط با آن، نمونه به مدت 24-18 ساعت در دمای 35-30°C انکوبه می‌شود.

کشت ثانویه: ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت سوی بین کازئین دایجست براث به ۱۰ سی سی محیط کشت Rappoport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth منتقل شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵°C-۳۰ انکوبه می‌شود. سپس انتقال به محیط کشتXylose lysine Deoxycholate Agar صورت گرفته و به مدت ۷۲-۱۸ ساعت در دمای ۳۵°C-۳۰ انکوبه می‌شود.

تفسیر: حضور *سالمونلا* با رشد کلونی‌های قرمز با یا بدون مرکز سیاه رنگ مشخص می‌شود که توسط تست‌های شناسایی تکمیلی تایید می شوند. محصول زمانی مورد قبول است که رشد کلونی با ویژگی های قید شده مشاهده نشود و تست‌های شناسایی تکمیلی منفی باشد.

مراحل تست شناسایی برای *Pseudomonas aeruginosa*

نمونه را با رقت۱:۱۰ از محصول طوری تهیه نموده که حداقل معادل ۱ گرم از محصول شود. سپس از ۱۰ سی سی یا مقداری که معادل ۱ گرم یا ۱ سی سی از محصول باشد استفاده می‌شود تا با حجم مناسبی از محیط کشت مغذی سوی بین کازئین دایجست براث مخلوط شود. هنگامی که پچهای ترانس درمال مورد تست قرار میگیرد، حجمی از نمونه توسط فیلتر غشایی استریل، فیلتر می‌شود تا معادل یک نمونهٔ تهیه شده از پچ شود و سپس به ۱۰۰ سی سی محیط کشت مغذی سوی بین کازئین دایجست براث منتقل می‌شود و به مدت 24-18 ساعت در دمای 35-30°C انکوبه می‌شود.

کشت ثانویه: پس از این مرحله به محیط کشت ستریماید آگار منتقل شده به مدت ۷۲-۱۸ساعت در دمای ۳۵°C-۳۰ انکوبه می‌شود.

تفسیر: رشد کلونی؛ امکان حضور *سودوموناس ائروژینوزا* را مطرح می‌کند و توسط تست‌های شناسایی تکمیلی تایید می‌شوند. محصول زمانی مورد قبول است که رشد کلونی مشاهده نشود و تست‌های شناسایی تکمیلی منفی باشد.

مراحل تست شناسایی برای *Staphylococcus aureus*

نمونه با رقت۱:۱۰ از محصول را طوری تهیه نموده که حداقل معادل ۱ گرم از محصول شود. سپس از ۱۰ سی سی یا مقداری که معادل ۱ گرم یا ۱ سی سی باشد استفاده می‌شود تا با حجم مناسبی از محیط کشت مغذی سوی بین کازئین دایجست براث مخلوط شود. هنگامی که پچهای ترانس درمال مورد تست قرار می‌گیرد، حجمی از نمونه توسط فیلتر غشایی استریل، فیلتر می‌شود تا معادل یک نمونهٔ تهیه شده از پچ شود و سپس به ۱۰۰ سی سی محیط کشت مغذی سوی بین کازئین دایجست براث منتقل می‌شود و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵°C-۳۰ انکوبه می‌شود.

کشت ثانویه: پس از این مرحله به محیط کشت مانیتول سالت آگار منتقل شده و به مدت ۷۲-۱۸ ساعت در دمای ۳۵°C-۳۰ انکوبه می‌شود.

تفسیر: رشد کلونی‌های زرد یا سفید که توسط هالهٔ زرد رنگی احاطه شده اند؛ امکان حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* را مطرح میکند و توسط تست‌های شناسایی تکمیلی تایید می شوند. محصول زمانی مورد قبول است که رشد کلونی مشاهده نشود و یا تست‌های شناسایی تکمیلی منفی باشد.

مراحل تست شناسایی برای *Clostridia*

نمونه را با رقت۱:۱۰ از محصول تهیه نموده (حداقل حجم تام ۲۰ سی سی) به طوری که حداقل معادل ۲ گرم یا ۲ سی سی از محصول شود، سپس نمونه را دو قسمت کرده؛ به طوری که هرکدام حداقل ۱۰ سی سی باشند، یکی از این دو قسمت به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰°C حرارت داده می‌شود و سریعا خنک می‌شود. قسمت دیگر حرارت داده نشود.

کشت ثانویه: ۱۰ سی سی یا مقداری که معادل ۱ گرم یا ۱ سی سی از محصول باشد را برای هر کدام از آن دو قسمت، با مقدار مناسبی از محیط کشت تقویت شده برای *Clostridia* مخلوط کرده و تحت شرایط بی هوازی در دمای ۳۵°C-۳۰، به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه می شوند. پس از انکوباسیون برای هر کدام از نمونه‌ها کشت ثانویه به محیط کشت Columbia Agar انجام می پذیرد سپس تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۵°C-۳۰، به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه می‌شوند.

تفسیر: رشد بی هوازی باکتری‌های میله‌ای (با یا بدون اندوسپور)، تست کاتالاز منفی، بیانگر حضور *کلستریدیا* هستند و توسط تست‌های شناسایی تکمیلی تایید می‌شوند. محصول زمانی مورد قبول است که رشد کلونی مشاهده نشود و یا تست‌های شناسایی تکمیلی منفی باشد.

مراحل تست شناسایی برای *Candida albicans*

نمونه مطابق پروتوکل شرح داده شده برای هر محصول تهیه شده، سپس ۱۰ سی سی یا مقداری که معادل ۱ گرم یا ۱ سی سی از محصول یا بیشتر باشد استفاده می‌شود تا با حجم مناسبی از محیط کشت مغذی سابرود دکستروز براث مخلوط شود، سپس به مدت ۳-۵ روز در دمای ۳۵°C-۳۰ انکوبه میشود.

کشت ثانویه: کشت ثانویه بر روی محیط کشت سابرود دکستروز آگار انجام گرفته و به مدت ۴-۲۴ ساعت در دمای ۳۵°C-۳۰ انکوبه می‌شود.

تفسیر: رشد کلونی‌های سفید می‌تواند بیانگر حضور *کاندیدا آلبیکنز* باشد و توسط تست‌های شناسایی تکمیلی تایید می‌شوند. محصول زمانی مورد قبول است که رشد کلونی مشاهده نشود و یا تست‌های شناسایی تکمیلی منفی باشد.

جدول ۸ به ویژگی محیط‌های کشت از لحاظ محرک رشد، مهار کنندهٔ رشد و نشان دهندهٔ باکتری می‌پردازد

جدول ۸. ویژگی‌های محرک رشد، مهار کنندهٔ رشد و نشان دهندهٔ باکتری برای انواع محیط‌های کشت

تست/محیط کشت	ویژگی	گونهٔ باکتری
تست برای باکتری‌های گرم منفی مقاوم به اسیدهای صفراوی		
Enterobacteria Enrichment Broth Mossel	محرک رشد	***E. coli***
		P. aeruginosa
	مهاری	***S. aureus***
Violet Red Bile Glucose Agar	محرک رشد و نشانگر	***E. coli***
		P. aeruginosa
تست برای *Escherichia coli*		
MacConkey Broth	محرک رشد	***E. coli***
	مهاری	***S. aureus***
MacConkey Agar	محرک رشد و نشانگر	***E. coli***
تست برای *Salmonella*		
Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth	محرک رشد	***Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium or***
		Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abony
	مهاری	***S. aureus***
Xylose Lysine Deoxycholate Agar	محرک رشد و نشانگر	***Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium or***

تست/محیط کشت	ویژگی	گونهٔ باکتری
		Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abony
تست برای *Pseudomonas aeruginosa*		
Cetrimide Agar	محرک رشد	***P. aeruginosa***
	مهاری	***E. coli***
تست برای *Staphylococcus aureus*		
Mannitol Salt Agar	محرک رشد و نشانگر	***S. aureus***
	مهاری	***E. coli***
تست برای *Clostridia*		
Reinforced Medium for Clostridia	محرک رشد	***Cl. sporogenes***
Columbia Agar	محرک رشد	***Cl. sporogenes***
تست برای *Candida albicans*		
Sabouraud Dextrose Broth	محرک رشد	***C. albicans***
Sabouraud Dextrose Agar	محرک رشد و نشانگر	***C. albicans***

نتیجه‌گیری

فرآورده‌های غیراستریل می‌بایست از لحاظ بار میکروبی در محدودهٔ مجاز خود باشد تا آسیبی متوجه مصرف کنندگان نشده و پایداری فرآورده نیز بر هم نریزد. میکروارگانیسم‌هارا می‌توان با استفاده از روش‌هایی که به تفصیل در فصول <۶۱> و <۶۲> در رابطه با آماده‌سازی نمونه و چگونگی انجام تست‌ها شرح داده شده است شمارش کرده و شناسایی نمود. ولیکن صنایع داروسازی با توجه به شرایط تولید و محصول تولیدی خود، می‌بایست توجه خود را به میکروارگانیسم‌هایی که در لیست USP واقع نشده اند نیز معطوف نمایند. محصولات مشابه با فعالیت آبی پایین ممکن است مقاوم به تکثیر باکتری باشند اما میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده ممکن است زنده مانده و پتانسیل آلوده کردن محصول را داشته باشند. رعایت اصول cGMP و پیشگیری از آلودگی در حین تولید منجر به تولید محصولی می‌شود که از کیفیت و پایداری بهتری برخوردار است و در نتیجه رضایت و اعتماد بیشترمصرف‌کنندگان را جلب می‌کند. با توجه به این امر که تعداد مطالعات مربوط به ارزیابی محصولات غیر استریل از لحاظ بار میکروبی در کشور ایران بسیار اندک هستند، نیاز بیشتری به انجام چنین مطالعاتی در داخل کشور احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از R،Nicole Vu Jessica و Thomas C به دلیل اینکه از برگردان مقاله ایشان در بخشی از این نوشتار استفاده شده است اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

Referance

1. Rimbara E. Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology. 8th ed. Willey-Blackwell publisher; 2012.
2. Lotfipour, Farzaneh, and Somayeh Hallaj-Nezhadi. "Microbial Quality Concerns for Biopharmaceuticals." Latest Research into Quality Control (2012): 195-214. [DOI:10.5772/52114]
3. Vu N, Lou J, Kupiec T. Quality control analytical methods: Microbial limit tests for nonsterile pharmaceuticals, part 1. Int J Pharm Compd. 2014;18(3):213-21.
4. Sutton S. What is an objectionable organism. Am Pharmaceut Rev. 2012;15(6):36-48
5. Clontz L. Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation approaches and global requirements. 2nd ed. Lucia Clontz: CRC press publisher; 2009. [DOI:10.1201/NOE1420053487] [PMID] [PMCID]
6. Bennett SN, McNeil MM, Bland LA, Arduino MJ, Villarino ME, Perrotta DM, et al. Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol, N Engl J Med. 1995; 333(3):147-154. [[DOI:10.1056/NEJM199507203330303] [PMID]
7. Archibald LK, Ramos M, Arduino MJ, Aguero SM, Deseda C, Banerjee S, et al. Enterobacter cloacae and Pseudomonas aeruginosa polymicrobial bloodstream infections traced to extrinsic contamination of a dextrose multidose vial. J Pediatr. 1998;133(5):640-4. [DOI:10.1016/S0022-3476(98)70104-0]
8. Mohiuddin A. Extemporaneous Compounding: Cautions Vs Convenience. Research & Reviews: A Journal of Toxicology. 2019;9(1):26-43. [DOI:10.15520/ijmhs.v9i1.2420]
9. Hosseyni R, Raefi A, Hashemi M. Identification of Microbial Agents Indifferent Parts of the Gastric Juice Company. Iran J Med Microbiol. 2015;8(4):44-9.
10. Mohammadi Sarab Badyeh F, Saeedi M, Enayatifard R, Morteza-Semnani K, Akbari J. Microbial Contamination in some Moisturizing Creams in Iran Market. J of Mazandaran Univ of Med Sci. 2015;24(121):400-405.
11. Ratajczak M, Kubicka M, Kamińska D, Sawicka P, Długaszewska J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. Saudi Pharm J. 2015;23(3):303-7. [DOI:10.1016/j.jsps.2014.11.015] [PMID] [PMCID]
12. Vu N, Lou J, Kupiec T. Quality Control: microbial limit tests for nonsterile pharmaceuticals, part 2. Int J Pharm Compd. 2014;18(4):305-10.
13. chapters <61>, <62> and <1111> The United States pharmacopeia. National formulary. 41st Ed.
14. GUIDE TO INSPECTIONS OF MICROBIOLOGICAL PHARMACEUTICAL QUALITY CONTROL LABORATORIES 2014. Available at: URL: http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/micro.html. Accessed February 18, 2014.
15. Apendix 16B. British pharmacopoeia. Vol. 5. London; 2016; p. 486-501.
16. 2.6.12 and 2.6.13 Chapters. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2014; p.185-194.
17. Pharmacopoeia J. The Japanese Pharmacopoeia. In: Nippo TY, editor. The Japanese Pharmacopoeia. 16 ed. Tokyo: Hirokawa Publishing; 2016. p. 138-47 & 21-0.
18. Dilip Maheshwari PV. Harmonization in Microbial Limit Test of USP and EP. AJPTI. 2106;04(19):61-70.
19. Farajnia S, Hassan M, Hallaj Nezhadi S, Mohammadnejad L, Milani M, Lotfipour F. Determination of indicator bacteria in pharmaceutical samples by multiplex PCR. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology. 2009 Sep;17(3):328-38 [DOI:10.1111/j.1745-4581.2009.00154.x]
20. Behravan J, Bazzaz F, Malaekeh P. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran (2000). Int. J. Dermatol. 2005;44(6):482-5. [DOI:10.1111/j.1365-4632.2005.01963.x] [PMID]
21. Enayatifard R, Asgarirad H, Kazemi-Sani B. Microbial quality of some herbal solid dosage forms. Afr. J. Biotechnol. 2010;9(11): 1701-05. [DOI:10.5897/AJB10.1673]
22. Haftbaradaran B, Abedi D, Jalali M, Bagherinejad MR. Microbial quality survey of sunscreen products in Iranian market. Adv Biomed Res 2014;3:180. 227-234. [DOI:10.4103/2277-9175.139534] [PMID] [PMCID]
23. Modabberi S, Namayandeh A, López-Galindo A, Viseras C, Setti M, Ranjbaran M. Characterization of Iranian bentonites to be used as pharmaceutical materials. Applied Clay Science. 2015 Nov 1;116:193-201. [DOI:10.1016/j.clay.2015.03.013]
24. Sedghi Sharif-Abad N, Saeedi M, Enayatifard R, Morteza-Semnani K, Akbari J. Evaluation of microbial content of some sunscreen creams in Iran's market. Pharm Biomed Res. 2015;1(2):30-4. [DOI:10.18869/acadpub.pbr.1.2.30]
25. Norouz-zadeh S, Saeedi M, Enayatifard R, Morteza-Semnani K, Akbari J. Microbial Content in some Foundation Creams in Iran's Market. J of Mazandaran Univ of Med Sci. 2014;24(118):214-9.
26. Hewitt W. Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach: CRC press publisher; 2003. [DOI:10.1201/b12428]
27. Baird RM, Hodges NA, Denyer SP. Handbook of microbiological quality control in pharmaceuticals and medical devices: CRC press publisher; 2000. [DOI:10.4324/9780203305195]
28. Savadi P, Taghavi-Fard T, Milani M, Hashemzadeh N, Panahi V, McMillan NA, Hallaj-Nezhadi S. Piperacillin Encapsulation in Nanoliposomes Using Modified Freeze Drying of a Monophase Solution Method: Preparation, Characterization and In Vitro Antibacterial Activity. Current microbiology. 2020 May 6. [DOI:10.1007/s00284-020-02008-0] [PMID]

1.