

Ausführungen zur mikrobiologischen Eignungsprüfung nach Arzneibuch

Dr. Dorothee Jäger

Labor L+S AG, Bad Bocklet

Auch Arzneibuchmethoden, die von vornherein als valide gelten, müssen gegebenenfalls auf ihre Eignung geprüft werden. Diese Eignungsprüfungen erfolgen produktspezifisch und erfordern im Vorfeld einige Überlegungen, um den Vorgaben der Arzneibücher gerecht zu werden. Dabei ist es nicht immer einfach, Anforderungen und Realität in Einklang zu bringen. Das Arzneibuch bietet Lösungsansätze, die Ausführung der Prüfung liegt dann letztendlich in der Verantwortung des Anwenders. Dabei ist stets im Auge zu behalten, dass das Arzneibuch die Schiedsmethode beschreibt, die im Streitfall die Rechtsgrundlage darstellt.

Eckpunkte einer Validierung

Die „Validierung“ einer Methode ist untrennbar mit Parametern wie „Richtigkeit [Accuracy], Präzision [Precision], Linearität [Linearity and Range], Robustheit [Robustness]“ und anderen mehr verknüpft [1].

Eine Validierung ist also ein analytisches Verfahren, um zu überprüfen, ob eine Methode für den vorgesehenen Zweck geeignet und somit anwendbar ist. In diesem Sinne sind auch die im Arzneibuch beschriebenen Methoden überprüft. Somit ist die Gültigkeit dieser Methoden belegt und deren Ergebnisse gelten als valide. Dazu kommentiert die Europäische Pharmakopöe (Ph. Eur.) im allgemeinen Teil unter dem Abschnitt Validierung von Arzneibuch-Methoden: *„Die in Monographien und Allgemeinen Kapiteln beschriebenen Prüfmethoden sind entsprechend anerkannter wissenschaftlicher Praxis und gängiger Empfehlungen für analytische Validierungen validiert worden. Falls in*

der Monographie oder im Allgemeinen Kapitel nichts anderes vorgeschrieben ist, ist eine Validierung der Prüfmethoden nicht erforderlich“ [2].

Eckpunkte einer Eignungsprüfung

Es wäre aber zu einfach, wenn die oben genannten Arzneibuchmethoden immer und ohne Einschränkung auf alle Prüfsubstanzen anwendbar wären. Jedem Mitarbeiter, der analytische Methoden einsetzt, ist klar, dass es kein allgemein gültiges Rezept bzw. keine allgemein gültige Methode geben kann, allen Fragestellungen immer mit einer Patentlösung zu begegnen. Trotzdem hat man in der Regel Vorstellungen, mit denen man üblicherweise an derartige Aufgaben herangeht, um diese erfolversprechend zu lösen. In diesem Sinne sollten auch die Methoden der Pharmakopöen verstanden werden, die z.B. für die Prüfung auf mikrobiologische Rein-

heit von nicht sterilen Zubereitungen in der Ph. Eur. 8, Kapitel 2.6.12 und 2.6.13 aufgeführt werden. Hier sind drei Prüfmethode – das Oberflächenverfahren, das Plattengussverfahren und das Membranfiltrationsverfahren – benannt und detailliert beschrieben. Dazu heißt es: *„Die Eignung der Prüfung für den Nachweis der Mikroorganismen in Gegenwart des Produktes muss nachgewiesen werden. Die Anwendbarkeit der Prüfmethode muss jedes Mal neu bestätigt werden, wenn bei der Durchführung der Prüfung oder beim Produkt eine*

AUTOR



Dr. Dorothee Jäger

arbeitete nach dem Studium der Biologie mit dem Schwerpunkt Mikrobiologie und der anschließenden Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für experimentelle Biologie und Medizin am Forschungsinstitut Borstel. Seit 1993 ist sie bei der Labor L+S AG zunächst als Abteilungs- und seit 2010 als Bereichsleiterin für den Bereich „mikrobiologische Sicherheitsprüfungen“ tätig. Zudem übernimmt sie die Stellvertretung der Leitung der Qualitätskontrolle für mikrobiologische Prüfungen nicht steriler Produkte.

Änderung vorgenommen wird, die sich auf das Ergebnis der Prüfung auswirken kann“ [3].

Hier macht sich zum ersten Mal Verwirrung bemerkbar. Warum müssen valide Methoden auf Eignung geprüft werden? Wie eingangs schon erwähnt, gibt es keine allgemeine Patentlösung für alle Fälle. Im konkreten Beispiel heißt das, die beschriebenen Methoden sind zwar valide, ob sie sich aber auch auf die jeweilige Testmatrix anwenden lassen, muss im Einzelfall ausgetestet werden. Dies wird schon an einem simplen Beispiel klar: Eine nicht antimikrobiell wirksame Prüfsubstanz, wie z. B. „Laktose“, verhält sich unter der Prüfung mittels Zählverfahren – Oberflächen- oder Plattengussverfahren – sicherlich anders als ein antibiotischer Wirkstoff.

Hier muss im Einzelfall ausgetestet werden, welche Methode zum Einsatz kommen kann und welche Modifikationen eventuell vorgenommen werden müssen, um die geforderten Kriterien zu erfüllen. Für wasserlösliche Antibiotika ist in jedem Fall die Methode der Membranfiltration den beiden anderen Zählverfahren vorzuziehen.

Das Arzneibuch spricht hier jetzt nicht mehr wie früher von Validierung, sondern von einer geeigneten Methode. Wichtig ist dabei, dass es sich um eine produktspezifische Eignungsprüfung handelt, die von der Validierung der allgemeinen Standardmethode klar abzugrenzen ist.

Folglich ist eine Eignungsprüfung für jede Zubereitung und jeden Rohstoff oder Wirkstoff zwingend erforderlich. Entsprechende Spezifikationen sind in dem Kapitel 5.1.4 der Europäischen Pharmakopöe vorgegeben [4].

Eignungsprüfung bei Vorliegen produktspezifischer Ph. Eur. Monographien

Was ist aber, wenn auch produktspezifische Monographien vorliegen, wie

dies z. B. für diverse Rohstoffe wie Mannit, mikrokristalline Cellulose, Laktose u. v. a. der Fall ist. Diese Monographien beschreiben Methoden der mikrobiologischen Reinheitsprüfung, die per se als valide anzusehen sind. Somit sollte sich in diesen Fällen auch eine zusätzliche produktspezifische Eignungsprüfung erübrigen. In diesem Punkt gehen die Expertenmeinungen aber immer noch auseinander. Es wird viel kontrovers diskutiert, da in den Monographien nur allgemein auf das Kapitel 2.6.12 zur Keimzählung verwiesen wird, ohne dabei eine Entscheidung über den Einsatz einer der drei dort beschriebenen Methoden – Oberflächenverfahren [OF], Plattengussverfahren [PG] oder Membranfiltration [MF] – zu treffen. Unter logischen Aspekten macht es allerdings wenig Sinn, z. B. für einen Rohstoff wie „Laktose“ immer wieder neu zu belegen, dass keine antimikrobiellen Eigenschaften des Milchzuckers vorliegen und die Wahl der Methode (OF, PG oder MF) somit gar keine Rolle spielt.

Eignungsprüfung bei Vorliegen produktspezifischer USP Monographien

Trotz Harmonisierung – also Gleichstellung und somit gegenseitiger Anerkennung und Akzeptanz der Prüfmethoden in Europa, den USA und Japan – gibt es Unterschiede zwischen den Pharmakopöen. In der United States Pharmacopeia (USP) ist die „per se Validität“ von Standardmethoden z. B. nicht beschrieben. Somit muss hier genau genommen das Verfahren immer und für jede Prüfsubstanz auf Eignung getestet werden.

Ein anderer Aspekt, der die USP schwerer interpretierbar macht, ist das Kapitel 1227 [5]. Hier sind noch Vorgaben aus der Zeit vor der Harmonisierung zu finden, die mit den neuen Kapiteln 61 [6] und 62 nicht unbedingt harmonisch in Einklang zu bringen sind. Da wird z. B. eine

Wiederfindungsrate von mindestens 70 % der eingesetzten Keime verlangt – nach harmonisierter Methode ist eine Wiederfindung von 50 % ausreichend. Auch gibt es Unterschiede bei der Berechnung der Wiederfindung, d. h. bei der Gegenüberstellung von Produktkontrolle – Positivkontrolle – Inokulumkontrolle. Da das Kapitel in der USP allerdings unter den „General Informations“ zu finden ist, hat es lediglich informativen und keinen rechtsverbindlichen Charakter.

Wann ist eine Eignungsprüfung gefordert?

Eine Eignungsprüfung ist immer dann erforderlich, wenn es um eine neue Zubereitung oder einen neuen Wirk- oder Hilfsstoff geht, und auch bei methodischen Änderungen der Prüfung oder auch Änderungen im Herstellprozess.

Dabei sollte man nicht aus den Augen verlieren, dass Eignungsprüfungen nach der WHO immer in drei Chargen durchgeführt werden sollten [7, 8].

Ziel ist die Entwicklung einer sicheren Methode, die für die spätere Routineprüfung der mikrobiologischen Reinheit geeignet ist und zuverlässige Ergebnisse liefert. Die Arzneibuchvorgaben hierzu sind relativ allgemein gehalten. Sie zeigen einige Möglichkeiten zur Modifikation auf, um auch in schwierigeren Fällen die vorgegebene Spezifikation überprüfen zu können. Diese Prüfvarianten sind als pragmatische Vorschläge zu verstehen und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Weitere Lösungsansätze sind hin und wieder erforderlich und durchaus erlaubt, sofern das Wachstum der gesuchten Keime nicht negativ beeinflusst wird. Wenn es z. B. im Arzneibuch heißt, dass die Prüfsubstanz in Natriumchlorid-Pepton-Pufferlösung, pH 7,0 oder Phosphat-Pufferlösung, pH 7,2 oder in flüssigem Nährmedium mit Casein- und Sojapepton verdünnt werden kann, dann bleibt trotzdem die Möglichkeit bestehen, ein ande-

res, besser geeignetes Diluent einzusetzen.

Oftmals sind gerade Wirkstoffe besser in sterilem Wasser (WFI) löslich, und es spricht nichts dagegen, dieses dann auch einzusetzen. Letztendlich muss in jedem Fall die Eignung der Methode demonstriert werden. Man sollte die Arzneibuchvorgaben somit nicht als starres Korsett sehen, sondern vielmehr als wegweisende Hilfestellung. Trotzdem ist festzuhalten, dass die Akzeptanz der Methode durch die Behörde bei strikter Einhaltung der Vorgaben quasi garantiert ist, während Abweichungen sehr oft Fragen nach sich ziehen, die ausführliche Erklärungen und Begründungen verlangen. Alternative Prüfmethoden sind durchaus erlaubt, vorausgesetzt, sie stellen sich als besser oder zumindest gleichwertig heraus. Die Arzneibuchmethode ist somit zunächst jeder anderen Alternativmethode vorzuziehen, zumal sie im Streitfall als die Schiedsmethode gilt, an der alles andere gemessen wird.

Eignungsprüfungen an „kritischen“ Substanzen

Für Problemfälle, wie z. B. für Substanzen mit stark antimikrobieller Wirksamkeit, sind u. a. weitere Probenverdünnungen erlaubt, um den wachstumshemmenden Einfluss auf die Testkeime zu minimieren. Eine höhere Verdünnung der Prüfsubstanz bringt in den meisten Fällen eine Verschlechterung der Nachweisgrenze von Mikroorganismen mit sich. Durch eine geringere Konzentration der Prüfsubstanz im Verdünnungsmedium wird sowohl im Plattenguss- als auch im Oberflächenverfahren eine geringere Menge der Original-Testmatrix in oder auf den festen Agarmedien untersucht. Die maximal einsetzbaren Verdünnungen werden in Abhängigkeit von der gewählten Methode so berechnet, dass eine Überprüfung der Spezifikation nach Arzneibuch noch möglich ist. Dieses Problem kann durch den Ein-

satz der Membranfiltration umgangen werden, vorausgesetzt, das Prüfmaterial ist im Diluenten gut löslich und kann in der erforderlichen Menge filtriert werden.

Sofern man nach Einsatz aller Möglichkeiten zur Elimination antimikrobieller Effekte keine ausreichende Wiederfindung der Testkeime erreicht, kommentiert die Pharmakopöe das wie folgt: *„Wenn keine geeignete Methode zum Neutralisieren gefunden werden kann, ist anzunehmen, dass nach dem Inokulieren keine Mikroorganismen isoliert werden können, weil das Produkt eine mikrobizide Aktivität besitzt. Diese Information gilt als Hinweis, dass das Produkt durch die betreffende Spezies von Mikroorganismen nicht kontaminiert werden kann“* [9].

Dieser Kommentar ist verständlich und durch die Eignungsprüfung mit Zahlen und Fakten belegt. Für die Eignungsprüfung ist dies unproblematisch. Kritischer ist dies im Hinblick auf die Freigabeproofungen zu sehen.

Auswirkung der Eignungsprüfung auf spätere Routineprüfungen

Da es möglich ist, dass das Produkt nur bestimmte Mikroorganismen hemmt, während andere unempfindliche Keime, die nicht zu den Referenzstämmen zählen, durchaus wachsen können, verlangt die Pharmakopöe die Durchführung von Freigabeproofungen wie folgt: *„Die Prüfung sollte mit der größtmöglichen Verdünnung durchgeführt werden, die noch mikrobielles Wachstum und das Einhalten des spezifischen Akzeptanzkriteriums zulässt“* [9].

Bei diesem Vorgehen werden alle Keime – sowohl sensible als auch resistente oder unempfindliche Keime – mit der denkbar schlechtesten Nachweisgrenze erfasst. Da durch die Eignungsprüfung belegt ist, dass sensible Keime im Produkt per se nicht existent sein können, sollte das Augenmerk eher auf alle anderen

robusteren Mikroorganismen gerichtet sein. Hier wäre eine Prüfung mit der Standard-1:10-Probenverdünnung die sicherere Variante. Nur so können Trends mikrobiologischer Vorbelastungen frühzeitig erkannt werden.

Die Prüfung nach den Vorgaben der Europäischen Pharmakopöe bewegt sich in diesen Fällen an der Spezifikationsgrenze und lässt oftmals erst Wachstum erkennen, wenn bereits ein „Out of specification“ [OOS] – Resultat vorliegt. Für die Produktsicherheit spielt das zwar keine Rolle, da eine Freigabe immer nur bei „In Spec“-Ergebnissen erfolgt. Für die Herstellung und Produktion birgt diese Vorgehensweise allerdings ein Risiko, da Störfälle gegebenenfalls nicht frühzeitig erkannt werden können. Optimales Vorgehen würde beide Prüfvarianten beachten – die normale Standardprüfung mit einer 1:10-Probenverdünnung *und* die Prüfung maximal erforderlicher Verdünnung gemäß durchgeführter Eignungsprüfung. Das ist unter finanziellen Aspekten einerseits sicherlich nicht attraktiv, der Schaden ist andererseits – wenn eine komplette Charge vernichtet werden müsste – im Einzelfall abzuwägen.

Was im Kapitel 2.6.12 zur Keimzählung keinerlei Beachtung findet, ist das Verhalten von mikrobiellen Sporen. Bakterielle Sporen, wie z. B. die *Bacillus*-Spezies, sind durch Antibiotika oder andere antimikrobiell wirksame Agenzien nicht beeinflussbar und können somit in fast jeder Formulierung existieren. Sporen werden unter der Prüfung nur dann erkannt, wenn sie von der Dauerform der Spore in die vegetative Form übergehen und zu wachsen beginnen. Nur so sind diese Keime auf dem Agarmedium sichtbar. Dies stellt immer dann ein Problem dar, wenn es sich um Prüfsubstanzen mit stark antimikrobieller Wirkung handelt, die ein Wachstum subtiler Keime, wie z. B. *Bacillus subtilis*, nicht zulassen.

Unter diesem Aspekt scheint die Ph. Eur.-Interpretation, dass nach

fehlgeschlagener Re-Isolierung der Keime „das Produkt durch die betreffende Spezies von Mikroorganismen nicht kontaminiert werden kann“ [9] in einem anderen Licht.

Daher ist es fast zwingend erforderlich, bei einer Eignungsprüfung unbedingt mit *Bacillus subtilis* Sporen zu arbeiten.

Ist in solchen Fällen eine Re-Isolierung – wenn auch mit schlechter Wiederfindung – möglich, ist das Problem gelöst. Wenn aber auch nach Einsatz aller methodisch möglichen Modifikationen keine Wiederfindung gegeben ist, d.h. wenn der Übergang von der Spore in die vegetative Form mit den gängigen Methoden nicht gelingt, bleibt nur, nach anderen methodischen Lösungen zu suchen, um eine ausreichende Wiederfindung zu erhalten und ein realistisches Ergebnis zu garantieren. Denkbar wäre es, unabhängig von der vorgegebenen Spezifikation die Verdünnung experimentell zu ermitteln, bei der gerade noch ein Nachweis von Sporen möglich ist. Die Zahl

an eventuell vorhandenen Sporen, die sich daraus für die Zubereitung errechnet und die im Ernstfall relevant wäre, muss dann in einer Risikobewertung unter dem Aspekt Darreichungsform und vorgesehene Patientengruppe beurteilt werden.

Fazit

Das Arzneibuch macht relativ konkrete Vorgaben zur mikrobiologischen Reinheitsprüfung von Arzneimitteln, lässt aber auch ausreichend Möglichkeiten zur Modifikation der Methoden. Diesen Spielraum sollte und muss man nutzen und ausschöpfen, wann immer dies gebraucht wird.

LITERATUR

- [1] United States Pharmacopeia 37, Chapter 1225 "Validation of Compendial Procedures".
[2] Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe, Kapitel 1.1 Allgemeines, Absatz „Validierung von Arzneibuchmethoden“.

- [3] Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe, Kapitel 2.6.12 „Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte“, Punkt 4-1.
[4] Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe, Kapitel 5.1.4 „Mikrobiologische Qualität von nicht sterilen pharmazeutischen Zubereitungen und Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“.
[5] United States Pharmacopeia 37, Chapter 1227 "Validation of Microbial Recovery From Pharmacopeial Articles".
[6] United States Pharmacopeia 37, Chapter 61 "Microbiological Examination of non-sterile Products".
[7] WHO guidelines on transfer of technology on pharmaceutical manufacturing Annex 7.
[8] WHO Technical Report Series, No 961, 2011.
[9] Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe, Kapitel 2.6.12 „Neutralisation/Elimination der antimikrobiellen Aktivität“, Punkt 4-5-3.

Korrespondenz:

Dr Dorothee Jäger
Bereichsleitung
Mikrob. Prüfung nicht steriler Produkte
Labor L+S AG
Mangelsfeld 4, 5, 6
97708 Bad Bocklet (Germany)
e-mail: dorothee.jaeger@labor-ls.de