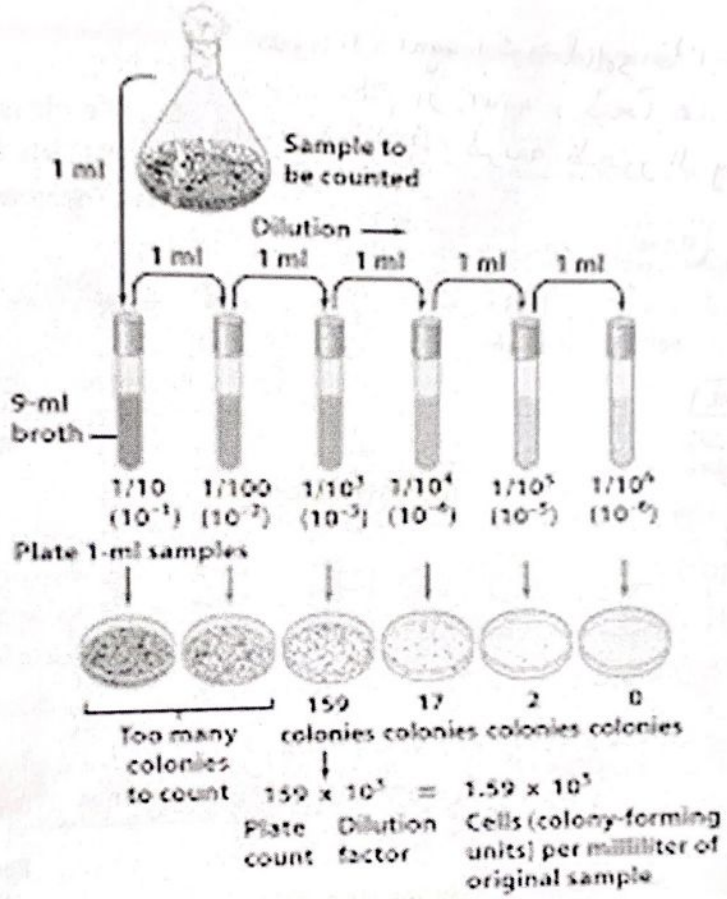


سلايد (٩)

Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Traditional counting methods: كيف أعمل Counting ؟

سلايد (٩)

- Agar : Solid nutrient media

- Broth : Liquid nutrient media

* بنوخذ 1mL من العينة الاساسية ونحطها على 9 mL من الـ broth بصير عندي dilution ⇐ 1/10 بحرك الـ tube منيح وباخذ منه 1m ونضيفه برضو على 9mL broth بصير الـ dilution ⇐ 1/100 وهكذا، بنسميه (tenfold increments dilution)

* كل وحدة من جدول الـ tubes باخذ 1mL وبزرعها على الـ Aagar وبعملها incubation وبس تخلص فترة الـ incubation باجي بشوف الـ Colonies أول تنتين كانو عددهم كبير وبعدهم ٤ بهاد،عشان [too many Colonies to Count]

- بختار 159 لحتى أجود Colony لانها ضمن range (25 - 250)

plate count ← $159 \times 10^3 = 1.59 \times 10^5$ CFU/1mL → اخدنا 1mL من الـ original sample

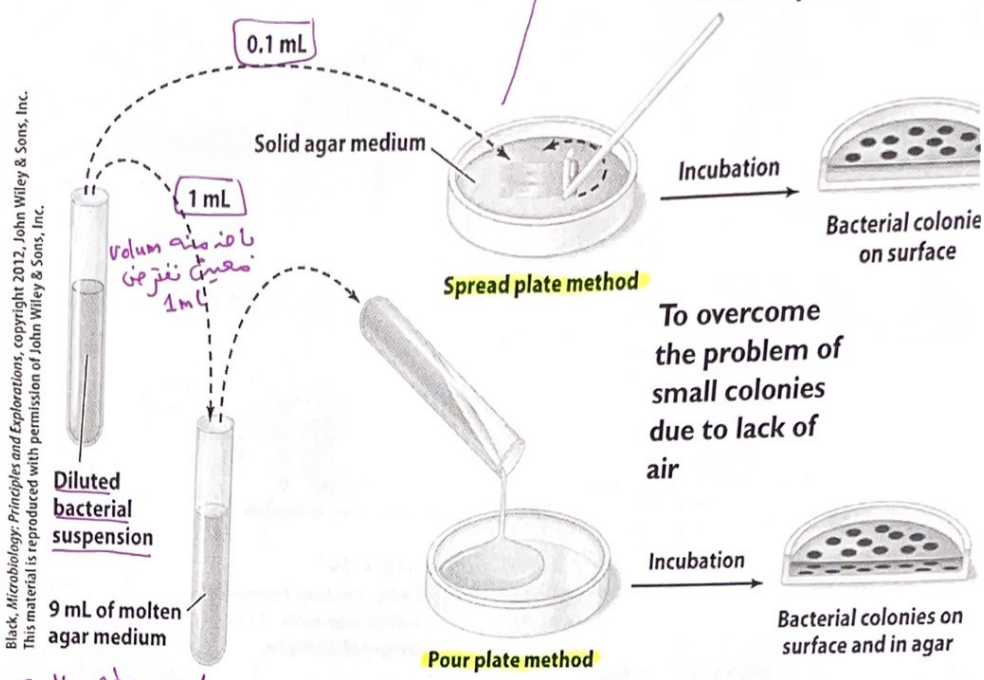
dilution factor

↳ بعطيني قديه عنا Colony in the original sample

Traditional counting methods:

كيف أعمل Counting ؟

1. Pour plates (most popular)
2. Spread plates
3. Membrane filter method
4. Most probable number method



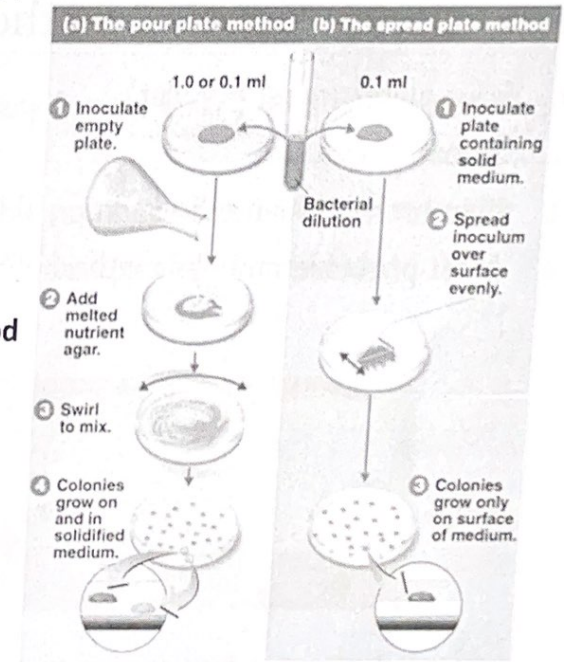
هون ال agar بكون solid فأنا بعمل للعينة spreading
على سطح ال agar ، طبعاً هاد الاختلاف
إي اختلاف طريقة ظهور ال Colony يؤدي

بـ بحطه بال agar قبل ما يصير له solidification و هو لسا Liquid وبخلطهم ، بعدين بعملهم Pouring (بصبهم) بال plate بعدها بعمل incubation و بستخلص بعدين ال Colony

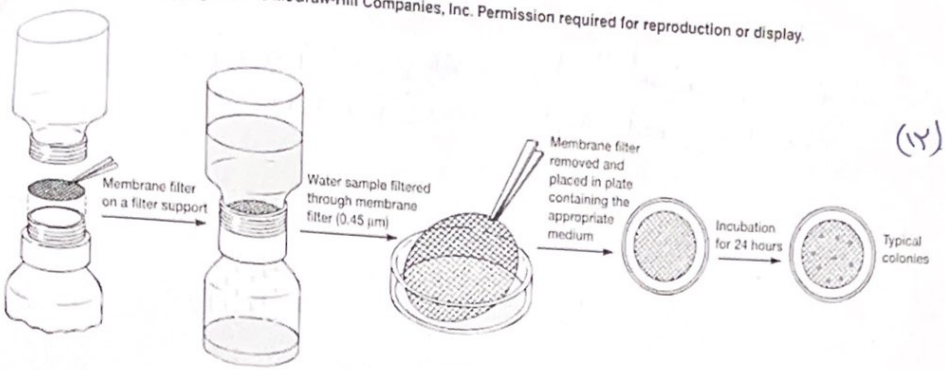
spread : تظهر على السطح
pour : جزء من ال Colony راح يكون عايش تحت مارح أقدر أشوفه
[طبعاً كل شي لازم يكون sterial بالطريقتين]

[إذاً العينة مازرعتها فوق سطح agar إنما خلطتها بال agar]

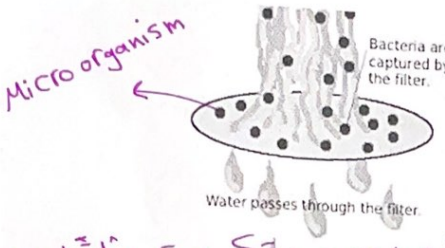
- Plating serial dilutions of the specimen
- **Pour plate method**
- **Spread plate method**



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



سلايد (١٢)



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

*① Membrane filter method :- بحتاجها لما يكون عندي عينة كبيرة، مثلاً لو بدي اشوف بال 100 ml قديه عنا M.O ما بقدر ازرع 100 mL على سطح agar

*② بجيب العينة يلي بدنا نفحصها مثلاً 100 mL of water بعملها filtration under vacuum through a sterile filter membrane

*③ شرط هاد ال membrane ال pour size تاعته تكون صغيرة 0.45 Mm or less، حتى لا يسمح للـ M.O انها تدخل بس الي لازم تخترق هاد الفلتر وبعدين باخذ هاد الفلتر بالملقط وبزرعه على agar plate وبعمل incubation وبشوف عدد ال M.O، وبعمل على سطحه ال M.O (هيك بكون طلعت قديه عندي M.O بهاي العينة الكبيرة يلي هي 100 mL of water)

Membrane filter method

- Advantages:
- For low bioburden material like Purified water EP → required to have no more than 100 CFU/ml
  (EP → Europen pharmaCopia)
- Can be used to determine concentration of organisms in oils or ointments (after dispersing it in oil)
- The best method if the sample is likely to contain antimicrobial chemicals (preservatives)

* low bioburden : عبئها الحيوي قليل جداً يعني كمية M.O قليلة بالتالي بحتاج عينة كبيرة ممثلة للـ sample حتى نقدر نكشف ال M.O

سلايد (14) (Membrane filter method)

* كمان ممكن استخدمها في حالة oils (طبعا هاد السائل عنده قدرة يمر من خلال filter)
- لو عندي مثلاً ointment solid بروح بذوبه بال oil بعدين بعمله filtration

* كمان بقدر أستفيد منها في حالة sample تاعتي بتحتوي على antimicrobial chemicals (preservative)، في حال كانت عينتي بتحتوي على preservative وحطيتها على سطح agar خلال فترة ال incubation راح يكون preservative شغّال عم يقتل M.O لذلك بالنهاية مارح يطلعلي total viable count الحقيقي لل M.O، membrane filter method تأثير preservative على العينة، كيف؟ لانه preservative ذائب في المي وراح ينزل من خلال الفتحات وبس راح يضل على ال membrane filter هو M.O فقط

* هذا لا يعني إذا استخدمت spread or pour method انو ما عندي طريقة اتخلص من تأثير المادة الحافظة، [inactivation: أثبط عمله مش لو موجود بالعينة]، بس بدك تكون عارف شو ال preservative الموجود مشان تقدر تختار inactivater المناسب

- طريقة أخرى لإزالة مفعول "antimicrobial chemical" نعرف نوعه ونحط عليه inactivator مناسب قبل ال bioburden test حتى نلغي مفعول المادة الحافظة

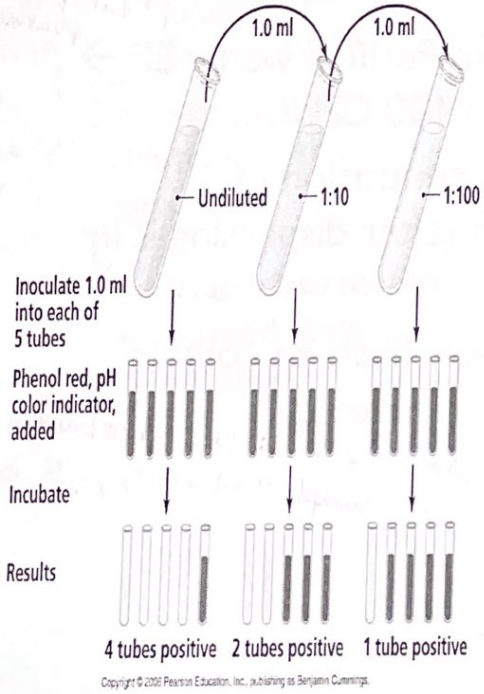
Antimicrobial agent	inactivator
Quaternary ammonium compounds, parabens and chlorhexidine	Lecithin with or without Polysorbate (Tween) 80
Thimerosal and other mercurials	Sodium thioglycolate
Beta-Lactam antibiotics	Beta-lactamase
Phenols, alcohols and weak acid preservatives	Dilution alone

حفظ

most probable number

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

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



INDIRECT MEASUREMENTS: MPN

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

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

Parungao-Balolong 2011

Thursday, July 14, 2011

سلايد (16)

* الطريقة الرابعة : most probable number (MPN)

مش دائماً بستخدمها ، بستخدمها في حالات قليلة لما تكون sample فيها مواد غير ذائبة ، مثلاً بودرة نباتية وبدنا نحدد viable count ← M.O الحية عنا، لما نخلطها باكس ما رح تذوب ولما أزرعها على plate برضو الأجزاء غير الذائبة راح تضل موجودة وراح تعيق عملية نمو البكتيريا + عملية counting ، بهاي الحالة بستخدم هاي الطريقة ، MPN تعتمد على statistic : عنا جداول إحصائية وهاي الجداول معمولة بأسلوب انه لو عملت expirement بناءً على combination المطلوب وطلعت النتيجة (x) فنشو ممكن يطلع عندي MPN of Colony بهاي ال sample

* indirect measurments ، الفرق يلي قبل بنعتبرهم direct measurment

* الخطوات :-

- باخذ العينات تاعتي سواء عملت إلهم dilution أو لا ، بزرع كل وحدة ب 5 test tubes ، كل tube يحتوي على broth + indicator (color) [ينمو البكتيريا تغيّر من ال PH] ، وبعمل incubation ثم بشوف النتائج

- Combination يلي طلع 4-2-1 ، بروح عالجدول وبشوف 421 بطلع ← 26 $\frac{MPN}{100\ mL}$ ← انتبهو عليها

عينة (١)	عينة (٢)	عينة (٢)
1 positive	2 positive	4 positive

* suspension مثلاً ممكن نستخدم هاي الطريقة ازا صبيات suspension بتعمل اعاقة القراءة

Calculation of concentration of MOs in a sample

Table 15.3 Specimen results from a viable count.

(بنعمل ٣ محاولات (بنعيد ٣ مرات))

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

[a]TNTC = too numerous to count

Viable count of original sample=

$$\frac{Mean\ colony\ count}{Volume\ of\ dilution\ used} \times dilution\ factor$$

Mean colony count ← بنعيد (٣) مرات وبناخد avg (إلهم للدقة)

$\left(\frac{85 + 79 + 81}{3}\right)$

Volume of dilution used ← 1mL

dilution factor: (10^4) → بناخد هاي for determination لانها المقبولة بـ ال USP Rang (25 - 250)

سلايد (18)

* حكينا انه الـ Bioburden ← number / type ، الفرق يلي قبل كانت لتحديد الـ number وهلأ بدنا نحدد type

Detection of objectionable MOs

سلايد ١٨

- Non sterile dosage forms may contain some MOs
- The quality of non sterile products is controlled by pharmacopeia in two ways:

1. Limit on total number or concentration of MO that may be present
2. Particular objectionable organisms must be absent in a specified weight of material:

e.g. EP quality gelatin→ Salmonella should be absent in a 10g sample and E.coli absent in 1 g sample

detection بنحكي بال non sterial لأنه sterial مش لازم يكون فيه ولا أي نوع M.O

Salmonella بدها حجم أكبر لأنه عددها قليل فبدي sample أكبر

E.coli سهل كشفها لانها منتشرة وممكن نلاقيها ب 1g

هم بحددوللي الوزن يلي لازم توفرها

*① منويش بجيب quality المطلوبة ؟ من pharmacopia بتعطيك limit for total number or concentration of M.O المسموح فيها

*② شو الي بحدد انا شو لازم افحص E.coli ولا Salmonella حسب شو origin تبع sample, مثلاً gelatin جاي من مصدر حيواني وهدول ممكن يكونوا gut of animal أو feces

③ بندرس يلي تكون محددة بالفارماكوبيا objectionable M.O كل gelatin فهنا ما بندرس Salmonella/E.coli ممكن يكون فيهم ولاد ينتقلو لل جايهم فهاد راح نغليهم ممكن يكون اختلط مع

Detection of objectionable MOs

1. Dissolution or dispersal of the sample in a suitable liquid culture medium and , where necessary, inactivation of any substances that might inhibit the growth of the organism under test
2. Enrichment: increasing the relative concentration of the test organism by growing in a liquid medium that inhibit other contaminants but allows free multiplication of the organism of interest
3. Streaking liquid cultures from step 2 onto **selective agar media** that usually permit easy recognition of any colonies of the test organism that might arise
4. The use of specific biochemical or immunological confirmatory tests (test kits)

سلايد (١٩)

* زي م حكينا عملية Counting إلها procedures معينة وهون بال detection برضو عنا طريقة عامة ، ① dissolution or dispersal : ممكن تذوب أو ما تذوب العينة (زي م قلنا أحيانا العينة بكون فيها preservative لازم نعمله inactivation)

② Enrichment : معناها تكثير أو زيادة ، ال Culture media تبعتي لازم تعزز نمو الخلية اللي بدي إياها وتثبط نمو اي شي آخر ممكن ينافس M.O (اللي بدي اياه) من العينة أو يقلل فرصة ظهورها ، وما بهمني العدد مثلاً

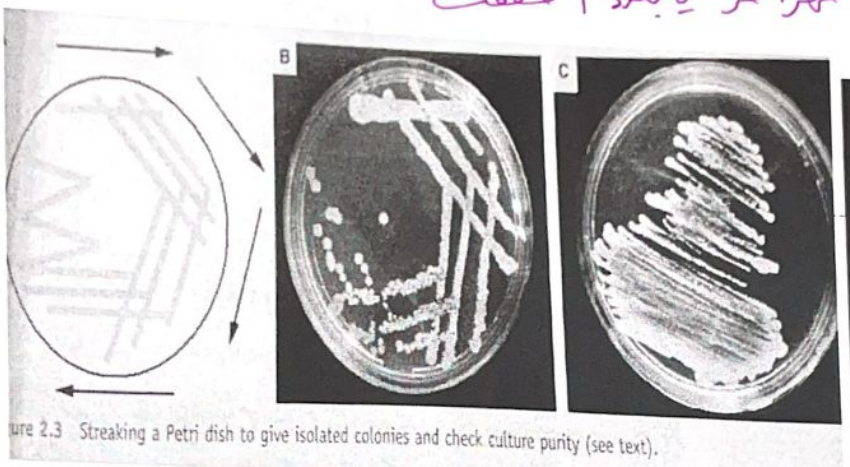
one salmonella Colony كافية إني أكنسل العينة

سلايد (١٩)

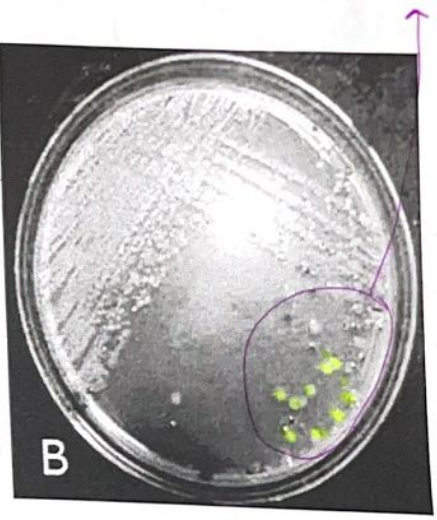
② streaking : selective agar media ، يعني مش اي agar plate ، انما selective one
بتعيّش M.O يلي بدي اياه وبتقلل من other M.O وكمان بتطلّع M.O يلي بدي اياه بلون معين واضح ، أحيانًا ممكن اشوف Colony وأوصل شاكّة بتعاملها specific test عشان نتأكد

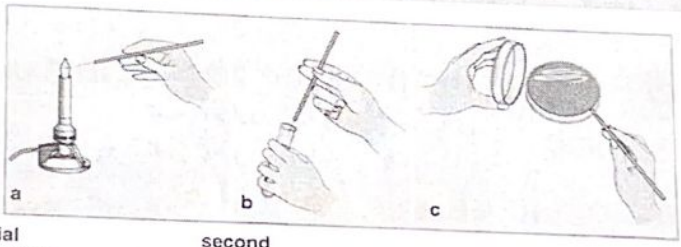
- الهدف منه إني أفصل ال Colony ، أول ما أعمل streaking بكون كميات كبيرة من Colony وبعدين زي كأني بسحب شوي وبعمل streaking زي كأني بخفف لأوصل لمرحلة انه عندي single Colony تكون واضحة بقدر أعرف أحددها شكلها ولونها عشان

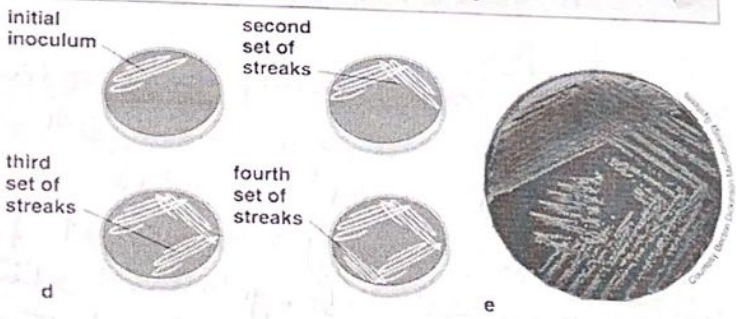
هاد الاشي يلي بدي أشوفه ، ظهر آخر شي بعدد م خففت

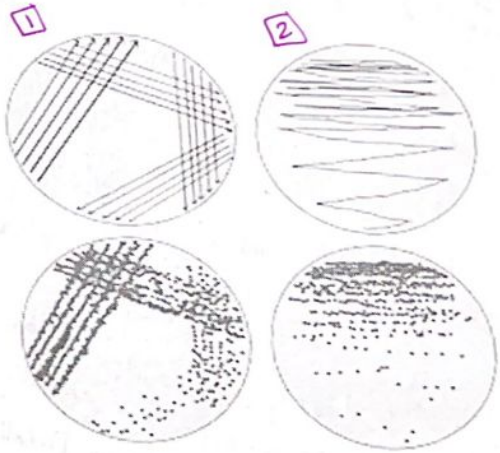


ure 2.3 Streaking a Petri dish to give isolated colonies and check culture purity (see text).





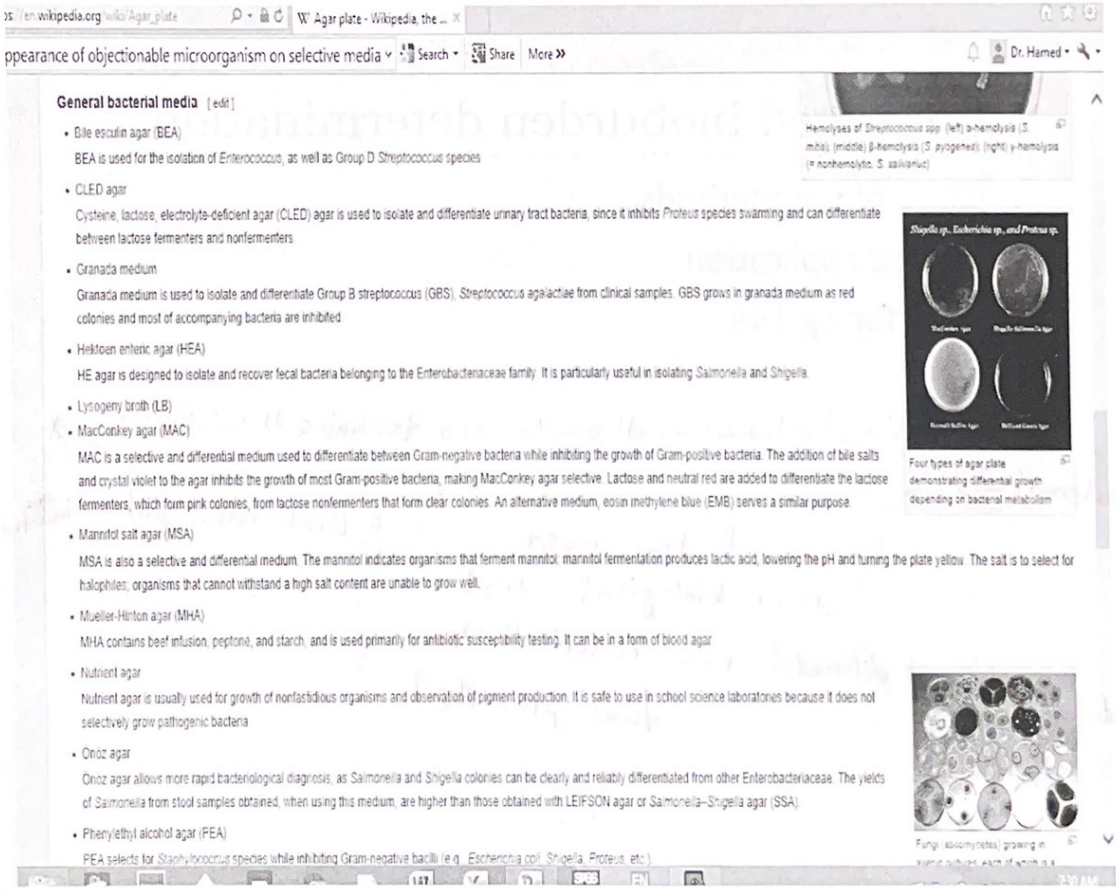




Detection of objectionable MOs

- Selective agar media recommended in the pharmacopeias:
  - MacConkey's agar for E. coli
  - XLD agar for Salmonella species
  - Mannitol salt agar for Staphylococcus aureus
  - Cetrimide agar for Pseudomonas aeruginosa

Students are required to read about each type of agar mentioned



Detection of objectionable MOs

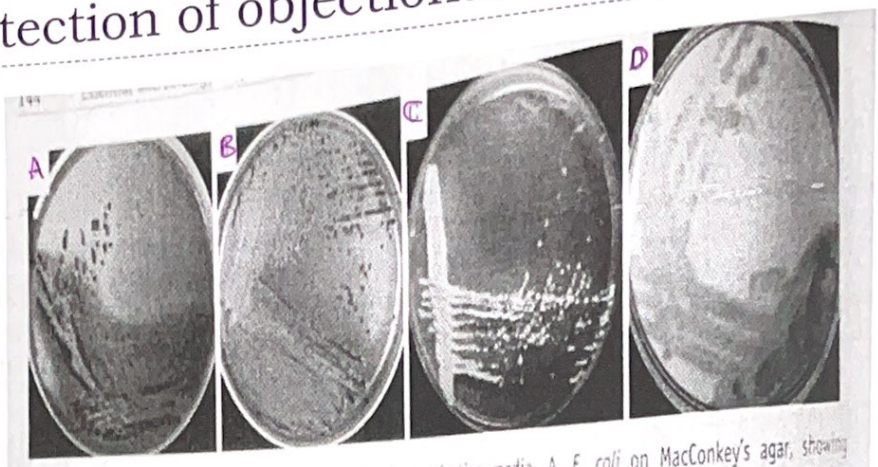


Figure 15.6 The appearance of 'objectionable organisms' on selective media. A. *E. coli* on MacConkey's agar, showing characteristic red colonies and precipitation of bile as a result of acid production; B. *Salmonella* species on XLD agar, showing alkali and hydrogen sulphide production indicated by pink agar and black precipitate in the colonies respectively; C. *Staphylococcus aureus* on mannitol salt agar showing yellow colonies that have produced acid as a result of mannitol fermentation; D. *Pseudomonas aeruginosa* on cetrimide agar, showing the characteristic green pigmentation.

* الصورة بتوضح كل agar عايش عليه بكتيريا معينة كيف بطلع اللون

Automated bioburden determinations

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

* زمان كانت ال technical ماي ماشيين ال بس هسا صار عنا أجهزة ,
(Automated)

* Bioburden determination : one of the most microbiological test

sample at different production stages أو raw material سواء لل أو final product

Bioburden specifications in the pharmacopeias

Table 15.4 Quality criteria for nonsterile medicines.

Route of administration[a]	Maximum total aerobic microbial count CFU/g or ml	Maximum total yeast and mould count CFU/g or ml	Specified microorganisms absent in 1 g or 1 ml
Nonaqueous oral products ← يجب ان لا تتجاوزها ي الارقام	10^3	10^2	Absence of *E. coli* ← ما بيصير تنقل على GI
Aqueous oral products	10^2	10^1	Absence of *E. coli*
Rectal products	10^3	10^2	
Oral mucosal, gingival, cutaneous, nasal and ear products	10^2	10^1	Absence of *Staph. aureus* and *Ps. aeruginosa*
Vaginal products	10^2	10^1	Absence of *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa* and *Candida albicans*
Inhalation products (excluding nebulized liquids)	10^2	10^1	Absence of *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa* and bile-tolerant Gram-negative bacteria

* بنلاحظ عدد M.O المسموح تواجدها بال aqueous أقل من ال non aqueous
لان الوسط ال aqeuous يسمح بنمو ال M.O بصورة أسرع وبالتالي راح تزيد
مع الزمن بشكل أكبر ← يؤدي إلى تلف المنتج ← عشان هيك بنحددها بعدد
أقل

Sara Jammain

Artery Academy