



مطالعه میکروارگانسیم‌های پاتوژن و پروبیوتیک در نمونه فرآورده‌های دارویی طب سنتی ایران

مریم صالحی^{الف}، زهره ابوالحسن زاده^ب، ابوذر کاظمی^ج، احمد غلامی^{ب*}، عبدالعلی محقق زاده^{الف.ب*}

^{الف} گروه داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
^ب مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
^ج گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: با گسترش روزافزون طب سنتی و متعاقب آن استفاده از داروهایی که فرآورده دارویی طب سنتی خوانده می‌شوند و همچنین افزایش مقبولیت این نوع از داروها در بین مردم، اهمیت بررسی ویژگی‌های کنترلی فرآیند ساخت این گونه داروها نمود بیشتری پیدا می‌کند. یکی از مسائل مهمی که از منظر تولید صنعتی داروها واجد اهمیت بسیار است، کنترل میکروبی است. تا کنون مطالعات کمی بر روی کنترل‌های این گونه فرآورده‌ها انجام شده است. این مطالعه با هدف بررسی محتوای میکروبی و همچنین محتوای پروبیوتیک فرآورده‌های ترکیبی سنتی ایران صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی که از اسفندماه ۱۳۹۶ تا مهرماه ۱۳۹۷ در شهر شیراز انجام شد، تعداد ۲۷ فرآورده مختلف به صورت تصادفی از سلامتکده طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد و محتوای کلی باکتری‌های هوازی زنده، وجودداشتن یا وجودنداشتن میکروارگانسیم‌های پاتوژن از جمله «استافیلوکوکوس ارئوس»، «شرشیا کلای»، «سودوموناس اثرورینوزا»، «سالمونلا»، «شیگلا» و تعداد کلی مخمرها و قارچ‌ها، طبق روش اعلام شده در فارماکوپه، با رقیق‌سازی متوالی نمونه‌ها و سپس کشت نمونه‌ها به روش پلیت گسترده در محیط کشت‌های مناسب و همچنین اعتبارسنجی روش کنترل میکروبی، بررسی شد. علاوه بر این وجود یا عدم وجود «لاکتوباسیلوس‌ها» نیز، به روش ذکر شده در بالا، بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج کشت‌های میکروبی حاکی از آن بود که تمام ۲۷ فرآورده تحت مطالعه، حداقل معیارهای مقبول محتوای میکروبی، از نظر فارماکوپه اروپا (۲۰۱۷) را دارا می‌باشند. همچنین ۶ مورد از فرآورده‌ها، به‌عنوان فرآورده‌های حاوی «لاکتوباسیلوس» شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، بر مبنای مطالعه حاضر، نبود آلودگی میکروبی فرآورده‌های سنتی سلامتکده طب سنتی شهر شیراز و انطباق آن با استانداردهای روز دنیا برای تولید صنعتی داروها نشان داده شد. حضور «لاکتوباسیلوس‌ها» در این فرآورده‌ها نشان داد که با مطالعات بیشتر در زمینه شناخت محتوای پروبیوتیکی ترکیبات فرآورده‌های سنتی و پتانسیل‌های آن‌ها، می‌توان از این ترکیبات به‌عنوان یک عامل مؤثر در تولید پروبیوتیک‌ها استفاده کرد و گام‌های بلندتری در جهت تولید محصولات فراسودمند جدید برداشت.

کلیدواژه‌ها: طب ایرانی، پروبیوتیک، فرآورده‌های دارویی سنتی، کنترل میکروبی

تاریخ دریافت: بهمن ۹۷
 تاریخ پذیرش: فروردین ۹۸

مقدمه:

ارزان و به راحتی در دسترس هستند (۲). داروهای گیاهی به صورت خام یا فرآوری شده از هر قسمت گیاه از جمله برگ، ساقه، گل، ریشه و دانه تولید می‌شود و در اغلب موارد ترکیبی پیچیده از مواد شیمیایی ارگانیک از منابع طبیعی است (۳). با گسترش روزافزون طب سنتی و متعاقب آن استفاده از داروهایی که فرآورده دارویی طب سنتی خوانده می‌شوند و همچنین افزایش مقبولیت این نوع داروها در بین مردم، اهمیت بررسی ویژگی‌های کنترلی فرآیند ساخت آن‌ها روزبه‌روز بیشتر

محبوبیت داروهای گیاهی در سال‌های اخیر تا حد زیادی افزایش یافته است به‌طوری که در حال حاضر حدود ۲۰ درصد از جمعیت جهان از داروهای گیاهی در فرم‌های مختلف و برای مقاصد گوناگون استفاده می‌کنند (۱). تخمین زده می‌شود که ۷۰ تا ۸۰ درصد جمعیت کشورهای در حال توسعه به نوعی از داروهای غیرمعارف که به‌طور عمده منشأ گیاهی دارند برای مراقبت‌های اولیه بهداشتی خود استفاده می‌کنند زیرا آن‌ها

مهاجم هستند به همان اندازه در معرض تهاجم میکروبی هستند که فرآورده‌هایی با اجزای مغذی‌تر مانند کرم‌ها، لوسیون‌ها، سوسپانسیون‌ها و شربت‌ها که حاوی کربوهیدرات‌ها، آمینو اسیدها و ویتامین‌ها.

کرم‌ها و پمادهای پوستی از محدودیت میکروبی برخوردارند و غالباً لازم است که پاک بوده نه اینکه استریل باشند. این اشکال دارویی حاوی مقدار زیادی مواد چربی هستند که میکروارگانسیم‌های مختلف نمی‌توانند به خوبی در آن رشد و تکثیر کنند ولی می‌توانند به مدت طولانی در داخل لایه‌ای از چربی که آن‌ها را می‌پوشاند زنده مانده و در موقع مناسب شروع به فعالیت کرده و اثرات زیان‌بخش خود را ظاهر سازند.

وجود آلودگی میکروبی در فرآورده‌های پوستی مخصوصاً برای بیماران با شرایط خاص خطرناک می‌باشد. هرچند که نبود میکروب‌های پاتوژن در این گونه فرآورده‌ها باید مورد توجه باشد ولی خطر میکروارگانسیم‌های فرصت طلب را نیز نباید نادیده گرفت. ارگانسیم‌های فرصت طلب می‌توانند در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی موجب بیماری شوند. به علت نفوذناپذیر بودن اپیدرم در افراد سالم، خطر ورود میکروارگانسیم‌ها از طریق پمادها به پوست کمتر است. این مطلب در مورد استافیلوکوک‌های طلائی بیماری‌زا که با استافیلوکوک‌های موجود در روی پوست رقابت می‌کنند نیز صادق است. با این حال در صورتی که خراش جزئی در پوست ایجاد شود و یا پوست ملتهب شده باشد اجرام میکروبی می‌توانند وارد بدن شوند. کرم‌ها و پمادهای آلوده می‌توانند سبب عفونی شدن پوست، بیماری‌های پوستی در بریدگی‌ها، سوختگی‌ها و سایر بیماری‌ها شوند.

معمولاً داروهای خوراکی حاوی مجموعه‌ای از میکروارگانسیم‌ها می‌باشند که برخی از آن‌ها پاتوژن نیستند و خطر ایجاد عفونت مربوط به بعضی دیگر از آن‌ها می‌باشد. شربت‌ها که از پرمصرف‌ترین اشکال دارویی خوراکی می‌باشند به علت داشتن زیادی آب، شکر و دیگر عوامل موجود در فرمولاسیون، اغلب، محیط‌های مناسبی برای تغذیه و رشد میکروارگانسیم‌ها هستند. به این جهت شربت‌ها بیشتر از

نمود پیدا می‌کند. یکی از مسائل مهمی که از منظر تولید صنعتی داروها واجد اهمیت بسیار است، کنترل میکروبی است. تا کنون مطالعات کمی بر روی کنترل‌های این‌گونه فرآورده‌ها انجام شده است و مطالعات پیشین حاکی از آن است که مقادیری از آلودگی میکروبی و آلی در فرآورده‌های گیاهی وجود دارد (۴). مسلماً علاوه بر اینکه این موضوع سبب سلب اطمینان مصرف کننده از این گونه فرآورده‌ها می‌شود، سلامت آن‌ها را نیز به خطر می‌اندازد و همچنین می‌تواند ویژگی‌های ظاهری دارو از جمله ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی امولسیون‌ها و کرم‌ها و شربت‌ها را تغییر داده، باعث ایجاد کدورت در دارو و همچنین تغییر در بو و رنگ آن شود. توجه به این آلودگی‌ها در مورد بیماران با نقص سیستم ایمنی، کودکان و افراد مسن از اهمیت بیشتری برخوردار است (۴). به‌نظر می‌رسد پژوهش‌هایی لازم است تا اولاً با توجه به بومی بودن این در کشور، استانداردهایی ویژه این گونه فرآورده‌ها تنظیم شود، ثانیاً فرآورده‌هایی که آلودگی بالایی دارند شناسایی شده و ثالثاً شرایط مناسب برای تهیه این فرآورده‌ها به گونه‌ای فراهم شود که امکان آلوده شدن تا حد استاندارد کاهش یابد. چیزی که در این میان دارای اهمیت زیادی است، بررسی فرآورده‌های خوراکی از نظر وجود باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد (۵-۷).

طب سنتی ایران شامل مجموعه‌ای از علم و دانش است که در تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود و ریشه آن به هشت هزار سال قبل از میلاد برمی‌گردد (۸). در منابع طب و داروسازی سنتی ایران علاوه بر داروهای مفرد (یک تک داروی طبیعی یا یک گیاه دارویی)، داروهای مرکب (ترکیب چند دارو در قالب یک شکل دارویی) نیز به‌طور فراوان جهت درمان بیماری‌های مختلف توسط طبیبان و درمان‌گران طب سنتی تجویز می‌شود (۹). اشکال دارویی حاضر در طب سنتی ایران بسیار متنوع و بالغ بر ۲۰۰ نوع می‌باشد (۱۰).

همه اشکال فرآورده‌های دارویی مستعد آلودگی توسط تعداد زیادی از میکروارگانسیم‌های مختلف می‌باشند. ضدعفونی‌کننده‌ها، آنتی‌سپتیک‌ها، پودرها، قرص‌ها و سایر فرآورده‌هایی که یک محیط نامناسب برای آلوده‌کننده‌های

اطلاع‌رسانی داروهای سنتی تحت نظر گروه داروسازی سنتی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تولید شده بود و در سلامت‌کده طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شیراز عرضه می‌شد، به صورت تصادفی به روش نمونه‌گیری طبقه‌ای (Stratified Sampling) براساس شکل دارویی انتخاب و خریداری شدند و از نظر محتوای میکروبی و محتوای «لاکتوباسیلوس‌ها» به‌عنوان شاخصی برای محتوای پروبیوتیکی بررسی شدند.

نمونه‌های مطالعه شده

دسته‌بندی ۲۷ فرآورده طب سنتی ایران که در این مطالعه بررسی شد بر طبق معیار فارماکوپه اروپا به شرح زیر می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱. فرآورده‌های تحت آزمایش در این مطالعه

فرآورده‌هایی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل میکروارگانیسم‌ها را به مقدار مناسبی کاهش دهد، نباشد	فرآورده‌هایی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل می‌باشد که میکروارگانیسم‌ها را کاهش می‌دهد	فرآورده‌هایی که قبل از استفاده به آن‌ها آب جوش اضافه می‌شود
اטרپفل گشنیزی	شربت مفرح گاو زبانی	پودر منضج سودا
اטרپفل صغیر	شربت مفرح سیبی	پودر قابض
جوارش خوزی	شربت بادرنجبویه	پودر صداع
جوارش کمونی	شربت اسطوخودوس	پودر زکام
جوارش مصطکی	روغن بابونه	پودر دیابت
دواء البلغم	مربای آمله	
پودر لاهوری	جوارش آمله	
حب فرزانه		
کپسول کبدی		
کپسول بواسیر		
کپسول رها		
کپسول ایارج فیقرا		
کپسول خبث حدید		
روغن گل محمدی		
روغن بنفشه بادام		

فرآورده‌های دیگر مورد تهاجم میکروبی قرار می‌گیرند. این در حالی است که اکثر مصرف‌کنندگان شربت‌ها را سالمندان و کودکان و آن‌هایی که قدرت بلع فرآورده‌های جامد را ندارند تشکیل می‌دهند که عموماً از نظر قدرت دفاعی و سیستم ایمنی بدن وضعیت مطلوبی ندارند و وجود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌تواند به راحتی سبب بیماری ثانویه در این افراد شود.

نتیجه استفاده از فرآورده آلوده ممکن است از یک بیمار تا بیمار دیگر فرق کند که بستگی به نوع، درجه آلودگی و چگونگی مصرف فرآورده دارد (۴-۷).

پروبیوتیک‌ها، مکمل‌های غذایی حاوی باکتری‌های غیرپاتوژن، مفید و کمک‌کننده به رشد موجودات هستند که عموماً قابلیت این را دارند که جلوی رشد باکتری‌های پاتوژن را بگیرند. تعریف عمومی و پذیرفتنی برای پروبیوتیک عبارت است از: محصولی متشکل از میزان مناسب میکروارگانیسم زنده و مشخص، به طوری که بتواند با جایگزینی یا کلونیزه شدن در قسمتی از دستگاه گوارش میزبان، میکروفلور را تغییر دهد و بدین وسیله اثرات درمانی مناسب را در میزبان ایجاد کند. مهم‌ترین دسته باکتری‌های پروبیوتیک، «لاکتوباسیلوس‌ها (*Lactobacillus*)» و «بیفیدوباکتریوم‌ها (*Bifidobacterium*)» هستند که به میزان زیاد در محصولات لبنی و تخمیری خوراکی وجود دارد. امکان وجود باکتری‌های پروبیوتیک در غذاهای تخمیری زیاد است و با توجه به مصرف طولانی مدت فرآورده‌های دارویی سنتی، امکان اینکه بتوان میکروارگانیسم پروبیوتیکی که ویژگی‌های منحصر به فردی داشته باشد را یافت، زیاد است. اطلاعات اندکی در مورد تخمیری بودن و محتوای پروبیوتیک داروهای سنتی در دسترس است (۱۱).

مواد و روش‌ها:

این مطالعه یک مطالعه مقطعی است که از اسفندماه ۱۳۹۶ آغاز شده و تا مهرماه ۱۳۹۷ در شهر شیراز-ایران انجام یافته است و در آن تعداد ۲۷ فرآورده از فرآورده‌های طب سنتی ایران که در مرکز ساخت و

معیارهای مقبول محتوای میکروبی فرآورده‌های گیاهی

فارماکوپه اروپا معیارهای مقبول برای فرآورده‌های گیاهی را بر مبنای تعداد کلی باکتری‌های هوازی (TAMC) و همچنین تعداد کلی مخمرها و قارچ‌ها (TYMC) پایه‌ریزی کرده است. این فارماکوپه برای تعریف معیارهای مقبول، فرآورده‌های گیاهی را به سه دسته تقسیم کرده است:

الف. فرآورده‌هایی که قبل از استفاده باید به آن‌ها آب جوش اضافه شود.
ب. فرآورده‌های گیاهی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل باشد که میکروارگانیسم‌ها را کاهش دهد.
ج. فرآورده‌های گیاهی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل نباشد که میکروارگانیسم‌ها را به مقدار مناسبی کاهش دهد. معیارهای پذیرفتنی برای هر دسته در جداول ۲، ۳ و ۴ آورده شده است.

جدول ۲. معیارهای پذیرفتنی محتوای میکروبی فرآورده‌های گیاهی که قبل از مصرف جوشیده می‌شوند (۱۲)

TAMC*	معیار پذیرش: 10^7 CFU/g حداکثر تعداد مقبول: 5×10^7 CFU/g
TYMC**	معیار پذیرش: 10^5 CFU/g حداکثر تعداد مقبول: 5×10^5 CFU/g
<i>Escherichia coli</i>	معیار پذیرش: 10^3 CFU/g
<i>Salmonella</i>	حضور نداشتن در ۲۵ گرم از نمونه

*TAMC: total aerobic microbial count

**TYMC: total yeast/moulds count

جدول ۳. معیارهای پذیرفتنی محتوای میکروبی فرآورده‌های گیاهی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل می‌باشد که میکروارگانیسم‌ها را کاهش می‌دهد (۱۲).

TAMC*	معیار پذیرش: 10^4 CFU/g یا CFU/mL حداکثر تعداد مقبول: 5×10^4 CFU/g یا CFU/mL
TYMC**	معیار پذیرش: 10^2 CFU/g یا CFU/mL حداکثر تعداد مقبول: 5×10^2 CFU/g یا CFU/mL
Enterobacteriaceae	معیار پذیرش: 10^2 CFU/g یا CFU/mL
<i>Escherichia coli</i>	حضور نداشتن در ۱ گرم یا ۱ میلی‌لیتر از نمونه
<i>Salmonella</i>	حضور نداشتن در ۲۵ گرم از نمونه

*TAMC: total aerobic microbial count

**TYMC: total yeast/moulds count

جدول ۴. فرآورده‌های گیاهی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل نباشد که میکروارگانیسم‌ها را به مقدار مناسبی کاهش دهد (۱۲).

TAMC*	معیار پذیرش: 10^5 CFU/g یا CFU/mL حداکثر تعداد مقبول: 5×10^5 CFU/g یا CFU/mL
TYMC**	معیار پذیرش: 10^4 CFU/g یا CFU/mL حداکثر تعداد مقبول: 5×10^4 CFU/g یا CFU/mL
Enterobacteriaceae	معیار پذیرش: 10^4 CFU/g یا CFU/mL
<i>Escherichia coli</i>	حضور نداشتن در ۱ گرم یا ۱ میلی‌لیتر از نمونه
<i>Salmonella</i>	حضور نداشتن در ۲۵ گرم از نمونه

*TAMC: total aerobic microbial count

**TYMC: total yeast/moulds count

محلول‌های حاوی «اشرشیاکلا» و «استافیلوکوکوس ارئوس» با غلظت 10^8 CFU/mL، به صورت جداگانه، به ۱ گرم یا ۱ میلی‌لیتر از نمونه تحت آزمایش اضافه شد. برای آماده کردن نمونه‌های کنترل مثبت، مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از محلول‌های حاوی میکروارگانیسم، به صورت جداگانه، به ۱ میلی‌لیتر از نرمال سالین استریل اضافه شد. همچنین مخلوط ۱ میلی‌لیتر از نرمال سالین استریل با ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت استریل BHI به عنوان نمونه کنترل منفی تهیه شد.

کلیه نمونه‌های تهیه شده اعم از نمونه‌های تحت آزمایش و نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

پس از گذشت این زمان، همه نمونه‌ها تا ۱۰ برابر با نرمال سالین استریل و به روش رقیق‌سازی متوالی، رقیق شدند، سپس همه رقت‌ها از همه نمونه‌ها، در محیط کشت نوترینت آگار استریل کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس تعداد کلونی‌های رشد یافته در همه پلیت‌ها شمرده شدند.

معیار قبولی تست این است که تعداد متوسط کلونی‌هایی که در نمونه تحت آزمایش به دست آمدند (CFU) کمتر از ۵۰ درصد نمونه کنترل نباشد. مقبول بودن تعداد ارگانیسم‌های به دست آمده تأیید می‌کند که روشی که جهت ارزیابی محدودیت میکروبی انتخاب شده روش مناسبی است. در صورتی که کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها بیش از ۵۰ درصد باشد، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب دارویی دارای فعالیت ضد میکروبی است و بنابراین روش استفاده شده برای مطالعه آلودگی میکروبی مناسب نیست. برای چنین ترکیباتی می‌بایست از روش‌های جایگزین بهره برد. در روش اصلاح شده به کار رفته، برای خنثی‌سازی عوامل ضد میکروبی، سرپالی از رقت‌های مختلف

– مواد استفاده شده

Nutrient agar, MacConkey agar, Baird-parker agar, Pseudomonas-agar F, NaCl, MRS-A agar, Tetrionate Broth, EMB agar, Brilliant green agar, DMSO, Egg yolk, BHI Broth

– آماده‌سازی نمونه‌های دارویی

نمونه‌های تازه ساخته شده توسط سلامت‌کده طب سنتی شهر شیراز به صورت تصادفی تهیه شدند و هر نمونه براساس فارماکوپه و با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی محصول تحت آزمایش آماده‌سازی شد. بدین صورت که سطوح بیرونی همه ظروف با اتانول ۷۰ درصد حجمی-حجمی قبل از باز کردن درب ظرف استریل شدند.

به‌طور کلی، حداقل ۱ گرم (جامد یا نیمه جامد) یا ۱ میلی‌لیتر (مایعات) از نمونه‌ها آزمایش شدند و هر یک از محصولات دارویی در نرمال سالین استریل با نسبت ۱:۱۰ رقیق شدند. در خصوص نمونه‌های روغنی، از مقدار مناسبی از DMSO استریل استفاده شد.

کلیه آزمایش‌ها برای هر نمونه دو بار تکرار شدند.

– اعتبارسنجی روش

اعتبار روش «بررسی محدودیت میکروبی» را زمانی می‌توان تأیید کرد که ثابت شود محصول تحت آزمایش خودش رشد و تکثیر میکروارگانیسم آزمایشی را تحت تأثیر قرار ندهد. از این رو دو میکروارگانیسم استاندارد «اشرشیا کلا» (ATCC15224) و «استافیلوکوکوس ارئوس» (ATCC29737) تحت ارزیابی تناسب روش قرار داده شد.

به این صورت که ابتدا میکروارگانیسم‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار (BHI) و در انکوباتور با دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

برای تهیه نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، رشدیافتن یا رشدنیافتن کلونی در پلیت‌ها مشاهده شد.

برای شناسایی «اشرشیاکلای» در مواردی که کلونی‌های «انتروباکتریاسه» با رنگ قرمز-آجری در محیط کشت مک‌کانکی رشد کرده بودند و در آزمایش گرم، میله‌های منفی را نشان دادند، هر یک از کلونی‌های مشکوک به سطح محیط ائوزین متیلن بلو آگار (EMB Agar) منتقل شد و در انکوباتور قرار داده شد. بعد از این زمان، چنانچه هیچ یک از کلونی‌های رشد یافته، دارای درخشش فلزی در تحت نور انعکاسی و رنگ آبی-سیاه در تحت نور انتقالی نبودند، نمونه‌عاری از «اشرشیا کلای» گزارش شد.

برای شناسایی «سالمونلا» مقدار ۲۵ گرم از نمونه جامد یا ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه مایع در نرمال سالین استریل به نسبت ۱:۱۰ رقیق‌سازی شد و سپس نمونه رقیق‌سازی شده، تحت شرایط استریل به محیط کشت مایع تتراتیونات (Tetrathionate Broth) اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون به پلیت منتقل شد و محیط کشت برلیانت گرین آگار (Brilliant green Agar) به آن اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، رشد یا رشد نیافتن کلونی در پلیت‌ها مشاهده شد.

لازم به ذکر است که کلونی‌های «سالمونلا» در محیط کشت برلیانت گرین آگار کوچک، شفاف و بی‌رنگ یا صورتی تا سفید کدر (که غالباً به وسیله‌هاله صورتی تا قرمز احاطه شده است) می‌باشند.

- جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها

کلیه نمونه‌ها به روش فارماکوپه و تحت اصول انجام آزمایشات کنترل میکروبی آماده‌سازی شدند. بدین صورت که مقدار ۱ گرم از نمونه جامد یا ۱ میلی‌لیتر از نمونه مایع در نرمال سالین استریل به نسبت ۱:۱۰ رقیق‌سازی شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه رقیق‌سازی شده، تحت شرایط استریل به پلیت منتقل شد و محیط کشت MRS (de MAN, ROGOSA and SHARPE) به آن اضافه شد.

فرآورده در نرمال سالین تهیه شد و از آن جهت شمارش کلی باکتری‌های هوازی زنده استفاده شد. در رقت‌های سریالی تهیه شده، غلظت دارو بیشتر از یک گرم در میلی‌لیتر نشد.

- آزمون شمارش میکروبی: تعداد کلی باکتری‌های

هوازی زنده

آزمایش‌های شمارش میکروبی با توجه به فارماکوپه اروپا و با استفاده از تکنیک پلیت گسترده و نمونه‌های رقیق شده انجام شد.

نمونه‌ها به پلیت‌هایی حاوی نوترینت آگار (Nutrient Agar) که برای رشد باکتری هوازی زنده مناسب است و پلیت‌هایی حاوی یست اکسترکت گلوگز کلرامفنیکل آگار (YGC Agar) که برای کشت قارچ‌ها و مخمرها مناسب است، انتقال داده شدند.

برای هر نمونه در هر محیط کشت ۵ پلیت در رقت‌های مختلف کشت داده شد.

برای نمونه‌های حاوی اثر ضد میکروبی از روش‌های حذف اثر، همان‌گونه که در قسمت اعتبارسنجی روش گفته شد، قبل از کشت نمونه استفاده شد.

در پایان دوره انکوباسیون، تعداد کلونی‌های رشد یافته در هر پلیت شمارش شد (CFU/mL, CFU/g) و در ضریب رقت ضرب شد و میانگین تعداد کلونی‌های پلیت‌ها در دو تکرار آزمایش‌ها در نظر گرفته شد.

- جداسازی گونه‌های باکتری‌های آلوده‌کننده

کلیه نمونه‌ها به روش فارماکوپه و تحت اصول انجام آزمایشات کنترل میکروبی (GMP) آماده‌سازی شدند. بدین صورت که مقدار ۱ گرم از نمونه جامد یا ۱ میلی‌لیتر از نمونه مایع در نرمال سالین استریل به نسبت ۱:۱۰ رقیق‌سازی شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه رقیق‌سازی شده، تحت شرایط استریل به پلیت منتقل شد. برای شناسایی «سودوموناس ائروژینوزا»، محیط کشت ستریماید آگار (Cetrimide Agar) و برای شناسایی «انتروباکتریاسه»، محیط کشت مک‌کانکی آگار (Macconkey Agar) به پلیت اضافه شد.

فارماکوپه اروپا ۲۰۱۷ در جداول ۵، ۶ و ۷ آورده شده است. همچنین در مطالعه حاضر فرآورده‌های اطریفل صغیر، اطریفل گشنیزی، جوارش کمونی، کپسول رها، کپسول بواسیر و کپسول ابارج فیکرا به‌عنوان فرآورده‌های حاوی «لاکتوباسیلوس» شناسایی شدند.

پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط و در محفظه غنی از دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. پس از گذشت زمان لازم، رشد یا عدم رشد کلونی در پلیت‌ها مشاهده شد.

یافته‌ها:

نتایج شمارش تعداد کلی باکتری‌های زنده و تعداد کلی قارچ‌ها و مخمرهای فرآورده‌ها، به تفکیک دسته‌بندی موردنظر

جدول ۵. نتایج آزمایش‌های کنترل میکروبی فرآورده‌های گیاهی که قبل از مصرف جوشیده می‌شوند*

نام فرآورده	TAMC	TYMC	Salmonella	Escherichia coli
پودر منضج سودا	8×10^6	9×10^4	-	-
پودر قابض	4×10^4	5×10^3	-	-
پودر صداع	$1/5 \times 10^4$	$1/3 \times 10^2$	-	-
پودر زکام	3×10^4	$2/7 \times 10^2$	-	-
پودر دیابت	1×10^5	$1/6 \times 10^2$	-	-

TAMC شمارش کلی باکتری‌های هوازی زنده - TYMC شمارش کلی مخمرها و قارچ‌ها
*براساس CFU/mL یا CFU/g

جدول ۶. نتایج آزمایش‌های کنترل میکروبی فرآورده‌های گیاهی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل می‌باشد که میکروارگانیسم‌ها را کاهش می‌دهد*

نام فرآورده	TAMC	TYMC	Salmonella	Escherichia coli	Enterobacteriaceae
شربت مفرح گاو زبانی	2×10^4	-	-	-	-
شربت مفرح سیبی	1×10^4	-	-	-	-
شربت بادرنجبویه	1×10^3	۱۰	-	-	۷
شربت اسطوخدوس	4×10^3	-	-	-	-
روغن بابونه	$4/1 \times 10^3$	-	-	-	-
جوارش آمله	$1/5 \times 10^4$	3×10^2	-	-	۱۰
مربای آمله	3×10^2	-	-	-	-

TAMC شمارش کلی باکتری‌های هوازی زنده - TYMC شمارش کلی مخمرها و قارچ‌ها
*براساس CFU/mL یا CFU/g

جدول ۷. نتایج آزمایش‌های کنترل میکروبی فرآورده‌های گیاهی که فرآیند تولید آن‌ها شامل مراحل نباشد که میکروارگانیسم‌ها را به مقدار مناسبی کاهش دهد.*

نام فرآورده	TAMC	TYMC	<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
اطریفل گشنیزی	3×10^5	$3/2 \times 10^2$	-	-	۸۰
اطریفل صغیر	1×10^4	4×10^2	-	-	-
جوارش خوزی	$1/3 \times 10^3$	-	-	-	-
جوارش کمونی	1×10^5	$3/2 \times 10^2$	-	-	-
جوارش مصطکی	$1/75 \times 10^2$	-	-	-	-
دواء البلغم	$2/5 \times 10^3$	-	-	-	-
کیسول حب فرزانه	1×10^5	$2/5 \times 10^2$	-	-	-
پودر لاهوری	3×10^3	-	-	-	-
کیسول کبدی	3×10^4	۷	-	-	۲۰
کیسول بواسیر	4×10^3	$3/2 \times 10^2$	-	-	۱۰
کیسول رها	1×10^5	$1/4 \times 10^3$	-	-	10^2
کیسول ایارج فیکرا	-	10^3	-	-	-
کیسول خبث الحديد	4×10^4	2×10^2	-	-	-
روغن گل محمدی	-	-	-	-	-
روغن بنفشه بادام	-	-	-	-	-

TAMC شمارش کلی باکتری‌های هوازی زنده - TYMC شمارش کلی مخمرها و قارچها
* براساس CFU/mL یا CFU/g

بحث و نتیجه‌گیری:

در اکثر مطالعاتی که در رابطه بررسی محتوای میکروبی داروهای گیاهی و سنتی صورت گرفته است، همانند مطالعه والتر و همکاران در سال ۲۰۱۶، نتیجه نهایی وجود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را نشان می‌دهد (۲). مطالعه حاضر بر روی داروهای ترکیبی سنتی ایران، که در دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شده بود، صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار کلی باکتری‌های هوازی زنده و مقدار کلی قارچ‌ها و مخمرها در این فرآورده‌ها از حد مجاز فارماکوپه اروپا، که در بخش ۳-۱ بیان شد، فراتر نمی‌رود و هیچ‌کدام از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای اشاره شده در این فارماکوپه در آن‌ها وجود ندارد. مطالعه تینگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی فرآورده‌های طب سنتی چین، نتیجه‌ای نزدیک‌تر به مطالعه حاضر دارد و نشان می‌دهد که این فرآورده‌ها اگرچه حاوی مقداری از آلودگی میکروبی هستند، اما به دلیل

فرآیندهایی که روی آن‌ها انجام می‌شود، مثل جوشاندن قبل از استفاده، می‌توان گفت که این فرآورده‌ها امن و کاربردی هستند (۱۳).

توجه به این نکته ضروری به‌نظر می‌رسد که در این فرآورده‌ها از هیچ‌گونه مواد نگهدارنده و همچنین عصاره‌های الکلی استفاده نشده است و اکثریت این فرآورده‌ها اجزایی دارند که طبق دستورالعمل تولید، نباید شسته شوند زیرا یا اثر دارویی خود را از دست می‌دهند یا خاصیتی پیدا می‌کنند که دیگر در فرآورده نمی‌توان استفاده کرد. با توجه به این موضوع به‌نظر می‌رسد که فقدان میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در این فرآورده‌ها مؤید این ادعا است که تهیه مواد اولیه و روش ساخت این فرآورده‌ها بر طبق اصول ساخت استاندارد بوده است.

با بررسی نتایج این مطالعه و مرور مقالات گذشته، به‌نظر می‌رسد اگر چه معمولاً آلودگی میکروبی در گیاهان خام

گذشت این مدت زمان به دست می‌آیند. شاید یکی از دلایل این امر ایجاد تخمیر و رشد پروبیوتیک‌ها در این ترکیبات باشد. از جوارش‌ها و اطریف‌ها در طب سنتی برای مشکلات گوارشی استفاده می‌شود (۱۰، ۱۶، ۱۷) و شاید این مسأله بتواند به دلیل وجود میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در این فرآورده‌ها باشد (۱۸).

در صورت اثبات این امر، اثر بخشی داروهای سنتی ایران بیش از پیش تأیید شده است و باب جدیدی در تولید صنعتی و جهانی کردن این فرآورده‌ها می‌گشاید و از آن جایی که این نوع باکتری‌ها بیشتر در محصولات لبنی یافت می‌شود، عرضه کردن محصولات فراسودمند گیاهی می‌تواند برای بسیاری از افراد از جمله گیاه‌خواران و کسانی که به محصولات لبنی حساسیت دارند کارگشا باشد.

تشکر و قدردانی:

ضمن تشکر از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز اعلام می‌دارد این مقاله برگرفته از بخشی از پایان‌نامه دکترای عمومی خانم مریم صالحی است و با شماره طرح ۱۶۲۵۳ ثبت شده است.

استفاده شده در تهیه داروهای ترکیبی سنتی وجود دارد (۱۴)، اما وجود و میزان آن احتمالاً به نحوه کاشت، داشت و برداشت گیاه و همچنین نحوه خشک کردن و نگهداری و توزیع آن مرتبط است (۱۵) و می‌توان با رعایت اصول تولید، داروهای ترکیبی سنتی با میزان آلودگی اندک و ایمن برای سلامت مصرف کننده تولید کرد.

یکی دیگر از اهداف این مطالعه، جست‌وجوی «لاکتوباسیلوس‌ها» در فرآورده‌های ترکیبی سنتی ایران بود. امکان وجود باکتری‌های پروبیوتیک در غذاهای تخمیری زیاد است و با توجه به «زمان ادراک» برخی فرآورده‌های دارویی سنتی، به نظر می‌رسد بتوان میکروارگانیسم پروبیوتیکی را در آن‌ها جستجو کرد. از این رو بر آن شدیم تا در مطالعه‌ای هر چند مقدماتی، وجود داشتن یا وجود نداشتن «لاکتوباسیلوس‌ها» را در فرآورده‌های ترکیبی سنتی ایران بررسی کنیم. در طب سنتی ایران فرآورده‌هایی از جمله اطریف‌ل صغیر و اطریف‌ل گشنیزی برای به دست آوردن خاصیت مورد نظر، باید زمان حدود چهل روزه را پس از ساخت طی کنند که به این زمان، «زمان ادراک» گفته می‌شود. در متون طب سنتی عقیده بر این است که خواص دارویی این فرآورده‌ها پس از

References:

1. Zamir R, Hosen A, Ullah MO, Nahar N. Microbial and heavy metal contaminant of antidiabetic herbal preparations formulated in Bangladesh. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;Oct 26(243593):1-9.
2. Walther C, Marwa KJ, Seni J, Hamis P, Silago V, Mshana SE, et al. Microbial contamination of traditional liquid herbal medicinal products marketed in Mwanza city: magnitude and risk factors. *Pan African Medical Journal*. 2016 Mar 1;23(1):65-73.
3. Sofowora A. Research on medicinal plants and traditional medicine in Africa. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 1996 Fall;2(3):365-72.
4. Gad GFM, Aly RAI, Ashour MSE-d. Microbial evaluation of some non-sterile pharmaceutical preparations commonly used in the Egyptian market. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2011 Aug;10(4):437-45.
5. El-Housseiny R, Aboulwafa M, Aboulwafa EW, Hassouna N. Recovery and detection of microbial contaminants in some non-sterile pharmaceutical products. *Archives of Clinical Microbiology*. 2013 Jun 1;4(6):736-42.
6. Adeleye I, Okogi G, Ojo E. Microbial contamination of herbal preparations in Lagos, Nigeria. *Journal of Health, Population and Nutrition (JHPN)*. 2011 Feb 15;23(3):296-7.
7. Bent S. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation. *Journal of General Internal Medicine*. 2008 Jun;23(6):854-9.
8. Rezaeizadeh H, Alizadeh M, Naseri M, Ardakani M. The Traditional Iranian Medicine Point of View on Health and Diseases. *Iranian Journal of Public Health*. 2009 Mar;38(Suppl. 1):169-72.
9. Hamedi A, Zarshenas MM, Sohrabpour M, Zargaran A. Herbal medicinal oils in traditional Persian medicine. *Pharmaceutical Biology*. 2013 Sep;51(9):1208-18.
10. Zargaran A, Zarshenas M, Hosseinkhani A, Mehdizadeh A. Jawarish, a Persian traditional gastrointestinal dosage form. *Pharmaceutical Historian*. 2012 Jun;42(2):24-5.
11. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, Haller D, Herz U, Kalliomaki M, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *The Journal of Nutrition*. 2010 Mar;140(3):671S-6S.
12. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, *European Pharmacopoeia*. 9th edition (9.0) ed. Ligugé: Aubin 2017.
13. Ting A, Chow Y, Tan W. Microbial and heavy metal contamination in commonly consumed traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2013 Feb;33(1):119-24.
14. Becker B, Stoll D, Schulz P, Kulling S, Huch M. Microbial Contamination of Organically and Conventionally Produced Fresh Vegetable Salads and Herbs from Retail Markets in Southwest Germany. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2019 Jan 10;16(4):269-75.
15. Sagoo S, Little C, Greenwood M, Mithani V, Grant K, McLauchlin J, et al. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology*. 2009 Feb;26(1):39-43.
16. Mahmoudpour Z, Shirafkan H, Mojahedi M, Gorji N, Mozaffarpur SA. Digesters in traditional Persian medicine. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2018 Winter;9(1):1-6.
17. Tarasiuk A, Mosińska P, Fichna J. Triphala: current applications and new perspectives on the treatment of functional gastrointestinal disorders. *Chinese Medicine*. 2018 Jul 18;13(1):39.
18. Westfall S, Lomis N, Prakash S. A novel polyphenolic prebiotic and probiotic formulation have synergistic effects on the gut microbiota influencing *Drosophila melanogaster* physiology. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018 Apr 12;46(sup2):441-55.