

Durchführsicherheit von Sterilprüfungen im Reinraum und im Isolator

Timo Krebsbach und Frank Böttcher

Labor L+S AG, Bocklet

Korrespondenz: Dr. Timo Krebsbach, Labor L+S AG, Mangelsfeld 4, 97708 Bocklet (Germany), e-mail: Timo.Krebsbach@Labor-LS.de

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren hat sich für die Prüfung auf Sterilität mehr und mehr die Isolorttechnologie als Alternative zum klassischen Reinraum etabliert. Beide Prüfungen, Reinraum und Isolator, haben ihre Vorteile und Schwächen. Während im Isolator nicht alle Sterilprüfungen aufgrund der Beschaffenheit des Primärpackmittels durchgeführt werden können, erhöht der Isolator durch die konsequente Trennung von Prüfpersonal und Probe die Sicherheit der Prüfung und hilft damit, falsch positive Testergebnisse zu vermeiden. Die Prüfkosten werden in erster Linie durch die Prüffrequenz bestimmt.

ABSTRACT

Reliability of Sterility Testing in Cleanroom and Isolator

Within the last years isolators have become an alternative of classical cleanrooms for sterility testing. Both environmental conditions, cleanroom and isolator, have several advantages and disadvantages. Because of the sample properties not all types of samples can be tested in an isolator but testing in an isolator is much safer. The strict separation of operator and sample reduces false positive tests. The costs per test for sterility depend on the total number of tests.

Prüfvoraussetzung

In den vergangenen Jahren sind die regulatorischen Anforderungen an die methodischen Voraussetzungen der Sterilprüfung weiter gestiegen und nur durch großen personellen sowie apparativen Aufwand zu erfüllen [1]. Damit verbunden ist die Möglichkeit, eine Wiederholungsprüfung bei einem positiven Steriltest durchführen zu können, deutlich eingeschränkt worden. Dies bedingt oft ein obligatorisches Verwerfen einer Charge, selbst wenn die Unsterilität durch eine nicht sicher erkennbare fehlerhafte Testdurchführung

verursacht wurde (sekundäre Kontamination, falsch positives Ergebnis) und die Zubereitung tatsächlich steril ist.

Der für die Wiederholung der Prüfung geforderte Nachweis eines Prüffehlers gestaltet sich schwierig. In der Literatur sind Raten von falsch positiven Sterilprüfungen zwischen 0,1 und 0,25 % angegeben [2]. Im 6. Nachtrag der 4. Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs erfolgte eine nochmalige Verschärfung der Anforderungen an die Prüfung verbunden mit einer Reduzierung der Möglichkeiten zur Rechtfertigung einer Wiederholungsprüfung. Es wurden zudem erstmalig molekularbiologische Identifizierungsverfahren erwähnt, die im Falle eines Keimnachweises die genetische Übereinstimmung von Steriltestkontaminante und Umgebungskeim aus dem prüfungsbegleitenden Monitoring nachweisen sollen. Damit ist für ein Retesting eine weitere Hürde geschaffen worden. Aus Gründen der Arzneimittelsicherheit setzt man hier sehr enge Grenzen.

Für die Prüfung auf Sterilität wird also eine Umgebung benötigt, in der möglichst keine Mikroorganismen vorkommen sollen, um die Gefahr einer Kontamination während des Tests zu minimieren. Als Umgebung bei der Prüfung auf Sterilität bietet das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) zwei Alternativen:

1. Prüfung im Reinraum unter Laminar-Flow der Reinraumklasse A mit Umgebung der Reinraumklasse B (gem. Annex 1 EG-GMP-Leitfaden) oder
2. Prüfung im Isolator mit Reinraumklasse A (eine klassifizierte Hintergrundumgebung ist hierbei nicht erforderlich).

Reinraum und Isolator sind *per se* keine keimfreien Bereiche, lediglich die Anzahl von Mikroorganismen wird unter erheblichem technischen Aufwand auf ein geringstmögliches und unvermeidbares Maß beschränkt. Die Gefahr, dass ein Mikroorganismus eine Kontamination bei der Sterilprüfung verursacht, besteht fortwährend.

KEY WORDS

- Isolator
- *Propionibacterium acnes*
- Prüfung auf Sterilität
- Reinraum

Pharm. Ind. 71, 345–351 (2009)

Sie ist insbesondere da am größten, wo der Mensch direkt mit dem Produkt in Berührung kommt [3, 4]. Dies trifft in besonderem Maß auf den Reinraum zu, da das Personal direkt händisch während der Prüfung in die Reinraumklasse A eingreifen muss. Um Kontaminationen oder Übertragungen durch das Personal zu reduzieren, hat sich als Alternative zum klassischen Reinraum in den letzten Jahren die Isolator-Technologie etabliert. Beim Isolator werden in einem luftdicht verschlossenen Innenraum die Oberflächen der zu untersuchenden Proben inklusive aller benötigten Materialien durch Begasung (meist mit H₂O₂) dekontaminiert. Das dekontaminierende Agens muss vor der Prüfung komplett entfernt werden. Im Anschluss können die Proben auf Sterilität untersucht werden. Der Zugriff zur Bearbeitung der Proben erfolgt von außen über Handschuhgriffe, so dass die Keimfreiheit/-armut im Inneren des Isolators während der gesamten Prüfdauer aufrechterhalten wird.

Unabhängig davon, ob die Prüfung im Reinraum oder im Isolator durchgeführt wird, ist gut geschultes Personal, das konzentriert aseptisch arbeitet, nach wie vor die wichtigste Qualitätsvoraussetzung bei der Durchführung der Sterilprüfung [5]. Die einzelnen prüfungsvorbereitenden Arbeitsschritte für die Prüfung im Isolator resp. im Reinraum sind unterschiedlich und bedingen auch unterschiedliche Fehlermöglichkeiten durch den Anwender [6], die es zu reduzieren gilt.

Reinraum und Isolator sind nicht für alle Proben gleichermaßen geeignet. Die Entscheidung, wo die Sterilprüfung durchgeführt wird, kann von drei Faktoren abhängig gemacht werden:

1. der Durchführbarkeit,
2. der Durchführsicherheit,
3. den Kosten.

1. Durchführbarkeit

Ob eine Probe besser im Reinraum oder im Isolator untersucht werden kann, ist in erster Linie von der Beschaffenheit des Primärpackmittels abzuleiten. So können im Reinraum auch die Proben untersucht werden, die eine gasdurchlässige Primärverpackung besitzen oder die aufgrund der Größe (z. B. Large Volume Parenterals) im Isolator praktisch nicht prüfbar sind. Der Reinraum bietet aufgrund der Möglichkeit, kontinuierlich Material einschleusen zu können, auch eine höhere Flexibilität und Kapazität, die beim Isolator aufgrund des Dekontaminationszyklus nicht gegeben ist. Die Dekontaminations-, Prozess- und Umgebungsbedingungen sind im Isolator prozessgesteuert und automatisiert. Der Isolator ist darüber hinaus platzsparend, da im Gegensatz zur Prüfung im Reinraum unter Laminar Flow Klasse A keine klassifizierte Hintergrundumgebung gefordert ist. Wichtigster Vorteil beim Isolator ist die höhere Prüfsicherheit durch die konsequente Trennung von Personal und Prozess.

2. Durchführsicherheit

Um die Durchführsicherheit der Prüfung im Isolator resp. im Reinraum beurteilen zu können, ist der Vergleich des Hygienemonitorings hilfreich (Tab. 1).

■ **Tabelle 1**

Typische Mikroorganismen im Hygienemonitoring von Reinraum und Isolator.

Mikroorganismus	Natürliches Vorkommen, u. a.
Isolator	
<i>Staphylococcus</i> sp.	menschliche Haut und Schleimhaut
<i>Corynebacterium</i> sp.	menschliche Haut
Reinraum	
<i>Staphylococcus</i> sp.	menschliche Haut und Schleimhaut
<i>Corynebacterium</i> sp.	menschliche Haut
<i>Micrococcus</i> sp.	menschliche Haut, Luft
<i>Bacillus</i> sp.	ubiquitär

Bei aseptischem Arbeiten müssen zwangsläufig durch das Prüfpersonal bedingt Kontaminationen auftreten. Diese Kontaminationen können bei der Prüfung selbst oder der Probenahme entstehen [3, 7].

Im mikrobiologischen Monitoring des Isolators werden i. d. R. typische Hautkeime nachgewiesen. Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei den positiven Befunden mit Hautkeimen auch um nachträgliche Kontaminationen beim Verschließen oder Entnehmen der Nährmedien für das Hygienemonitoring handeln kann, da diese Keime, sofern sie sich auf Oberflächen befinden, den Dekontaminationszyklus nicht überleben können.

Das Keimspektrum, das im klassischen Reinraum detektiert wird, enthält nach unseren Erfahrungen neben typischen Hautkeimen zusätzlich noch Umgebungskeime (z. B. *Bacillus* sp.). Der Nachweis von typischen Hautkeimen im Monitoring bei der Prüfung im Reinraum ist verständlich; Kontaminationsquelle ist in erster Linie das Prüfpersonal. Für aerobe Sporenbildner hingegen ist der Eintrag auch über das Material (die Proben) möglich. Bacillaceae weisen eine hohe Tenazität u. a. gegenüber Desinfektionsmitteln auf. Je nach Einsatz des Desinfektionsmittels werden gelegentlich Keime selektiert, die zu echten Problemfällen werden und zu Unsterilitäten führen können. Dies gilt in besonderem Maß für den Reinraum und weniger für den Isolator [4].

Die Annahme, dass der Isolatorinnenraum steril ist und dass Unsterilitäten von im Isolator durchgeführten Prüfungen folglich generell nur primären Ursprungs sein können (also vom kontaminierten Produkt stammen), ist falsch. Ein Keim, von dem gelegentlich als Kontaminante bei im Isolator durchgeführten Steriltests berichtet wird, ist *Propionibacterium acnes*. Es handelt sich um ein mikroaerophiles, grampositives Bakterium, dessen natürliches Habitat die Talgdrüsenfollikel des Men-

schen sind. Im Hygienemonitoring wird der Keim nicht nachgewiesen, da er unter den üblichen aeroben Bedingungen nicht wächst. Weshalb überlebt *Propionibacterium acnes* Dekontaminationszyklen mit verdampftem Wasserstoffperoxid? Dafür gibt es mehrere Erklärungsversuche:

- *Propionibacterium acnes* besitzt die Fähigkeit, Katalase zu bilden und weist daher gegenüber Wasserstoffperoxid eine erhöhte Tenazität auf [8].
- *Propionibacterium acnes* neigt zur Bildung von Biofilmen, was zu einer erhöhten Resistenz gegenüber negativen Umwelteinflüssen beiträgt [9, 10]. Bei der Dekontamination im Isolator ist daher davon auszugehen, dass lediglich die äußere Keimschicht abgetötet wird und Bakterien im Inneren des Biofilms überleben.
- Der Keim gelangt mit Sekreten aus den Talgdrüsen in die Prüfumgebung. Die Sekrete haben einen ähnlichen protektiven Effekt wie die Biofilme.

Wenn Probenbehältnisse und andere Prüfmaterialien vor der Beladung des Isolators entsprechend präkontaminiert wurden, können sie von den Oberflächen z. B. beim Einstechen in die Testansätze gelangen.

Die Durchführsicherheit der Sterilprüfung im Isolator kann hier z. B. erhöht werden, indem ein zusätzlicher Desinfektionsschritt für alle Proben und Materialien, die in den Isolator eingebracht werden, bei der Beladung des Isolators eingeführt wird (z. B. Wischdesinfektion mit Isopropanol). Durch die Vorbehandlung der Proben

wird erreicht, dass die Oberflächen ggf. entfettet werden und die anschließende Dekontamination im Isolator auch greifen kann. Die Notwendigkeit einer hinreichenden Reinigung von Oberflächen vor der Dekontamination ist technisches Grundwissen und wurde auch in verschiedenen Regelwerken beschrieben [6].

Generell ist durch die konsequente Trennung von Probe und Prüfer die Durchführsicherheit der Sterilprüfung im Isolator im Vergleich zum Reinraum höher [7, 11].

3. Kosten

Die Arbeitsschritte bei der Durchführung der Sterilprüfung im Isolator oder im Reinraum sind nahezu gleich. Aber es gibt eine Vielzahl von Unterschieden in den vorbereitenden Arbeitsschritten, die für einen Vergleich der Betriebskosten berücksichtigt werden müssen.

Für die Prüfung im Reinraum sind sehr zeit- und kostenintensive Einschleusevorgänge für Personal und Material erforderlich. Alle Proben und Materialien durchlaufen ein mehrstufiges Einschleuseprozedere, meist unter Einsatz von sporiziden Desinfektionsmitteln. Ähnliches gilt für das Einschleusen des Personals. Bei jedem Betreten des Reinraums ist das Anlegen von steriler Reinraumkleidung erforderlich. Die Beschaffung der Kleidung, das Waschen und Autoklavieren, aber auch die für das Einschleusen benötigte Zeit stellen einen erheblichen Kostenfaktor dar. Bei der Prüfung im Isolator sind hingegen die Kosten für die Dekontamination von

■ **Tabelle 2**

Sterilprüfung: Reinraum vs. Isolator. Aufwandsrelevante Vor- und Nachteile (Auswahl).

	Isolator	Reinraum
Nährmedien/Monitoring	Der Kostenaufwand für die Bereitstellung der Nährmedien für das Hygienemonitoring ist bezogen auf die Sterilprüfung annähernd gleich.	
Identifizierung	Die Anzahl an Identifizierungen ist aufgrund des geringeren Keimnachweises im Isolator geringer.	Im Reinraum fallen im Vergleich zum Isolator ca. 10–12fach höhere Kosten an.
Reinigung/Desinfektion	Der Aufwand für die Reinigung des Isolators ist gering.	Die Reinigung des Reinraums ist aufgrund der Größe deutlich aufwendiger.
Einschleusen von Material	Die automatisierte Dekontamination im Isolator ist kostengünstig.	Das mehrstufige Einschleuseprozedere mit Einsatz von sporiziden Mitteln ist im Vergleich zum Isolator kostenintensiv.
Einschleusen von Personal	Die Schutzkleidung ist hier auf Einmalhandschuhe und ggf. Einmalhaube begrenzt.	Das Anlegen der Reinraumunter- und oberbekleidung ist zeit- und kostenintensiv.
Auslastung	In einer Isolatorbeladung können je nach Primärpackmittel ca. 15 Sterilprüfungen durchgeführt werden.	Durch kontinuierliches Einschleusen von Proben und angepassten Arbeitsschichten des Personals ist die mögliche Testanzahl deutlich größer.
Flexibilität	Die Flexibilität der Probenbearbeitung ist durch die Dauer des Dekontaminationszyklus eingeschränkt. Damit ist ggf. eine Verschiebung der Untersuchung auf den folgenden Arbeitstag verbunden.	Bei der Untersuchung im Reinraum ist ein direktes Einschleusen von Proben für eine zeitnahe Untersuchung möglich.
Rate falsch positiver Testergebnisse	Durch die strikte Trennung von Personal kann die Rate an falsch positiven Tests auf ein Minimum reduziert werden.	Die Rate an falsch positiven Testergebnissen ist im Vergleich zum Isolator höher.

Proben und Material vergleichsweise gering. Der Sterilprüfer muss keiner aufwendigen Bekleidungs Vorschrift folgen. Auch das Reinigungs- und Desinfektionsprozedere des räumlich kleineren Isolators gegenüber einem Reinraum ist deutlich weniger zeit- und kostenintensiv. Im Hinblick auf das mikrobiologische Monitoring ist die Isolatorprüfung ebenfalls im Vorteil, da die Anzahl der Monitoringpunkte deutlich geringer ausfällt. Im Reinraum umfasst das Routinemonitoring nicht nur die direkte Prüfumgebung, sondern auch alle angrenzenden Schleusen der Klassen B bis D. Der Aufwand für die Identifizierung von Keimen ist bei der Prüfung im Reinraum aufgrund des naturgemäß häufigeren Keimnachweises deutlich höher. Nach unseren Erfahrungen fallen beim Reinraummonitoring ca. 10- bis 12mal mehr Isolate zur Identifizierung an.

Bei geringen Prüfungsanzahlen sind die Betriebskosten des Isolators nach unseren Erfahrungen niedriger. Da im Reinraum aber mehr Proben pro Tag bearbeitet werden können, hat der Reinraum Kostenvorteile, wenn er gut ausgelastet ist.

Schlussbemerkung

Ob die Prüfung auf Sterilität im Reinraum oder im Isolator durchgeführt wird, hängt in erster Linie von der Beschaffenheit des Primärpackmittels und der Durchführsicherheit ab. Daneben müssen die Kosten für die Prüfeinrichtung berücksichtigt werden. Beide arzneibuchkonformen Prüfungen haben nach wie vor ihre Berechtigung. Der Reinraum bietet die Möglichkeit, großvolumige Proben und Proben mit gasdurchlässiger Primärverpackung zu prüfen. Die Prüfung von Proben im Isolator trägt durch die konsequente Trennung von Probe und Personal deutlich zur Vermeidung sekundärer Kontaminationen bei. Die Kosten pro Sterilprüfung hängen dagegen vom tatsächlichen Durchsatz an Mustern ab. So ist der Reinraum bei höheren Probenzahlen, der Isolator bei geringen Probenzahlen im Vorteil.

Wichtigste Voraussetzung für eine sichere Prüfung auf Sterilität ist aber nach wie vor gut geschultes und motiviertes Personal, das die aseptischen Arbeitstechniken beherrscht.

LITERATUR

- [1] Bombly L. In sicherer Hand. Vorteile des Outsourcings am Beispiel von Sterilitätsprüfungen. *Pharma-Tec*. 2000;1:82–83.
- [2] Van Doorne H et al. Industrial manufacture of parenteral products in The Netherlands. A survey of eight years of media fills and sterility testing. *PDA J Pharm Sci Technol*. 1998;52(4):159–164.
- [3] Akers J, Agalloco J. Environmental monitoring: myths and misapplications. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2001;55(3):176–184.
- [4] Böttcher F. Risikobewertung im mikrobiologischen Labor. Besonderheiten der mikrobiologischen Methoden für die Qualitätsbeurteilung von Arzneimitteln. *Pharma Technologie Journal*.
- [5] Recommendation on sterility testing. *PIC/S*. 2007.
- [6] Recommendation Isolators used for aseptic processing and sterility testing. *PIC/S*. 2007.
- [7] Agalloco J. Importance of background microbial levels in the manufacture and testing of sterile products. *Pharmaceutical Technology*. 2005;29:74–81.
- [8] Reich RR et al. Characterization, properties and biological effects of vapour phase hydrogen peroxide. Presentation at: Interphex New York. 2006.
- [9] Bayston R et al. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials in vitro and in vivo: impact on diagnosis and treatment. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(3):705–709.
- [10] Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res Microbiol*. 2007;158(4):386–392.
- [11] European Commission. Medicinal products for human and veterinary use. Annex 1 Manufacture of sterile medicinal products. In: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice. 2008.

Redaktion: Claudius Arndt und Viktor Schramm. Sekretariat: Gudrun Geppert. Verlag: ECV · Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Baendelstockweg 20, 88326 Aulendorf (Germany). Tel.: +49 (0) 75 25 94 00, Fax: +49 (0) 75 25 94 01 80. e-mail: redaktion@ecv.de. <http://www.ecv.de>. Herstellung: stm media GmbH / druckhaus köthen GmbH, 06366 Köthen (Germany). Alle Rechte vorbehalten.

Bezugsbedingungen: „pharmind“ erscheint monatlich und kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Preise für das Jahresabonnement als Print-Ausgabe einschließlich Online-Zugang (inkl. MwSt., mindestens 12 Hefte): *Inland*: 238,00 € plus 29,00 € Versand. *Ausland* (Europa mit VAT ID Nr.): 222,43 € plus 32,71 € Versand (Luftpost: 94,82 €). *Ausland* (Europa ohne VAT ID Nr. und weiteres Ausland): 238,00 € plus 35,00 € Versand (Luftpost: 110,00 €). Preis für das Einzelheft: je 28,00 € plus Versand. Netzwerk-Erweiterungslizenzen auf Anfrage. Das Abonnement ist weiter rechtsverbindlich, wenn es nicht mindestens 3 Monate vor Ende des Berechnungszeitraums gekündigt wird. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung.

© ECV · Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Aulendorf (Germany).

Printed in Germany · ISSN 0031-711 X