

Mikrobiologisches Langzeitmonitoring in Pharmaanwendungen

Der rechtliche Hintergrund Die GMP Guidelines für sterile Fertigung [1] (basierend auf 91/356/EC und 91/412/EC) fordern ein regelmäßiges mikrobiologisches Monitoring von Raumluft und Oberflächen in Klasse A Reinraumbereichen. Dieses Monitoring greift in der Praxis auf eine Reihe von verschiedenen Verfahren zurück. So etabliert sich häufig eine Kombination aus Sedimentationsplatten, aktiver volumetrischer Luftkeimsammlung und Beprobung von Oberflächen mittels Abklatschmethoden. Alle diese Verfahren werden regelmäßig in einer schriftlich festgelegten Routine durchgeführt. Auch die USP 25 [2] präsentiert einen tabellarischen Aktionsplan, der Class 100 Reinräume und die produktionsunterstützenden Reinräume in unmittelbarer Nähe betrifft. Hier wird ein Monitoring gefordert, das synchron mit jeder Produktionsschicht läuft und ein Minimum von 1 m³ Raumluft umfassen soll.



Abb. 1: Typischer Aufbau eines portablen Luftkeimsamplers

ISO 14698 [3], der derzeit diskutierte neue Standard, verweist ebenfalls auf den Bedarf eines regelmäßigen mikrobiologischen Monitorings im Betriebszustand des Sterilraumes. Im Blatt 2 des ISO Standards wird indirekt darauf hingewiesen, dass die Monitoringfrequenz und das Probennahmenvolumen der Luftkeimsammlung hoch genug sein muss, um eine statistische Signifikanz der ermittelten Daten zu gewährleisten. Die Probennahmefrequenz ist gemäß ISO Blatt 2 ebenfalls abhängig von spezifischen Faktoren des Produktionsprozesses, des Reinraumdesigns, der Wechselwirkungsstärke mit dem Menschen und den historischen Erfahrungswerten eines bereits laufenden mikrobiologischen Monitoringprogramms. Gemäß ISO Blatt 2 existiert dementsprechend kein allgemeingültiges Monitoringschema für alle Umgebungen [4].

Die Kurzzeitprobennahme

Im betrieblichen Alltag haben sich etliche tragbare Luftkeimsammler etabliert, deren Konzept kurze Probennahmezeiten mit dem Impaktionsverfahren kombiniert. Bei einem solchen Luftkeimsammler (Beispiel in Abb. 1) steht der hohe Bedienkomfort bei gleichzeitig niedrigem Gewicht von einigen wenigen Kilogramm im Vordergrund. Üblicherweise wird diese Art von Keimsammler mit wiederaufladbaren Batterien betrieben und ist als Folge für Probennahmezyklen im Minutenbereich (typisch < 10 Minuten für 1 m³ Luft) ausgelegt. Diese Art von Keimsammler ist somit ein beliebtes Instrument für Kurzzeitbetrachtungen.

Die Probleme der Langzeitprobennahme

Als Erweiterung der Probennahme im Minutenbereich gibt es in der pharmazeutischen Routine ein wachsendes Interesse in Richtung kontinuierlichem Monitoring oder Keimsammlung mit hohen Probenmengen. Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu erhöhen, wird eine Probenahme angestrebt, die einen typischen Produktionszeitraum von 3 bis 4 Stunden begleitet. Leider ist, solange portable Keimsammler eingesetzt werden, dieser Wunsch erfahrungsgemäß von einigen unüberwindlichen Hindernissen begleitet. Die langen Zeiträume bedeuten für die proben-

nehmende Person eine unangenehme Belastung und blockieren eventuell die laufende Produktion. Austrocknung des Nährmediums und ein Absterben frühzeitig eingefangener Mikroorganismen können weitere Problempunkte sein. Auch setzt die immer häufiger anzutreffende Produktion in Isolatoren dieser konventionellen Probenahmetechnik Grenzen. Um sich der Thematik des mikrobiologischen Langzeitmonitoring zu nähern, reicht eine Anpassung der konventionellen Kurzzeitkonzepte leider nicht aus. Die Erhöhung des Luftdurchsatzes durch ein Handheld-System fördert nämlich den Austrocknungsprozess des Nährmediums drastisch, und eine strömungstechnische Beschleunigung der Keime führt beim Auftreffen auf das Medium zu Belastungen, die ein Überleben der Organismen in Frage stellt. Auch die Aufenthaltszeit des Luftkeimsammlers in unmittelbarer Nähe zum Produkt wird immer kritischer. Schließlich sind handbetriebene Keimsammler nicht vollständig sterilisierbar, und die integrierte Pumpe ist grundsätzlich als permanente Partikelquelle zu verdächtigen. Ferner ist in diesem Fall das Konzept einer Batterieversorgung nicht länger haltbar.

Wassermangel als Kernproblem

Eine genaue Problemanalyse identifiziert die Dehydrierung des Nährmediums als das zentrale Problem der Langzeit-Luftkeimsammlung. Jeder lebende Organismus muss in seiner Umgebung all diejenigen Substanzen finden, die er zu seiner spezifischen Energieerzeugung und zur zellulären Biosynthese braucht. Neben diesen Nährsubstanzen sind Temperatur, Sauerstoff (anwesend oder abwesend) und Wasser weitere Faktoren von entscheidender Bedeutung. Wasser ist das Lösungsmittel, in dem die Moleküle des Lebens gelöst sind, und die Verfügbarkeit von Wasser ist mithin der kritische Faktor für das Wachstum aller Zellen. Die Wasser-Verfügbarkeit für eine Zelle hängt von der Konzentration in der Raumluft (relative Feuchte) oder der Konzentration im Nährmedium ab (Wasseraktivität). Die Wasseraktivität (A_w) von reinem H₂O ist 1,0 (100% Wasser). Mikroorganismen leben über einen A_w -Bereich von 1,0 bis 0,7 [5]. Da also die

Abb. 2: PMT Langzeitluftkeimsammler Typ ATRIUM

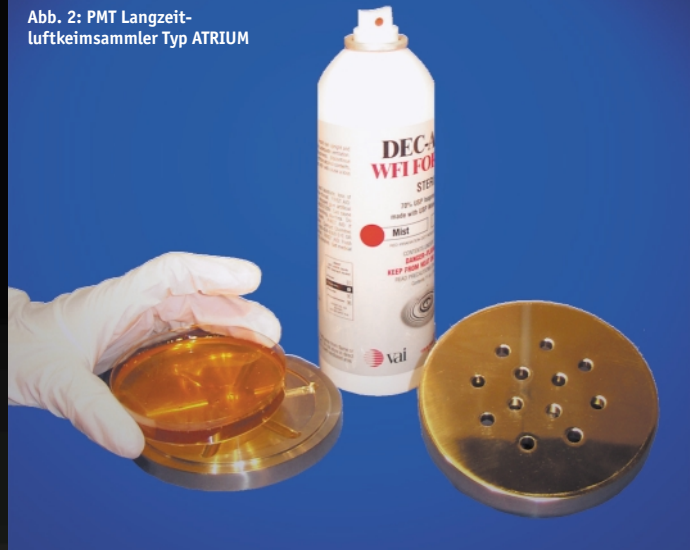
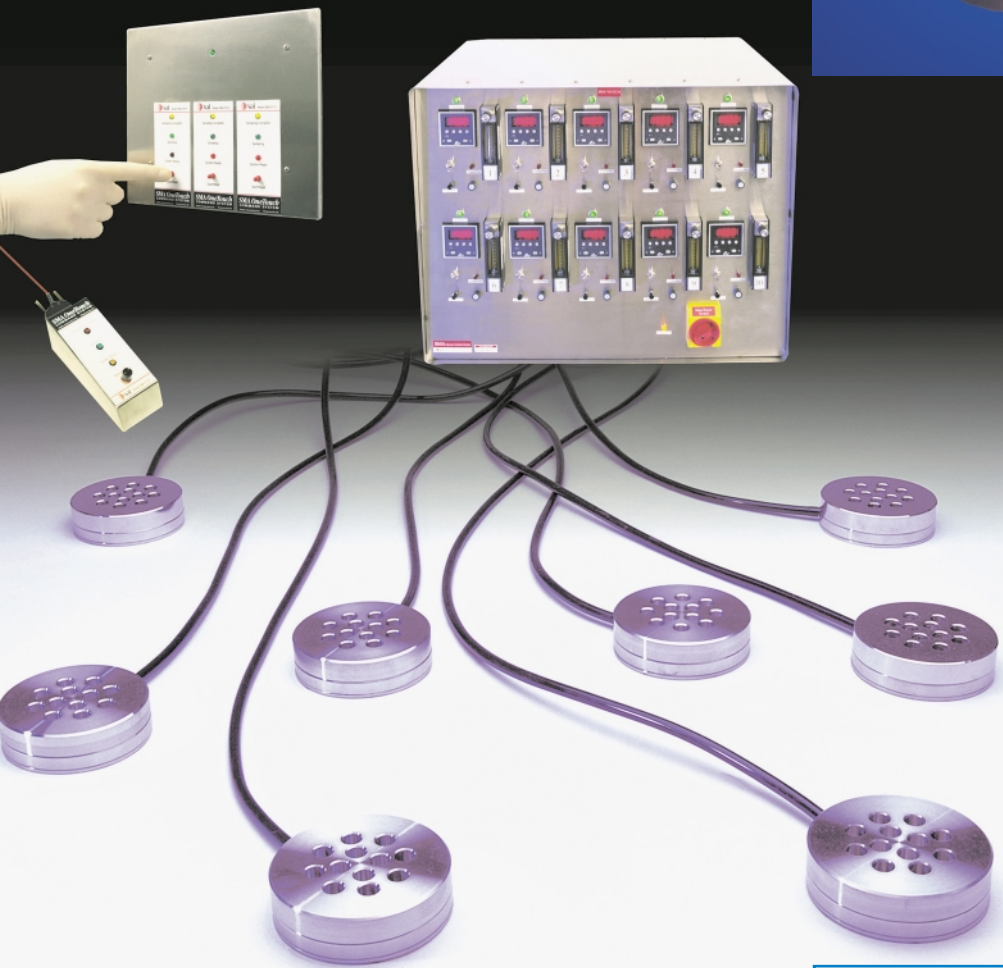


Abb. 4: Gesamtkonfiguration des ATRIUM Systems von PMT zum Einsatz in Isolatoren

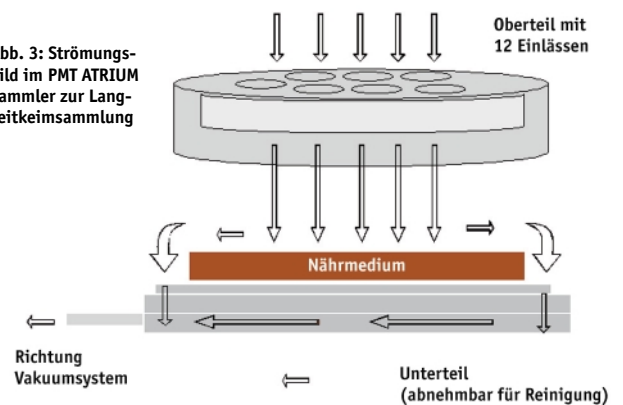


effiziente Wasserversorgung für Bakterien überlebenswichtig ist, muss eine Langzeit-Luftkeimsammlung dafür sorgen, dass Dehydratation nicht das Wachstumsvermögen der eingefangenen Keime unterdrückt.

Langzeitprobennahme – eine technische Umsetzung

Die Validierungsberichte des in Abb. 2 dargestellten Impaktionssystems präsentieren eine Konstruktion, die eine Wasserversorgung über 3 Stunden Probennahme sicherstellt [6]. Hier wird die Raumluft wohldefiniert ange-

Abb. 3: Strömungsbild im PMT ATRIUM Sammler zur Langzeitkeimsammlung



saugt und das Strömungsbild durch eine Edelstahlkammer präzise ausgebildet. Schließlich erfolgt die eigentliche Luftkeimsammlung auf einer konventionellen Petrischale. Die Auswahl des jeweiligen Nährmediums kann frei erfolgen. Die Wachstumstests bei 21 °C Raumtemperatur und 60% Luftfeuchte umfasst 4 Organismenstämme – namentlich *Bacillus Subtilis*, *Escherichia Coli*, *Aspergillus Niger* and *Candida Albicans*. Die Testserien bei verschiedenen Probennahmezeiten zeigen eine klare Abhängigkeit vom Wasserreservoir. Mit einer Medienfüllung von 25 ml ist bis zu einer Probenmenge von etwa drei m³ Luft ein gutes Wachstum der Organismen festzustellen. Eine erweiterte Befüllung mit 32 ml Nährmedium verlängert den Bereich des gesunden Organismenwachstums auf 6 m³ Luftprobe. Deutliche Überschreitungen dieser validierten Probennahmehmengen von 6 bzw. 3 m³ zeigen dann schließlich eine Unterdrückung des Organismenwachstums. Neben der Füllmenge führt natürlich auch die Medienauswahl zu unterschiedlichen Testergebnissen. Im Rahmen der Validierung erlaubten einige 32 ml Nährmedien eine dreistündige Luftkeimsammlung (korrespondierend mit 6 m³ Luft), während andere Agars Probennahmezeiten von bis zu 4 Stunden zuließen. Hier spiegelt sich der unterschiedliche Feuchtegehalt der jeweiligen Nährböden wider. Der Testverlauf zeigt, dass der Effekt von Raumtemperatur und Raumfeuchte, im Vergleich zum Beitrag des gewählten Probevolumens und der Luftgeschwindigkeit, klein ist. Die Strategie, die Probennahmezeit zu minimieren, indem der Luftdurchsatz drastisch erhöht wird, zeigt ebenfalls keinen günstigen Effekt auf das Austrocknungsverhalten des Nährmediums. Abgesehen davon kann eine Erhöhung der Luftgeschwindigkeit die Effizienz der Probennahme vermindern und lebende Organismen zerstören. Der ISO 14698 Entwurf sagt hierzu gleichlautend im Blatt 1, dass die Impaktionsgeschwindigkeit einen Kompromiss finden muss zwischen der Fähigkeit, lebensfähige Organismen bis hinab zu 1 µm fangen zu können (hohe Geschwindigkeit) und dem Schutz vor Beschädigung dieser Organismen (niedrige Geschwindigkeit) [7]. Besondere Vorsicht kann bei Hochgeschwindigkeitsimpaktion auf Filtern geboten sein. Neben der hohen Auftreffgeschwindigkeit wird hier der Organismus zusätzlich durch einen permanenten Wassermangel strapaziert. Bei jeder Luftkeimsammlung ist zu bedenken, dass ein Impaktionssystem mit relativ niedriger Strömungsgeschwindigkeit eventuell nicht alle Keime einfangen kann. Hier muss das strömungstechnische Design sicherstellen, dass auch bei vergleichsweise niedrigen kinetischen Energien der angesaugten Organismen eine Rückhalterate von 95 % oder besser sichergestellt ist. Das Durchflusskonzept in Abb. 3 ist mit den bereits genannten Organismen validiert und stellt die geforderte 95 % Effizienz – auch über den 3 Stunden Langzeiteinsatz – sicher.

Langzeitprobennahme in Isolatoren

Isolatoren bringen ihre ganz spezifischen Problemstellungen beim Mikrobiologischen Monitoring mit sich. Sie benötigen normalerweise Ausrüstungsgegenstände, die gegen VHP (dampförmiges Wasserstoffperoxid) resistent sind. Da eine häufige Ein- und Ausschleusung von Probennahmesystemen unerwünscht ist, wird eine Fernbedienbarkeit von Orten außerhalb des Isolators notwendig. Auch sind die Platzverhältnisse im Isolatorinnern häufig sehr begrenzt, was für die Luftkeimsammlung die Forderung nach kleinen Probennahmeverrichtungen mit sich bringt. Systeme, welche diese Einsatzanforderungen weitgehend erfüllen, sind typischerweise zweigeteilt (s. Abb. 4). Der eigentliche Luftkeimsammler ist möglichst kompakt und VHP beständig. Nur dieser Teil wird in den Isolatorbereich eingebracht. Die übrige Infrastruktur zum Probentransport (Pumpen, Ventile...) wird außerhalb des Sterilbereiches montiert und ist fernbedienbar. Die logische Ablaufsteuerung der Luftkeimsammlung erfolgt dann entweder an einem geeigneten Platz im Sterilbereich oder vollständig im nicht sterilen Bereich. Diese konsequente Dezentralisierung ermöglicht auch im Innern von Isolatoren die Langzeit Luftkeimsammlung.

Literatur

- [1] EU Guide to Good Manufacturing Practice, Eudralex Volume 4, annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products.
- [2] USP25, chapter 1116, Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments.
- [3] Draft International Standard ISO/DIS 14698-1.2 Cleanrooms and associated environments – Biocontamination control – Part 2. evaluation and interpretation of biocontamination data.
- [4] Technical report No. 13, Fundamentals of an Environmental Monitoring Program, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.
- [5] Nutrition and growth of bacteria, Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology K. Todar, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- [6] SMA Sterilizable Microbiological Atrium, 2001, Veltex Associates, Inc. Atrium Validation Report, Art Vellutato Jr.
- [7] Draft International Standard ISO/DIS 14698-1.2 Cleanrooms and associated environments – Biocontamination control – Part 1. General principles.

DIE AUTOREN

Jörg Dressler
PMT Partikel Messtechnik AG
Steinstr. 3/1
D - 71296 Heimsheim
j.dressler@pmt-ag.com

Peter Koger
PMT Partikel Messtechnik AG
p.koger.pmt@raketnet.nl

INFORMATIONEN

Kenn-Nr. 208