

Mikrobiologische Kontrolle von Wasser in neuem Licht

Echtzeitdaten für Bioburden erhöhen die Prozesssicherheit

Anja Lattrell • Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Korrespondenz: Anja Lattrell, Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen;
e-mail: Anja.Lattrell@mt.com

Zusammenfassung

Wasser ist ein essenzieller Rohstoff für die Pharmaindustrie und unterliegt strengen gesetzlichen Vorgaben. Die bisherige Methode der Plattentests zur Messung der Keimbelastung (Bioburden) ermöglicht allerdings nur stichprobenhafte Informationen über die Wasserqualität mit einer zeitlichen Verzögerung von bis zu 5 Tagen. Eine neue Methode zur Keimzahlbestimmung mittels laserinduzierter Fluoreszenz und Streulichtmessung bietet ein konstantes Monitoring der Wasseranlage in Echtzeit. Im Folgenden werden die beiden Methoden verglichen und besonders die Vorteile der neuen Methode für die Prozesssicherheit hervorgehoben.

Gesetzliche Vorgaben für Pharmawasser

Wasser ist die Grundlage der meisten pharmazeutischen Applikationen und damit ein zentraler Punkt für die Prozesssicherheit. Die Grenzwerte für Wasser verschiedener Qualitätsstufen sind in den jeweiligen Arzneibüchern geregelt. In Deutschland kommen insbesondere die US-amerikanische (USP) und die europäische Pharmakopöe (EP) zum Tragen. Beide Arzneibücher fordern die Einhaltung derselben Grenzwerte. Eine internationale Angleichung der Anforderungen wird seit Jahren angestrebt.

Die aktuelle Arzneibuchmethode zur Bestimmung der mikrobiologischen Belastung (Bioburden) des Wassers ist der Plattentest. Das bedeutet die Filtration einer definierten Menge Wasser durch einen Filter mit einer maximalen Porengröße von 0,45 µm und die anschließende Inkubation auf einem definierten Agar unter bestimmten Bedingungen [1]. Die Grenzwerte (Koloniebildende Einheit, KBE) sind wie folgt festgelegt:

- Wasser für Injektionszwecke: 10 KBE/100 ml
 - Aqua purificata: 100 KBE/ml
- Die Vorgaben für das mikrobiologische Monitoring sind vage und haben dennoch direkten Einfluss auf den Prozess. Die EP spricht von „*appropriate measures*“, die USP schreibt „*Pharmaceutical water systems should be monitored at a frequency that ensures the system is in control and continues to produce water of acceptable quality*“ [1, 2].

Für die Anlagenbetreiber stellt sich damit vor allem die Frage der Kosten-Nutzen-Rechnung. Wie viele Proben sind nötig, um die geforderte Prozesssicherheit zu erhalten, ohne den Kostenrahmen zu sprengen? Besonders zu personalschwachen Zeiten wie am Wochenende oder in der Nacht ist das Risiko für die Produktion erhöht. Eine kontinuierliche Überwachung kann hier eine Risikoreduktion ohne zusätzliche Personalkosten bieten.

Auch im Rahmen der Process-Analytical-Technology (PAT)-Initiative wird der Fokus immer weiter auf kontinuierliche Messmethoden für

Key Words

- Keimzahlbestimmung
- Keimzahl
- Keimbelastung
- Plattentest
- Sanitisierung

die Überwachung der Wasserqualität gelegt. Für die Bestimmung des Total Organic Carbon (TOC) wird bereits eine Online-Messung empfohlen [3] und auch für die mikrobiologische Untersuchung wird dies durch die Kapitel USP <1223> und EP 5.1.6 „Alternative Methoden zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität“ gefördert.

Autor



Anja Lattrell

Anja Lattrell ist Diplom-Biologin mit einem Fokus auf Mikrobiologie. Nach dem Studium startete sie in einem Labor an einem Universitätsklinikum. Von dort wechselte sie in den technischen Vertrieb bei einem Laborfachhändler, um nach 2 Jahren als Produktspezialistin das neue Real-Time-Microbe-System bei Mettler-Toledo zu betreuen, wo sie seit einem Jahr tätig ist.

Neue Messtechnologie für Echtzeitdaten

Eine neue Messtechnologie (Abb. 1) macht sich 2 bewährte Methoden zu-nutze, die erstmals in Kombination eingesetzt werden, um Bakterien zu detektieren. Auf der einen Seite handelt es sich um die Partikelmessung durch Mie-Streuung, denn ein Bakterium ist im Grunde nur ein Partikel. Auf der anderen Seite steht die laserinduzierte Autofluoreszenz von Stoffwechselprodukten wie Nicotinamidadeninindinukleotid (NADH) in Bakterien (Abb. 2 und 3). Diese Art der Fluoreszenzspektroskopie wird weitverbreitet zur Detektion von Bakterien genutzt und bietet den einzigartigen Vorteil, dass auch lebende, aber nicht kultivierbare Bakterienzellen (viable but not culturable, VBNC) gemessen werden [4]. Daraus resultiert die Ausgabe von Autofluoreszenzeinheiten (autofluorescent unit, AFU) als Einheit der mikrobiologischen Belastung des Wassers.

Für ein konstantes Monitoring wird das Messgerät fortlaufend über einen Bypass der Ringleitung mit Wasser gespeist, das mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/min durch das Gerät gepumpt wird. Das Wasser geht danach in den Verwurf und verhindert so eine Rückkontamination



Abbildung 1: Aufbau des Messgeräts. Die Hülle besteht aus Edelstahl, eine Überlaufkammer puffert Druckschwankungen im Kreislauf ab. Die Bedienung ist direkt über den Touchscreen möglich (Quelle aller Abbildungen: Mettler-Toledo).

der Ringleitung. Somit spart sich der Anwender die fehleranfälligen Probennahmen, die immer wieder falsch positive Ergebnisse und eine darauffolgende teure Untersuchung zur Identifikation der gefundenen Keime nach sich ziehen.

Ein weiterer Vorteil der neuen Methode gegenüber den bisherigen Plattentests ist der Zeitfaktor. Die Zeit von der Probennahme bis zum Resultat der Plattentests kann bis zu 1 Woche betragen. Dagegen liegen die Ergebnisse mit der neuen Messtechnik sofort vor. Die minimale Antwortzeit

beträgt 2 Sekunden für Angaben je ml. Dadurch erhöht sich die Menge an Informationen über den Zustand des Prozesses von im besten Fall einer Messung pro Tag auf mehrere hundert bis tausend Messungen. Das wiederum ermöglicht genaue Trendings und Langzeitdaten über die Anlage mit tageszeitlichen und auch jahreszeitlichen Schwankungen.

Auch die Produktsicherheit ist direkt an die Geschwindigkeit der mikrobiologischen Untersuchung gekoppelt. Bei Plattentests erhält man

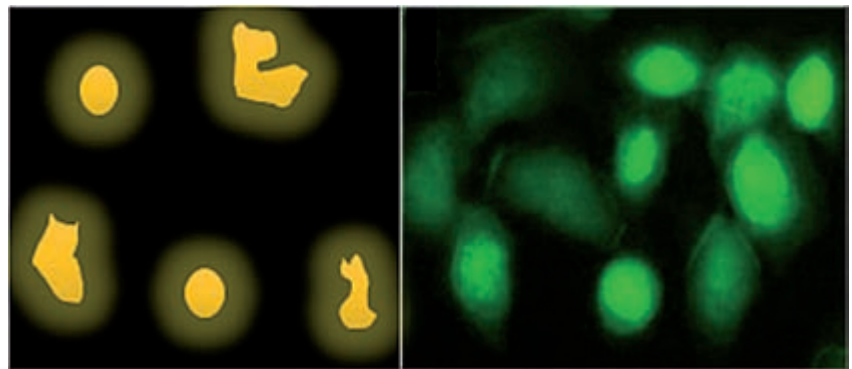


Abbildung 2: Gemessene Parameter. Detektion von Partikeln durch Streulichtmessung (links) und von Stoffwechselprodukten in Bakterien durch Fluoreszenzmessung (rechts).

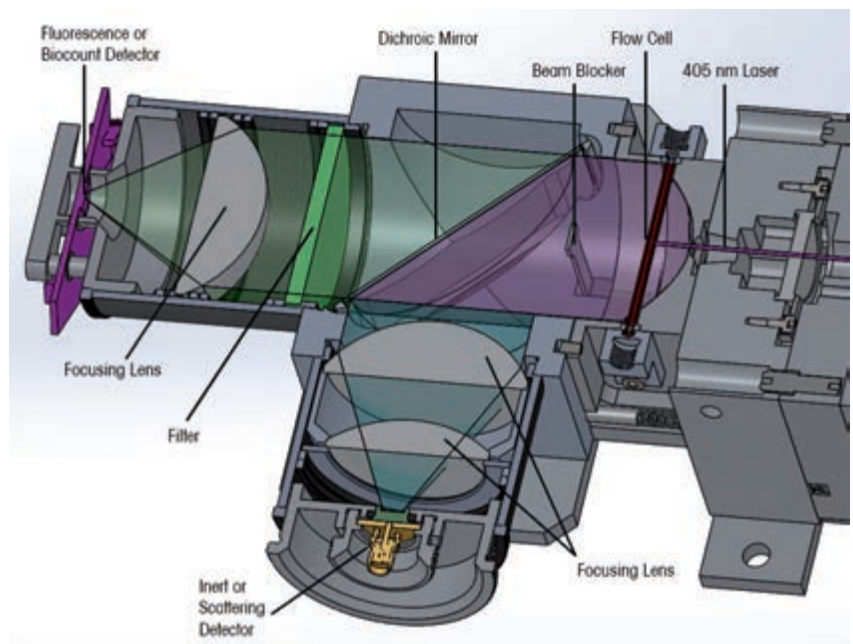


Abbildung 3: Aufbau der Messkammer. Das Wasser fließt durch die Durchflussküvette (gekennzeichnet durch „Flow Cell“) und wird mit einer 405-nm-Laserdiode beleuchtet. Das entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht wird durch einen dichroischen Spiegel getrennt und auf die beiden Detektoren geleitet.

die Information über eine Kontamination erst nach der Produktion – im schlimmsten Fall erst, wenn das Endprodukt bereits ausgeliefert wurde und man es zurückrufen muss. Mit der neuen Online-Messtechnologie erhält der Anwender Echtzeitdaten und kann bei Bedarf die Produktion stoppen, bevor das teure Endprodukt überhaupt entsteht. Somit bringt die Zeitersparnis gleichzeitig auch eine Kostenreduktion mit sich.

Das größte Defizit der bisherigen Plattentests ist allerdings ihre Ungenauigkeit. Eine Kolonie ist eine sichtbare Ansammlung von Zellen, die durch Teilung entstanden sind [5]. Es gibt weder eine Aussage darüber, aus wie vielen Zellen sie ursprünglich entstanden ist, noch darüber, aus wie vielen Zellen sie besteht [5]. Daher schreibt die USP auch deutlich, dass die KBE nur eine Schätzung der Keimzahl ist [2]. Daneben erholen sich laut USP nur etwa 0,1–1 % der Bakterien einer Probe, um überhaupt eine Kolonie zu bilden [2]. Dies bedeutet: Wenn man eine Wasserprobe abfiltriert und den Filter danach auf einer Agarplatte bebrütet, erholt sich nur ein Bruchteil der im Wasser vorhandenen Bakterien (nämlich 0,1–1 %) überhaupt so weit, dass sie eine Kolonie bilden können. Laut USP detektiert der Plattentest also maximal 0,1–1 % der tatsächlich im

Wasser vorhandenen Bakterien. Fügt man noch die VBNC-Bakterien hinzu, so bietet die neue Messtechnologie bedeutend verlässlichere, präzisere Daten, aufgrund derer der Anwender eine fundierte Entscheidung zum Zustand seiner Anlage treffen kann (Abb. 4).

Das neue Verfahren bietet zusammengefasst folgende Vorteile gegenüber der alten Methode:

- Verringerung der kosten- und zeitintensiven Plattentests durch kontinuierliche Messung
- Vermeidung menschlicher Fehler
- präzisere Daten durch Messung einzelner Bakterien
- Detektion bisher nicht gemessener Bakterien (VBNC)
- schnellere Produktfreigabe

Insgesamt ermöglicht das neue Messgerät eine schnellere und sicherere pharmazeutische Produktion sowie eine deutliche Zeit- und Kostenersparnis.

Dauerhafte Verbesserung der Prozesssicherheit

2 weitere Faktoren üben Einfluss auf die Prozesssicherheit und die mikrobiologische Kontrolle der Anlage aus. Um die Bildung von Biofilmen zu verhindern oder sie zu beseitigen, existieren verschiedene Sanitisierungsmöglichkeiten, die sich in thermische

und chemische Verfahren unterteilen. Zu den thermischen Verfahren zählen das Erhitzen auf >80 °C oder die Sanitisierung mit Heißdampf. Chemische Verfahren nutzen z.B. Ozon oder Wasserstoffperoxid. Allen gemeinsam sind der Kostenfaktor, aber auch die Notwendigkeit, die gesetzlichen Vorgaben an die Wasserqualität einzuhalten.

Üblicherweise beruhen Sanitisierungszyklen auf Erfahrungswerten, die über Jahre und Jahrzehnte hinweg gesammelt wurden. Wenig Beachtung findet hingegen die Erfolgskontrolle der eingesetzten Methode. Wurde tatsächlich der komplette Biofilm entfernt? Die kontinuierliche Überwachung der Keimzahl mit dem neuen Messgerät bietet sowohl für die Sanitisierungszyklen als auch für die Erfolgskontrolle derselben eine Lösung. Da die Anlage konstant in Echtzeit überwacht wird, ist es möglich, Sanitisierungszyklen zu reduzieren und nur dann anzuwenden, wenn die Anlage tatsächlich einen Anstieg der Keimzahl zeigt. Dies spart bares Geld. Die Erfolgskontrolle für die eingesetzte Sanitisierungsmethode hingegen erhöht die Prozesssicherheit nach dem Eingriff. Wurde während der Sanitisierung nicht der komplette Biofilm entfernt, so bieten die abgetöteten Bakterien einen perfekten Nährboden für die überlebenden Keime. Die Folge kann ein rasanter Anstieg der mikrobiologischen Belastung des Wassers wenige Tage nach der Sanitisierung sein. Mit der neuen Messtechnik behält der Anwender immer die volle Kontrolle über seine Anlage und wird über Änderungen sofort informiert.

Reparaturen und Wartungsarbeiten an einer Wasseranlage lassen sich nicht vermeiden, sorgen aber häufig für den Stillstand der Anlage. In dieser Zeit ist die Gefahr einer Verkeimung besonders hoch. Daher folgt i. d. R. eine Sanitisierung, bevor wieder produziert wird. Auch die mikrobiologische Untersuchung ist ein Bestandteil der Routine nach Reparaturen. Da die Resultate der Plattentests bisher nur zeitverzögert verfügbar

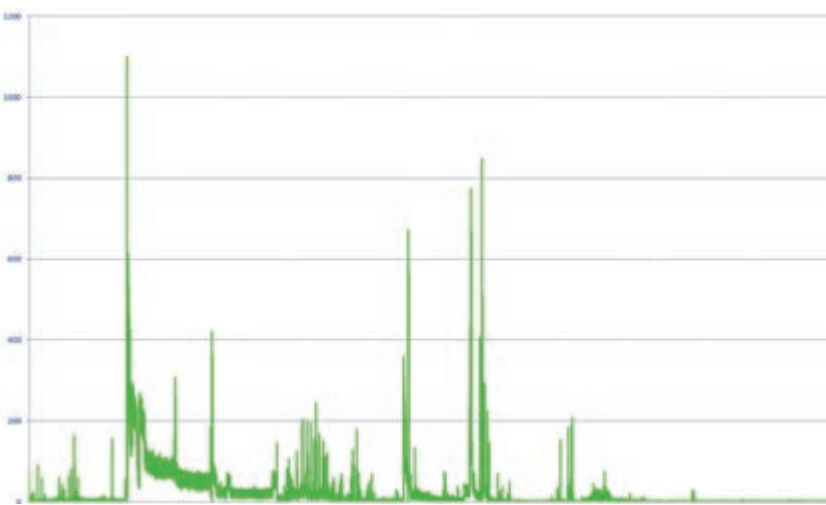


Abbildung 4: AFU-Zahlen über den Zeitraum von 2 Wochen hinweg mit einem Messwert alle 2 Sekunden. Zu sehen sind die sofortigen Auswirkungen von Änderungen an der Anlage auf die AFU-Zahlen.

waren, musste der Pharmaproduzent bisher im Rahmen der Risikoanalyse eine Entscheidung treffen: Entweder er produzierte wie gewohnt und lieferte aus, ohne auf die Resultate zu warten – mit dem Risiko, das Produkt im Schadensfall zurückrufen zu müssen. Oder das Produkt wurde bis zur Freigabe eingelagert, was hohe Lagerkosten zur Folge hatte. Eine schnellere Freigabe der Anlage mit Echtzeitdaten bietet hier die Lösung, ein sicheres Produkt direkt ausliefern zu können.

Um die Prozesssicherheit zu gewährleisten, muss bei Überschreitung der vorgegebenen Grenzwerte ein Alarm ausgelöst werden, damit ohne Zeitverzögerung die nötigen Gegenmaßnahmen ergriffen werden können. Hierzu verfügt das Messgerät über 3 Warnlevel, die nach den Anforderungen des Anwenders eingestellt werden können. Der Zustand des Systems lässt sich direkt am Bildschirm des Messgeräts ablesen. Im Normalzustand ist die Anzeige der AFU grün hinterlegt. Bei Überschreitung des ersten Warnlevels wird der Hintergrund gelb, beim nächsten Level rot und schlussendlich schwarz. Dieses Ampelsystem ermöglicht eine schnelle Erfassung der Situation mit einem Blick.

Für die Übermittlung der Grenzwerte und Alarmlisten stehen 3 Schnittstellen zur Verfügung, um das Messgerät optimal an die vorhandene Anlage anzubinden:

- Analoge Ausgänge mit 4-20 mA. Es gibt einen Ausgang für AFU und einen für inerte Partikel.
- Modbus bzw. Transmission Control Protocol/Internet Protocol (TCP/IP). Dieses System läuft über den Ethernet-Zugang des Geräts und bietet die Übertragung aller vorhandenen Signale und Warnmeldungen. Allerdings handelt es sich um eine einseitige Informationsübermittlung, sodass über das Modbus-System keine Einstellung am Messgerät aus der Ferne verändert werden kann.
- Ethernet. Das Messgerät lässt sich über einen Remote-Zugriff steuern. Der Bildschirm am Gerät selbst ist in diesem Moment gesperrt, sodass immer nur ein Zugriff auf das Gerät möglich ist. Die Messdaten und auch das Audit Log File, welches alle Änderungen am Gerät dokumentiert, können direkt auf einen Server gespeichert werden und stehen dort als Kopie für Auswertungen zur Verfügung.

Wie bei TOC-Messgeräten ist auch bei der neuen Messmethode ein

konstanter Volumenstrom ausschlaggebend für die Messgenauigkeit. Daher wird die Pumpleistung der im Gerät integrierten Pumpe konstant elektronisch überwacht und es existiert ein Durchflussmesser im Gerät. Daneben werden auch die Laserleistung und die beiden Detektoren für Partikel (Streulichtmessung) und Fluoreszenz kontinuierlich elektronisch überwacht. Die Reinigung des Messgeräts erfolgt chemisch mit Wasserstoffperoxid und kann automatisch (in bestimmten zeitlichen Abständen) oder manuell gestartet werden. Wird die Anlage mit Ozon gesäubert, so kann das Gerät an der Leitung verbleiben und wird automatisch mit gereinigt.

Einfacher Einbau, einfaches Handling

Die Integration des neuen Messgeräts in die Anlage erfolgt in einem Bypass der Ringleitung, da das Wasser danach in den Verwurf geht (Abb. 5). Empfehlenswert ist die Installation im Rücklauf des Rings, bevor das Wasser zurück in den Vorratstank fließt. Bei räumlicher Nähe von Vorlauf und Rücklauf ist auch eine alternierende Messung möglich, allerdings muss ein entsprechendes Ventil anlagenseitig eingebaut und gesteuert werden. Das Messgerät selbst verfügt nur über einen Eingang für die kontinuierliche Messung. Der Anschluss erfolgt auf 3 mm oder 6 mm Außendurchmesser am Gerät.

Die Umgebungsbedingungen für eine verlässliche Messung müssen so sein, dass eine Kondensation im Gerät verhindert wird. Die Umgebungstemperatur darf 37 °C nicht überschreiten; besonders bei kaltgelagerten Wasserkreisläufen ist dies relevant. Da es sich um eine optische Messtechnologie unter Nutzung verschiedener Spiegel handelt, kann Kondensat im Lichtweg für einen Ausfall der Messung sorgen. In diesem Fall wird ein blinkender optischer Alarm am Bildschirm des Messgeräts angezeigt (Severe Error), der ebenfalls über Modbus und



Abbildung 5: Typischer Einblick in eine Wasseranlage mit dem Einsatz der neuen Online-Keimzahlbestimmung.

Ethernet an die Leitstelle weitergeleitet werden kann. Entsprechend ist auch die Luftfeuchtigkeit wichtig; hierfür sind eigene Alarmwerte eingespeichert. Bei 70 % Luftfeuchtigkeit löst das Gerät einen Alarm aus, bei 90 % Luftfeuchtigkeit schaltet es sich automatisch ab. Für den Betrieb ist daher auf nicht-kondensierende Bedingungen bei maximal 37 °C zu achten. Verändert sich die Temperatur des Mediums, wird dies beim Messen kompensiert.

Das Messgerät lässt sich einfach bedienen. Das System läuft auf einem Windows-7-Rechner und kann mit der mitgelieferten Maus und Tastatur gesteuert werden. Alternativ ist eine Bedienung direkt über den Touchscreen möglich.

Da das Gerät je nach Installationsort frei in der Wasseranlage steht, gibt es verschiedene Sicherheitsvorkehrungen, um Manipulationen an der Messung zu verhindern:

- Das Audit Log File protokolliert alle Änderungen am Gerät.
- Es gibt 4 Zugangslevel: Administrator, Nutzer, Gast und Service.
- Für die Messung von manuellen Proben und Änderungen an den Einstellungen ist immer ein Login notwendig.
- Die Forderung eines komplexen Passworts kann eingestellt werden.
- Die Passwortgültigkeit kann begrenzt werden – desgleichen die Einstellung, wie viele Passwörter das System speichert, bis ein Passwort wiederholt werden darf.

- Es gibt einen zeitlich einstellbaren Auto-Log-Off.

Somit bietet die neue Messtechnologie eine zuverlässige, schnelle Detektion der Keimzahl in pharmazeutischem Wasser und verbessert dadurch die Prozesssicherheit.

Literatur

- [1] European Pharmacopoeia, Chapters on Water for injections and Purified Water
- [2] USP <1231>
- [3] USP <643> und EP 2.2.44
- [4] J Fluoresc (2007) 17:455–459
- [5] Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology/edited by Stephen P. Denyer et al. – 8th ed., Blackwell Publishing Ltd.



ecv

Gute Vertriebspraxis in der pharmazeutischen Industrie

Pharmalogistik · Good Distribution Practice (GDP)
Supply Chain Security

N. Spigglkötter (Hrsg.)

ISBN 978-3-87193-438-4

- 72,76 €
- 1. Auflage 2017
- 15,3 x 23 cm, Broschur, 280 Seiten

Zielgruppen

- Pharmazeutische Industrie und Großhändler
- Zulieferindustrie
- Behörden / Überwachungsämter
- Planungs- und Beratungsunternehmen
- Pharma-/Biotech- und Life Science-Logistiker
- Fachspeditionen

Pain in the (Supply) Chain – aus diesen Worten spricht die Sorge der pharmazeutischen Industrie um ihre Lieferketten. In einem sich stetig wandelnden Umfeld steht die Arzneimitteldistribution immer wieder vor neuen Herausforderungen.

In vier Themenblöcken

- Regulatorischer Rahmen
- Supply Chain
- Supply Chain Integrity: Arzneimittelfälschungen und Serialisierung
- Qualifizierung

zeigt das vorliegende Buch Lösungsansätze und Vorgehensweisen auf. Wesentliche As-

pekte GDP-konformen Handelns entlang der gesamten Distributionskette und aus der Perspektive aller am Prozess Beteiligten weisen den Weg. Der Facettenreichtum der Guten Distributionspraxis spiegelt sich in verschiedenen Sichtweisen wider: vom Pharma-Unternehmer über den Großhändler, den beauftragten Logistiker bis hin zu Dienstleistern und outgesourceten Prozessen.