

Validierung eines schnellen Steriltests

Herausforderungen aus der Sicht eines Dienstleistungslabors

Carolin Fromm, Kristin Kowalick, Stefanie Bayer

Labor L+S AG, Bad Bocklet

Korrespondenz: M. Sc. Carolin Fromm, Labor L+S AG, Mangelsfeld 4, 5, 6, 97708 Bad Bocklet, Germany; e-mail: Carolin.Fromm@Labor-LS.de

ZUSAMMENFASSUNG

Eine mikrobielle Kontamination bei Arzneimitteln und Medizinprodukten, die zur Applikation an Mensch oder Tier steril sein müssen, stellt ein großes Risiko für die Patientensicherheit dar. Neben sämtlichen technischen und operativen Sicherheitsmaßnahmen während der Produktion ist die Prüfung auf Sterilität in den meisten Fällen das finale Kriterium für eine Chargenfreigabe. Bei der traditionellen Prüfung auf Sterilität gemäß Arzneibuch muss jedoch eine 14-tägige Inkubationszeit eingehalten werden, um letztendlich eine qualitative Aussage über ein mögliches, makroskopisch sichtbares Wachstum von Mikroorganismen im Zuge einer Primärkontamination treffen zu können. Alternative Schnellmethoden, die diese Inkubationsdauer minimieren, gewinnen deshalb insbesondere für patientenindividuelle Formulierungen und Arzneimittel mit geringer Halbwertszeit immer mehr an Attraktivität und deren Einsatz wird von Behörden (z. B. FDA, EMA) nach ausreichender Validierung befürwortet.

Auf dem Markt gibt es derzeit eine Reihe mikrobiologischer Alternativmethoden, welche sich prinzipiell für den Nachweis auf Sterilität eignen. Eine mögliche Alternativmethode zur traditionellen Sterilprüfung stellt die Adenosintriphosphat-(ATP)-Biolumineszenz-Messung mittels Charles River's Celsis®-AMPiScreen-Technologie dar. Dieses System nutzt das in lebenden Organismen ubiquitär vorhandene und über einen Amplifizierungsschritt zusätzlich produzierte ATP, welches über eine Luciferin-Luciferase-Enzymreaktion qualitativ nachgewiesen wird. Vorteil dieses adaptierten Nachweises mittels ATP-Detektion ist, dass das Grundprinzip der Methode zur Prüfung gemäß Ph. Eur. 2.6.1 und USP <71> (Membranfiltration, Direktinokulation) hierbei unverändert bleibt. Es wird lediglich das visuelle Nachweisverfahren mittels des menschlichen Auges durch ein automatisiertes Detektionsverfahren mittels ATP-Biolumineszenz ersetzt. Dadurch können aussagekräftige, valide Ergebnisse bereits nach 7 Tagen Inkubation erzielt werden. Der folgende Artikel beschreibt die allgemeine Methodenvalidierung dieses Alternativverfahrens zur klassischen Sterilprüfung gemäß den Vorgaben der Ph. Eur. 5.1.6, USP <1223> und PDA TR No. 33 aus der Perspektive eines Dienstleistungslabors.

ABSTRACT

Validation of a Rapid Sterility Test – Challenges from the Perspective of a Contract Laboratory

Microbial contamination of drugs and medicinal products, which are required to be sterile for the application to humans or animals, poses a great risk to the patients' safety. In addition to all technical as well as operational safety measures during the production, the test for sterility is the final criterion for the batch release in most cases. For the traditional sterility test according to the pharmacopeia, an incubation time of 14 days is required to provide qualitative information on a possible macroscopically visible growth of microorganisms due to a primary contamination. Therefore, alternative rapid methods that decrease the incubation time become increasingly attractive particularly to patient-specific formulation and medicinal products having a short half-life. Moreover, after sufficient validation their use is supported by authorities (e.g. FDA, EMA).

Currently there are many microbial alternative methods on the market which are in principal suitable for proofing sterility. Adenosine triphosphate(ATP)-Bioluminescence via Charles Rivers' Celsis® AMPiScreen technology represents one of the possible alternative methods to the compendial method. This system uses ATP, that is ubiquitously present in living organisms as well as ATP that is additionally produced by an amplification step, for the qualitative detection by a luciferin-luciferase enzyme reaction. The advantage of this adapted procedure via ATP detection is that the main principle of the method for testing according to Ph. Eur. 2.6.1 and USP <71> (membrane filtration, direct inoculation) remains unchanged. Only the visual detection system by means of the human eye is replaced by an automated detection procedure using ATP-Bioluminescence. Therefore meaningful, valid results are obtained after only 7 days of incubation.

The following article describes a general method validation of this alternative method to the compendial method according to Ph. Eur. 5.1.6, USP <1223> and PDA TR No. 33 from the perspective of a contract laboratory.

KEY WORDS

- Rapid Microbiological Methods (RMM)
- Prüfung auf Sterilität
- Validierung einer Alternativmethode
- Ph. Eur. 5.1.6
- USP <1223>
- PDA TR No. 33

Pharm. Ind. 79, Nr. 5, 710–718 (2017)

1. Einleitung

Eine frühestmögliche Chargenfreigabe ist das Ziel eines jeden Pharmaunternehmens. Die Prüfung auf Sterilität ist mit einer Inkubationszeit von mindestens 14 Tagen bis zum Erhalt eines validen Testergebnisses oft ein zeitlich limitierender Faktor bei der Freigabe steriler Produkte [1–4]. Für viele Zubereitungen, wie z. B. Radiopharmazeutika oder patienten-individualisierte Infusionslösungen, ist dies eine zu lange Wartezeit, weshalb die Produkte oftmals risikobasiert vorab dem Patienten appliziert werden. Der lange Zeitraum zwischen Auftreten und Detektion einer Kontamination birgt zudem die Gefahr, dass nicht nur die aktuelle Produktionscharge sondern auch weitere Chargen betroffen sind. Der Einsatz von Schnellmethoden gewinnt dadurch immer mehr an Präsenz.

Vor der Einführung einer alternativen Schnellmethode als Routineverfahren im GMP-Labor muss diese gemäß den behördlichen Vorgaben validiert werden. Anhand der Validierung soll sichergestellt werden, dass die Alternativmethode zuverlässig ist und äquivalente Ergebnisse zur Arzneibuchmethode liefert. Für die erfolgreiche Validierung einer alternativen mikrobiologischen Methode gibt es diverse Richtlinien. Die aus GMP-Sicht relevantesten sind:

- Ph. Eur. 5.1.6: Alternative Methods for Control of Microbiological Quality [5]
- USP <1223>: Validation of Alternative Microbiological Methods [6]
- PDA TR No. 33: Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological Methods [7]

Welche dieser Richtlinien für die Validierung eines Produkts herangezogen wird, muss jeder Anwender für sich entscheiden. Als Dienstleistungslabor, welches Freigabeuntersuchungen an Produkten durchführt, die in unterschiedlichen Ländern (Europa, USA usw.) vertrieben werden, ist es empfehlenswert, mit allen 3 Richtlinien konform zu sein.

Des Weiteren ist es wichtig, eine für den vorgesehenen Zweck geeignete Methode auszuwählen. Derzeit gibt es eine Reihe verschiedener Alternativmethoden mit gewissen Vor- und Nachteilen auf dem Markt. 3 grundlegende Kategorien für Alternativmethoden sind [5]:

1. auf Wachstum beruhende Methoden, z. B. elektrochemische Methoden, Messung von Gasverbrauch, Biolumineszenz-Messung
2. direkte Messsysteme, z. B. Festphasen-Zytometrie, Durchflusszytometrie
3. Analyse der Zellbestandteile, z. B. phänotypisch mit immunologischen Methoden oder genotypisch mit Nukleinsäuren-Amplifikationstechniken

Bei einem Dienstleistungslabor liegt der Fokus v. a. darauf, eine Methode auszuwählen, mit der möglichst viele Produkte verschiedenster Matrices (zellulär, nicht zellulär, ölig, ionenhaltig, farbige usw.) geprüft werden können.

Die wachstumsbasierte Adenosintri-phosphat(ATP)-Biolumineszenz-Technologie mittels Charles River's Cel-sis®-AMPiScreen-Assay unterscheidet sich lediglich in der Art der Auswertung von der traditionellen Sterilprüfung und ist daher geeignet für das breite Anwendungsspektrum eines Dienstleistungslabors. Mit diesem können eine Vielzahl unterschiedlicher Produkte getestet werden, da sowohl die Membranfiltration als auch die Direktbeschickung durchgeführt werden können.

Das Prinzip der ATP-Biolumineszenz-Technologie beruht darauf, dass alle lebenden Mikroorganismen ATP als einen unerlässlichen Teil ihres Energiestoffwechsels enthalten. Die Besonderheit des AMPiScreen-Assays liegt in einem ATP-Amplifizierungsschritt. Nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP) zur Probe werden bei einer möglichen Kontamination vorhandene Zellen lysiert und das mikrobielle ATP sowie das Enzym Adenylatkinase aus den Mikroorganismen freigesetzt. Dieses Enzym katalysiert schließlich das zuvor hinzugefügte ADP zu Adenosinmonophosphat (AMP) und ATP. Der ursprüngliche ATP-Gehalt steigt hierbei um bis auf das 1000-fache an. Anschließend wird das hinzugefügte Substrat Luciferin in Anwesenheit des ATP durch die Luciferase oxydiert und Photonen werden emittiert [8]. Dieses entstehende Licht wird schließlich mit einem Luminometer detektiert (Abb. 1).

Das emittierte Licht wird in Relative Light Units (RLU) angegeben. Die Ergebnisse der Testansätze werden mit dem RLU einer mitgeführten Negativkontrolle (Baseline) verglichen und als „negativ“ (RLU-Probe < 3 x RLU Baseline) oder als „positiv“ (RLU-Probe ≥ 3 x RLU Baseline) ausgegeben. Es handelt sich hierbei analog zur Standard-Sterilprüfung um eine rein qualitative Analyse.

Somit ist die AMPiScreen-Methode nicht von einer begrenzten ATP-Konzentration in einem Mikroorganismus abhängig, sondern beruht auf der ATP-Verstärkung durch die Reaktion der Adenylatkinase. Zusätzlich wird das Messsignal durch einen Photomultiplier verstärkt.

Allerdings muss beachtet werden, dass diese Methode primär für nicht zelluläre Produkte geeignet ist, da sowohl prokaryotisches als auch eukaryotisches ATP detektiert wird. Obwohl es Möglichkeiten gibt, eukaryotisches ATP zu eliminieren, um nur mikrobielles ATP zu detektieren, bezieht sich die in diesem Artikel beschriebene Validierung nur auf nicht zelluläre Produkte.

Für die Validierung dieser qualitativen Methode werden in den Richtlinien unterschiedliche Anforderungen beschrieben (Tab. 1).

Als Dienstleistungslabor, welches auch Freigabeuntersuchungen an Produkten mit FDA-Relevanz durchführt, wurde eine Konformität mit allen 3 Richtlinien angestrebt. Hierfür mussten die verschiedenen Anforderungen miteinander verglichen und ein geeignetes Konzept für die Validierung erstellt werden. In dieser Validierungsphase ist v. a. bei produktspezifischen Validierungen der Kontakt und Austausch mit den Behörden als sinnvoll zu

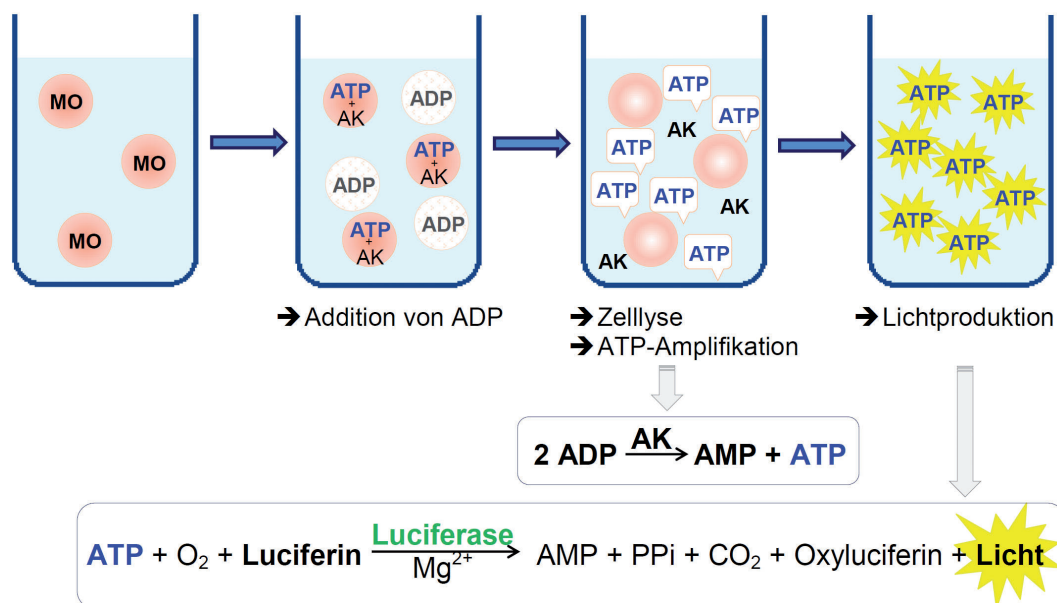


Abbildung 1: Darstellung der ATP-Biolumineszenz-Reaktion mittels Charles River's Celsis®-AMPiScreen-Technologie bei Anwesenheit von Mikroorganismen (MO). Zuerst wird ADP zur Probe hinzugefügt. Nach Zugabe eines weiteren Reagenz werden die Zellen lysiert, wodurch ATP und das Enzym Adenylatkinase (AK) frei vorliegen. Die AK wandelt das hinzugefügte ADP in einem Amplifizierungsschritt zu ATP um. In Anwesenheit des Substrats Luciferin nutzt anschließend das Enzym Luciferase die Energie des ATP, um Luciferin zu oxidieren, wobei Photonen produziert werden und Licht entsteht (Quelle der Abbildung: Carolin Fromm/Labor L + S AG).

■ **Tabelle 1**

Vergleich der Anforderungen der 3 Richtlinien zur Validierung einer qualitativen Alternativmethode.

Parameter	Ph. Eur. 5.1.6	USP <1223>	PDA TR No. 33
Spezifität	ja	ja	ja
Nachweisgrenze	ja	ja	ja
Präzision	ja	Wiederholpräzision	nein
Richtigkeit	ja	nein	nein
Robustheit	ja	ja	ja
Unempfindlichkeit	nein	ja	ja
Äquivalenz- oder Vergleichstest	ja (unter Verwendung von Produkten)	ja (ohne Produkt)	ja (unter Verwendung von Produkten)

erachten. Das Konzept der vorliegenden Methodenvalidierung wurde dem PEI schriftlich vorgelegt und der FDA im Rahmen einer cGMP-Inspektion vorgestellt. Die Resonanz der Behörden fiel in beiden Fällen positiv aus.

Aufgrund der enormen Anzahl diverser Formulierungen, welche einem Auftragslabor tagtäglich zur Prüfung vorliegen, ist es im direkten Vergleich zu Herstellern, die nur über eine definierte Anzahl an Produkten verfügen, nicht möglich, jedes dieser Produkte im Rahmen einer Methodenvalidierung zu berücksichtigen. Stattdessen muss ein Dienstleistungslabor sicherstellen, dass die Alternativmethode im Allgemeinen äquivalent zur Stan-

dardmethode sowie auf eine möglichst große Anzahl von Produkten unterschiedlicher Matrices anwendbar ist. Deshalb wurde die Validierung in entsprechende Teilschritte gegliedert:

- allgemeine Methodenvalidierung ohne Produkt (Vergleich beider Methoden)
- Methodeignungstest unter Verwendung von Produkten (nur Alternativmethode)
- Äquivalenzprüfung unter Verwendung von Produkten (Vergleich beider Methoden)

Die Durchführung gemäß den aktuell geltenden Richtlinien sowie die ermittelten Ergebnisse der Validierung

sind nachfolgend dargestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Durchführung und Auswertung der Prüfansätze

Für die Prüfung auf Sterilität wurde im Rahmen der Validierung die Membranfiltration gewählt, da bei dieser das Testsystem und die Filtermembran als zusätzliche Einflussfaktoren angesehen wurden. Die Membranfiltration wurde gemäß den Vorgaben der Ph. Eur. 2.6.1 und USP <71> durchgeführt. Für den Vergleich der beiden Methoden wurden diese parallel angesetzt.

Nach 7 Tagen Inkubation wurden die Ansätze des schnellen Steriltests mittels ATP-Biolumineszenz-Technologie ausgewertet. Für die mikrobielle Detektion wurde das Celsis-Advance-Coupe-System verwendet. Nach der 7-tägigen Inkubationszeit wurden Aliquote (in Duplikaten) aus den inkubierten Ansätzen entnommen und unter Verwendung des AMPiScreen 800 Health Kits mittels Celsis-Advance-Coupe-Luminometer gemessen. Anhand der erhaltenen RLU wurden Rückschlüsse auf eine mikrobielle Kontamination gezogen.

Nach 14 Tagen Inkubation erfolgte die Auswertung des Standard-Steriltests gemäß den Vorgaben der Pharmakopöen [1, 2]. Hierbei wurden die Ansätze auf makroskopisch sichtbares Wachstum (Trübung) durch 2 qualifizierte Labormitarbeiter unabhängig voneinander überprüft.

2.2 Validierung

Vor Beginn der allgemeinen Methodenvalidierung wurden verschiedene Vortests durchgeführt, um eine geeignete Testdurchführung festlegen zu können. Es wurden u. a. folgende Parameter geprüft:

- Austestung verschiedener Nährmedien und Inkubationszeiten
- Optimierung der Stressbedingungen
- Überprüfung der Anwendbarkeit der Methode auf ein großes mikrobielles Spektrum inklusive Worst-Case-Mikroorganismen wie *Propionibacterium acnes* oder auch gestresste Mikroorganismen

Nach Identifizierung der optimalen Bedingungen für die zuvor genannten Parameter wurde mit der allgemeinen Methodenvalidierung begonnen und die Parameter Spezifität, Nachweisgrenze, Präzision, Richtigkeit, Robustheit und Unempfindlichkeit überprüft. Anstelle von Produkten wurden Waschflüssigkeiten (Spülpuffer) artifiziell kontaminiert und filtriert. Für die Inokulation wurden grampositive, gramnegative, aerobe, anaerobe, sporenbildende, schnell wachsende und langsam wachsende Mikroorganismen, Hefen, Pilze, Mikroorganismen aus Out-of-Specification-Resultaten sowie Hauskeime verwendet. Es wurde geprüft, ob alle Mikroorganismen detektiert und eindeutig identifiziert (mittels MADLI-ToF) werden können, ob die Alternativmethode präzise und richtig ist und ob auch ein einzelner Mikroorganismus nachgewiesen werden kann. Für die Bestimmung der Nachweisgrenze wurden somit Keimsuspensionen mit einer definierten Anzahl koloniebildender Einheiten (0,1–10 KBE) in mehreren Replikaten mit beiden Methoden parallel getestet. Zudem wurde unter dem Parameter Robustheit überprüft, ob absichtlich eingefügte Variationen, wie z. B. unterschiedliche Nährmedien, Einsatz gestresster Mikroorganismen, verschiedene Filtersysteme usw., Einfluss auf das Ergebnis der Alternativmethode haben. Mit der Prüfung auf Unempfindlichkeit sollte festgestellt werden, ob unvermeidbare Veränderungen wie unterschiedliche Reagenzien-Chargen oder verschiedene Labormitarbeiter das Messergebnis beeinflussen.

Nach der allgemeinen Methodenvalidierung kamen 5 Produkte verschiedener Kategorien zum Einsatz: eine parenterale Lösung (Arzneimittel), eine Elektrolytlösung (Medizinprodukt), ein Pulver zur Herstellung einer Infektionslösung, ein öliges Produkt und ein farbstoffhaltiges Präparat. Aufgrund der Sterilität der Produkte mussten diese artifiziell kontaminiert werden. Für die Filtration wurde das Produktvolumen verwendet, welches gemäß Arzneibuch vorgeschrieben ist.

In einem Methodeneignungstest musste jedes Produkt zunächst auf Interferenzen mit der alternativen Detektionsmethode geprüft werden. Hier war es wichtig, neben dem Einsatz von Negativ- und Positivkontrollen auch falsch-negative Ergebnisse durch mögliche antimikrobielle Produkteigenschaften und falsch-positive Ergebnisse, welche z. B. durch freies ATP oder Interferenzen des Produkts mit der Detektionsmethode auftreten können, auszuschließen. Für diese Tests wurden 6 ATCC-Testkeime verwendet. Nach einem erfolgreich abgeschlossenen Methodeneignungstest konnte der Äquivalenztest unter paralleler Prüfung

beider Methoden durchgeführt werden. Hierfür wurden verschiedene Mikroorganismen in unterschiedlichen Konzentrationen und mehreren Replikaten eingesetzt.

2.3 Statistische Evaluation

Die Belegung der Äquivalenz beider Methoden erfolgte durch eine statistische Auswertung. Diese wurde sowohl bei dem Parameter Nachweisgrenze als auch bei der Äquivalenzprüfung unter Verwendung verschiedener Produkte eingesetzt. Es wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt, welcher für den statistischen Nachweis der Äquivalenz vorgeschlagen wird [5–7]. Als Nullhypothese wurde festgelegt, dass die Ergebnisse der Alternativmethode äquivalent bzw. nicht statistisch signifikant schlechter sein dürfen als die der Standardmethode. Der χ^2 -Wert muss hierfür bei einem 5%-Signifikanzlevel kleiner als 3,841 sein.

3. Ergebnisse

Nach erfolgreichem Abschluss der Vorversuche und einer festgelegten Inkubationszeit von 7 Tagen wurden alle Parameter, die für eine erfolgreiche Validierung einer qualitativen Methode in den Pharmakopöen genannt sind (Tab. 1), getestet.

Im Rahmen der Spezifitätsprüfung konnte gezeigt werden, dass mit der Alternativmethode sowie der Standardmethode alle ausgewählten Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und Pilze aus Referenzstämmen sowie Isolate und Worst-Case-Mikroorganismen wie *P. acnes* und gestresste Mikroorganismen) detektiert und korrekt identifiziert werden konnten. Zudem lieferte die Alternativmethode präzise und richtige Ergebnisse, da inokulierte Ansätze zu positiven und nicht inokulierte Ansätze zu negativen Ergebnissen führten. Die Robustheit konnte ebenfalls belegt werden, indem gezeigt wurde, dass Variationen wie z. B. die Applikation von Stress, Verwendung von Nährmedien mit Enthemmern (Lecithin, Polysorbat) oder auch der Einsatz verschiedener Filtersysteme keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Zudem erwies sich die Methode als unempfindlich gegenüber dem Einsatz unterschiedlicher Reagenzien-Chargen oder auch gegenüber der Testdurchführung durch verschiedene Labormitarbeiter.

Eine besondere Rolle bei der allgemeinen Methodenvalidierung nahm die Bestimmung der Nachweisgrenze ein, bei der beide Methoden parallel getestet wurden. Die Anzahl positiver und negativer Ergebnisse beider Methoden ist in Tab. 2 aufgelistet.

Der erhaltene χ^2 -Wert mit 0,090 erfüllte das Akzeptanzkriterium ($\chi^2 < 3,841$), wodurch die Äquivalenz der beiden Methoden gezeigt werden konnte.

Nach erfolgreichem Abschluss der allgemeinen Methodenvalidierung wurden diverse Produkte eingesetzt (parenterale Lösung, Elektrolytlösung, Pulver zur Herstellung einer Infektionslösung, öliges Produkt, farbstoffhaltiges Präparat). Beim Methodeneignungstest dieser Produkte konnten keine Interferenzen wie falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse mit der Detektionsmethode

festgestellt werden. Die Produkte erwiesen sich somit als geeignet gegenüber der Alternativmethode.

Die Ergebnisse der anschließenden Vergleichsprüfung beider Methoden unter Verwendung von Produkten sind in Tab. 3 aufgeführt. Hierbei sind die Ergebnisse aller getesteten Produkte unter Einsatz verschiedener Mikroorganismen, Keimdichten und Replikate zusammenfassend dargestellt.

Da mit der Alternativmethode ebenso viele positive und negative Ergebnisse wie mit der Standardmethode

erzielt wurden, lag der Chi-Quadrat-Wert bei 0,00, wodurch die Äquivalenz der Methoden belegt werden konnte. Auch bei separater Betrachtung der Produkte erfüllte der χ^2 -Wert stets das geforderte Akzeptanzkriterium.

Sowohl die allgemeine Methodvalidierung als auch die Vergleichsprüfung unter Verwendung diverser Produkte mit vorheriger Eignungsprüfung haben den Akzeptanzkriterien entsprochen. Eine Zusammenfassung der Validierungsergebnisse ist in Tab. 4 dargestellt.

■ **Tabelle 2**

Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenze (Pool aus allen getesteten Mikroorganismen und Konzentrationen).

Methode	Anzahl positiver Ergebnisse	Anzahl negativer Ergebnisse	Gesamt
Alternativmethode	203	157	360
Standardmethode	199	161	360
Gesamt	402	318	720

■ **Tabelle 3**

Ergebnisse der Äquivalenzprüfung diverser Produkte (Pool aus allen getesteten Produkten, Mikroorganismen und Konzentrationen).

Methode	Anzahl positiver Ergebnisse*	Anzahl negativer Ergebnisse*	Gesamt
Alternativmethode	174	114	288
Standardmethode	174	114	288
Gesamt	348	228	576

*Es wurden nur 4 der 5 Produkte im Äquivalenztest geprüft.

■ **Tabelle 4**

Ergebnisse der erfolgreichen Validierung des schnellen Steriltests im Überblick.

Parameter (s. Tab. 1)	Forderung	Ergebnis
Spezifität	Detektion und Identifikation aller getesteten Mikroorganismen	Erfüllt
Nachweisgrenze	Äquivalenz zur traditionellen Methode	Erfüllt
Präzision	präzise Ergebnisse der Alternativmethode	Erfüllt
Richtigkeit	richtige Ergebnisse der Alternativmethode	Erfüllt
Robustheit	kein Einfluss von absichtlich eingefügten Variationen	Erfüllt
Unempfindlichkeit	kein Einfluss von unvermeidbaren Variationen	Erfüllt
Äquivalenztest	Äquivalenz zur traditionellen Methode unter Verwendung diverser Produkte	Erfüllt

4. Diskussion

Das Ziel einer Validierung besteht darin, zu zeigen, dass die neue Methode zuverlässig und für den vorgesehenen Zweck geeignet ist [7]. Dabei ist Voraussetzung, dass die Alternativmethode statistisch äquivalent bzw. nicht schlechter als die Standardmethode ist. Die im Rahmen der Validierung generierten Ergebnisse bestätigten, dass die neue Methode eine für die hier geprüften Produkte sichere und schnellere Alternative zur klassischen Sterilprüfung ist. Die Alternativmethode erwies sich als präzise, richtig, robust sowie unempfindlich und es war möglich, ein breites mikrobielles Spektrum spezifisch nachzuweisen. Zudem konnte in rund 1400 Ansätzen gezeigt werden, dass die Alternativmethode und die Standardmethode vergleichbar sind und äquivalente Ergebnisse lieferten.

Als Grundlage für die Validierung dienten die 3 Richtlinien Ph. Eur. 5.1.6, USP <1223> und PDA TR No. 33. Für ein Dienstleistungslabor, das Freigabeuntersuchungen unterschiedlichster Produkte (z.B. auch Produkte mit FDA-Relevanz) durchführt, ist es wichtig, mit den in den jeweiligen Ländern geltenden Richtlinien konform zu sein. Die Konformität mit allen 3 Richtlinien wurde deshalb für die Validierung des schnellen Steriltests angestrebt. Basierend auf deren Anforderungen wurden alle Parameter aus Tab. 1 in die Validierung miteinbezogen und die Ergebnisse erfüllten die gesetzten Akzeptanzkriterien. Die erfolgreiche Validierung ermöglichte somit eine Einführung des schnellen Steriltests als Routineprüfung im Labor.

Von großer Bedeutung für ein Dienstleistungslabor war für die Validierung des schnellen Steriltests die Auswahl einer geeigneten Methode, um möglichst viele Produkte prüfen zu können. Die Methodenwahl für die in diesem Artikel beschriebene Validierung fiel auf die Charles River's Celsis®-AMPiScreen-Technologie, da diese bestimmte Vorteile bietet: Zum einen ist die Methode wachstumsbasiert und dementsprechend der Standardmethode sehr ähnlich. Sie erlaubt zudem eine Probenvorbereitung wie bei der Arzneibuchmethode mittels Membranfiltration oder auch Direktinokulation. Des Weiteren handelt es sich um ein nicht destruktives Verfahren, wodurch im Fall einer Unsterilität eine Identifizierung des verursachenden Mikroorganismus möglich ist. Durch die reduzierte Inkubationszeit kann eine frühzeitige adäquate Ursachenanalyse z.B. mittels molekularbiologischer Typisierung erfolgen um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können [9].

Ein weiterer Vorteil des schnellen Steriltests mittels AMPiScreen-Assay liegt darin, dass es sich um ein automatisiertes System handelt. Das Risiko menschlicher Fehler wird reduziert, da keine subjektive Auswertung wie bei der traditionellen Sterilprüfung stattfindet. Bei dieser kann bereits eine Trübung durch das Produkt die visuelle Detektion beeinflussen. Die durch die Automatisierung

gewährleistete Datenintegrität und somit auch verbesserte und beschleunigte Qualitätskontrolle sind ebenfalls zentrale Kriterien, die für den Einsatz einer Alternativmethode sprechen.

Die Herausforderung von Sterilprüfungen besteht allgemein darin, Kontaminationen feststellen zu können, selbst wenn diese sehr selten vorkommen. Auch soll bereits der Nachweis eines einzelnen Mikroorganismus gewährleistet sein. Folglich ist die Bestimmung der Nachweisgrenze einer der wichtigsten Parameter, der für die Validierung des schnellen Steriltests geprüft werden musste. Da es bei einem biologischen System nahezu unmöglich ist, ein Inokulum von nur 1 KBE genau herzustellen, wurden verschiedene Keimsuspensionen im Bereich von 0,1–10 KBE mit und ohne Produkt getestet. Positive Ergebnisse bei den theoretisch berechneten Konzentrationen unterhalb von 1 KBE legten dar, dass auch ein einzelner Mikroorganismus nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer limitierender Faktor, v.a. einer kulturellen Methode, ist die Inkubationszeit. Folgt man den Empfehlungen der Richtlinien zur Validierung einer Alternativmethode sollen auch langsam wachsende Mikroorganismen wie *Propionibacterium acnes* und gestresste Mikroorganismen in die Validierung einbezogen werden. Gerade im Pharmaumfeld sind Mikroorganismen Stressbedingungen bei der Produktherstellung ausgesetzt, wie z.B. Hitze, UV-Licht oder auch Kontakt mit Desinfektionsmitteln. Um gestresste Mikroorganismen in die Prüfung miteinbeziehen zu können, galt es, den Stress in vitro zu simulieren. Dies wurde mittels Hitzestress in Anlehnung an Gray et al. durchgeführt [10]. Um den Nachweis dieser Mikroorganismen sicherzustellen, wurde im Vorfeld der Validierung eine Time-to-detect-Studie durchgeführt, in der verschiedene Inkubationszeiten getestet wurden. Anhand dieser konnte festgelegt werden, dass nach nur 7 Tagen Inkubation auch diese Worst-Case-Mikroorganismen detektiert werden konnten, weshalb die Inkubationszeit für den schnellen Steriltest auf die Hälfte der regulären Zeit reduziert werden konnte.

Aufgrund dieser frühzeitigen Ergebnisse können die mithilfe des schnellen Steriltests untersuchten Produkte früher freigegeben werden, was zu verringerten Lagerkosten bei den Produktherstellern führt und indirekt die Versorgungssicherheit gegenüber dem Patienten verbessert. Zusätzlich können bei einer vorliegenden mikrobiellen Kontamination schneller Korrekturmaßnahmen getroffen und dadurch auch die Anzahl potenziell betroffener Chargen reduziert werden.

Doch kann die Alternativmethode auch für jedes Produkt eingesetzt werden? Das Nachweisverfahren beruht auf der Detektion von ATP und einem Amplifizierungsschritt durch das Enzym Adenylatkinase. ATP und Adenylatkinase kommen in allen lebenden Organismen, also sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen, vor. Die beschriebene Validierung wurde daher

primär für nicht zelluläre Produkte durchgeführt. Für jedes zu untersuchende Produkt müssen, wie bei der traditionellen Sterilprüfung auch, mögliche Effekte auf das mikrobielle Wachstum in einer Eignungsprüfung untersucht werden [1, 2]. Zusätzlich müssen Interferenzen mit der Detektionsmethode, die z.B. zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen können, ausgeschlossen werden [7]. Die Biolumineszenz-Reaktion kann z.B. durch Trübung, Produktfarbe, Anwesenheit von Phosphat oder von Substanzen, die die Enzym-Reaktion inhibieren, beeinflusst werden. Dies gilt es mittels Methodeneignungstest auszuschließen. Als Dienstleistungslabor, welches diverse Produkte unterschiedlichster Matrices untersucht, lag der Anspruch jedoch nicht darauf, alle Produkte in diesen Test miteinzubeziehen. Deshalb wurden aus der großen Produktanzahl exemplarisch 5 Produkte verschiedener Kategorien ausgewählt. Diese wurden zunächst auf ihre Eignung mit der Alternativmethode geprüft und anschließend wurde eine parallele Untersuchung mit der traditionellen Sterilprüfung zur Äquivalenzprüfung durchgeführt. Eine große Herausforderung bestand hier v.a. darin, dass große Produktmengen für die Äquivalenzprüfung während der Validierung benötigt wurden, da das eingesetzte Produktvolumen dem der Standardprüfung entsprach und mehrere Replikate in unterschiedlichen Keimdichten und verschiedenen Mikroorganismen getestet wurden. Hier war man als Dienstleistungslabor auf die Bereitstellung der Produkte von Kunden angewiesen. Bei einem der ausgewählten Produkte wäre jedoch die komplette Produktionscharge für die Äquivalenzprüfung benötigt worden. Deshalb wurde für dieses Produkt nur ein Methodeneignungstest durchgeführt. Dieser ist für jedes Produkt, welches mithilfe des schnellen Steriltests geprüft werden soll, routinemäßig notwendig.

Mithilfe der Validierung konnte gezeigt werden, dass der schnelle Steriltest eine geeignete Alternative zur Standardmethode ist und als Routineverfahren im Labor angewendet werden kann. Es muss jedoch beachtet werden, dass für jedes Produkt aufgrund verschiedener Eigenschaften eine produktspezifische Eignungsprüfung weiterhin zwingend erforderlich ist.

5. Fazit

Mikrobiologische Alternativmethoden werden von Behörden generell befürwortet und es gibt derzeit 3 wichtige GMP-relevante Richtlinien für deren Validierung. Dennoch haben sich Schnellmethoden bisher nicht flächendeckend durchgesetzt, da viele den enormen initialen Validierungsaufwand hier mit über einem Jahr Zeitaufwand, Kosten im sechsstelligen Bereich sowie dem Umschreiben des Dossiers scheuen. Mit breitem technischem

und mikrobiologischem Know-how konnte dieses zeitintensive Projekt „Validierung eines schnellen Steriltests“ jedoch erfolgreich abgeschlossen und mit der Untersuchung verschiedenster Parameter die Äquivalenz zur traditionellen Sterilprüfung statistisch gezeigt werden. Auch mit dem Einsatz diverser Produkte konnte die Eignung der Alternativmethode sichergestellt werden. Mit zuverlässigen und robusten Ergebnissen nach nur 7 Tagen Inkubation ist der schnelle Steriltest mittels ATP-Biolumineszenz eine valide Alternative zur traditionellen Sterilprüfung gemäß Arzneibuchmethode. Besonders bei der Einführung neuer Produkte lohnt sich der Blick über den Tellerrand und hin zu potenziellen Alternativverfahren, die u.U. schnellere, robustere oder integrere Ergebnisse liefern können.

Danksagung

Ein großer Dank geht an alle Unternehmen, die ihre Produkte für die Äquivalenzprüfung zur Verfügung gestellt haben.

LITERATUR

- [1] United States Pharmacopoeial Convention. USP: Chapter <71> (2015) Sterility Tests. USP 39/NF 34. pp. 136.
- [2] European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. Pharmeuropa: Ph. Eur. Chapter 2.6.1 (2014) Sterility. 8th edition supplement 8.8. pp. 175.
- [3] British Pharmacopoeia Commission Office MHRA. British Pharmacopoeia: Volume V Appendix XVI A. (2017) Test for Sterility. V-A489–492.
- [4] Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeia: Chapter 4.06 (2016) Sterility Test. 17th edition. pp. 130.
- [5] European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. Pharmeuropa: Ph. Eur. Chapter 5.1.6 (2014) Alternative Methods for Control of Microbiological Quality. 8th edition supplement 8.8. pp. 560.
- [6] United States Pharmacopoeial Convention. USP: Chapter <1223> (2015) Validation of alternative microbiological methods. USP 38/NF 34. pp. 1616.
- [7] Parenteral Drug Association. PDA (2013) Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological Methods. Technical Report No. 33 (Revised 2013).
- [8] Celsis a Charles River Company (2015) Celsis Amplified ATP-Technology. Abrufbar unter: <http://www.criver.com/files/pdfs/emd/celsis/sell-sheet-ampiscreen.aspx>
- [9] European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. Pharmeuropa: Ph. Eur. Chapter 5.1.9 (2014) Guidelines for using the test for sterility. 8th edition supplement 8.8. p. 572.
- [10] Gray JC, Staerk A, Berchtold M, Hecker W, Neuhaus G, Wirth A. Growth-promoting Properties of Different Solid Nutrient Media Evaluated with Stressed and Unstressed Micro-organisms: Prestudy for the Validation of a Rapid Sterility Test. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2010 May–Jun;64(3):249–63.

Der Link wurde zuletzt am 6. April 2017 abgerufen.