

14.A.4 Mikrobiologische Probenahme

Autoren: Dr. Frank Böttcher / EL 19
Dip.-Ing. (FH) Annette Könemann / EL 19

Hier finden Sie Antworten auf folgende Fragen:

- Was unterscheidet die mikrobiologische Probenahme von einem Musterzug für chemisch-physikalische Untersuchungen?
- Welche Einflussfaktoren müssen bei der Risikobewertung zur Erstellung eines Musterzugplanes berücksichtigt werden?
- Wie erhalte ich ein repräsentatives Mischmuster?
- Wie sollten Gerätschaften zur Probenahme beschaffen sein?
- Welche Anforderungen werden an den Probenehmer und die Umgebungsbedingungen gestellt?
- Wie erfolgt ein korrekter Musterzug?
- Was ist bei der anschließenden Lagerung bzw. dem Versand der Muster zu beachten?

14.A.4.1 Besonderheiten der mikrobiologischen Probenahme

Die Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen weist einige Besonderheiten auf, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

Zunächst muss davon ausgegangen werden, dass mikrobiologische Verunreinigungen normalerweise nicht homogen im Produkt verteilt sind. Das bedeutet, dass die Nachweiswahrscheinlichkeit bei einer einmaligen Probenahme und einer einzigen Probe unter Umständen relativ gering sein kann.

Hinzu kommt, dass sich der mikrobiologische Status bei der Lagerung des Produkts oder auch eines bereits entnommenen Prüfmusters bis zur mikrobiologischen Untersuchung verändern kann. Herrschen ideale Bedingungen für die Mikroorganismen, können die Keimzahlen im Produkt oder Muster ansteigen. Umgekehrt ist jedoch auch eine Reduzierung der Keimzahlen im Produkt denkbar.

Des Weiteren besteht bei der mikrobiologischen Probenahme die Gefahr, dass Keime über verschiedene Wege in Ausgangsstoffe, Halbfertigwaren, Fertigprodukte und Muster gelangen (**Sekundärkontamination**). Hier spielen in erster Linie das Probenahmepersonal, die Gerätschaften inkl. der Probenbehältnisse sowie die Umgebungsbedingungen eine entscheidende Rolle. Handelt es sich bei den ermittelten Prüfergebnissen um ubiquitär vorkommende Bakterien (z.B. *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp.) oder Pilze (z.B. *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.), kann meist keine eindeutige Aussage mehr getroffen werden, ob die mikrobiologischen Verunreinigungen aus dem Produkt selbst kommen oder z.B. beim Musterzug oder dem anschließenden Prüfprozedere eingetragen wurden. Die Bearbeitung von Prüfergebnissen außerhalb der Spezifikation (OOS) wird dadurch wesentlich erschwert.

Mögliche Folge: Nicht als sekundär erkannte Kontaminationen in Prüfmustern können zur Ablehnung einer mikrobiologisch eigentlich einwandfreien Charge

eines Arzneimittels oder Ausgangsstoffes führen (**falsch positives Ergebnis**). Es könnte aber auch der Fall auftreten, dass durch einen nicht repräsentativen Probenzug Kontaminationen nicht erkannt werden, und damit ein **falsch negatives Ergebnis** vorliegt.

Um ein repräsentatives Muster aus einer Charge zu erhalten und Unsicherheiten beim erhaltenen Prüfergebnis auszuschließen, müssen Probenahmepläne und -verfahren eindeutig festgelegt sein. Darüber hinaus müssen geeignete Maßnahmen zur Verhinderung von Sekundärkontaminationen der Muster und des Produktes selbst getroffen werden.

Deshalb soll hier zuerst eine kurze Betrachtung der möglichen Risiken für den Musterzug und das Muster selbst erfolgen, bevor auf die eigentliche Probenahme eingegangen wird.

Eine **Risikobewertung** für den Musterzug soll mögliche Maßnahmen zur Reduktion sekundärer Kontaminationen des Musters bei der Entnahme und weiteren Bearbeitung aufzeigen. Allerdings müssen Restrisiken auch hier generell akzeptiert werden. So wird es nur schwer möglich sein, einzelne „Kontaminationsnester“ immer sicher zu erkennen oder jede Rekontamination des Produktes oder des Musters zu vermeiden. Solche Restrisiken lassen sich durch standardisierte Umgebungsbedingungen und Verfahren reduzieren. Dazu gehört insbesondere auch, dass die am Prozess beteiligten Personen sich dieser Risiken bewusst sind.

Der erste Schritt einer Risikobewertung zur Erstellung des Musterzugsplanes ist, die möglichen Risiken, die bei Musterzug und -lagerung auftreten können, zu identifizieren. Hierbei können verschiedene Verfahren verwendet werden, von der formlosen Dokumentation über Process-Mapping (Kapitel 19.E.2 *Prozessübersichten (Process Mapping)*) bis hin zu formalisierten Verfahren wie z.B. der Fehlerbaumanalyse FTA (siehe Kapitel 19.F *Fehlerbaumanalyse (Fault Tree Analysis, FTA)*).

Ein Beispiel für die Analyse des Hygienierisikos für ein Muster in Form eines Ishikawa-Diagramms (Kapitel 19.E.3 *Fischgrät-Diagramme (Ishikawa-Methode)*) ist in Abbildung 14.A-8¹ dargestellt.

Die Eintrittswahrscheinlichkeit kann bei mikrobiologischen Prozessen leider oft nur „halbquantitativ“ ermittelt werden. Dennoch sollte eine Abschätzung der sich aus den Prozessrisiken ergebenden Konsequenzen erfolgen und geeignete Maßnahmen zur Begrenzung der Risiken festgelegt werden, z.B. mittels eines HACCP-Konzeptes (siehe Kapitel 19.H *Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)*).

Die verschiedenen, auch in der ICH-Leitlinie Q9 (siehe Kapitel J.9 bzw. Kapitel H.6.20) beschriebenen Verfahren zur Risikobewertung sind aber nur ein Hilfsmittel, um den Prozess transparent darzustellen, Bewertungen und die Schlüsse daraus zu dokumentieren und nach zu verfolgen. Unabdingbar für die Erstellung der Probenahmepläne ist eine ausreichende Kenntnis mikrobiologischer Zusammen-

1. *Aus Pharma Technologie Journal Risikomanagement in der Pharmaindustrie*, F. Böttcher, *Risikobewertung in mikrobiologischer Labor/Besonderheit der mikrobiologischen Methoden für die Qualitätsbeurteilung von Arzneimitteln*, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 2007

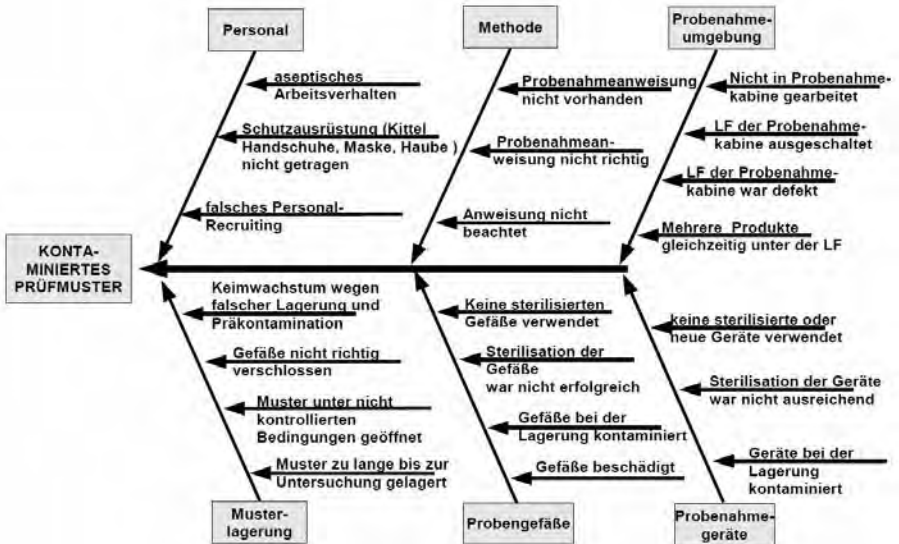


Abbildung 14.A-8 Ursachen für mögliche mikrobiologische Kontamination von Untersuchungsmustern

hänge und der Betriebshygiene (siehe Kapitel 10 *Hygiene*). Nachfolgend sollen die wichtigsten Punkte und Fragen der mikrobiologischen Probenahme dargestellt und näher erläutert werden.

14.A.4.2 Entnahme eines repräsentativen Mischmusters aus einer Charge

Generell kann man nicht davon ausgehen, dass Mikroorganismen im zu untersuchenden Gut homogen verteilt sind. Da die Eintragswege für mikrobiologische Kontaminanten zufällig sind, lassen sie sich nicht validieren. Die Untersuchung muss aber an einer Stichprobe erfolgen, die repräsentativ für den mikrobiologischen Status der Charge ist. Die statistischen Probenahmepläne, die für Mischmuster zu chemisch-physikalischen Prüfzwecken genutzt werden, liefern in der Regel einen repräsentativen Überblick über die Chargenqualität. Dies ist insbesondere der Fall, wenn Homogenitätsuntersuchungen gezeigt haben, dass die Keimzahl zwar schwankt, sich aber alle Muster deutlich im Rahmen der Spezifikation befinden. Bei Produkten, die bekanntermaßen eine grenzwertige mikrobiologische Qualität aufweisen, muss der Probenumfang allerdings erweitert werden.

Es kann ggf. notwendig sein, jedes Gebinde auch an unterschiedlichen Stellen zu bemustern. Zudem sollten die Gebinde optisch kontrolliert werden, da z.B. Wasser- und andere Verpackungsschäden auch nur einzelne Gebinde einer Liefercharge betreffen können.

Die 5. Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs trug dem Problem der inhomogenen Verteilung im Untersuchungsgut zum Teil Rechnung, indem im Kapitel

2.6.12 *Mikrobiologische Prüfung nicht-steriler Produkte* Angaben zur Aufarbeitung der Probe gemacht wurden. Dabei wurde gefordert, dass der Probenahmeplan auf Faktoren wie der Chargengröße, dem gesundheitlichen Risiko, das von einem stark kontaminierten Produkt ausgehen würde, den Eigenschaften des Produktes und dem zu erwartenden Risikograd einer möglichen Kontamination basieren sollte. Das bedeutete, dass das Europäische Arzneibuch hier eine Risikobewertung bei der Festlegung des Probenahmeplanes forderte. Es schlug für Produkte, die inhomogen verteilte mikrobiologische Kontaminationen enthalten konnten, einen 3-Stufen-Plan vor. Dabei sollten fünf Muster aus der Charge entnommen, einzeln geprüft und nach einem vorgegebenen Schlüssel bewertet werden. Leider ist im Rahmen der Harmonisierung der Monographie zur Keimzahlbestimmung dieser Abschnitt ersatzlos gestrichen worden.

Dafür wurde in der 6. Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs das Kapitel 2.8.20 *Pflanzliche Drogen: Probenahme und Probenvorbereitung* neu ins Arzneibuch aufgenommen. Dieses Kapitel gilt für Drogen, in denen durch die natürliche Bakterienflora der Ausgangspflanzen die Keime unterschiedlich verteilt sind und die während des Transports durch Beschädigung der Verpackungen, Wasserschäden oder andere Verschmutzungen sehr unterschiedliche Keimzahlen für einzelne Gebinde bzw. innerhalb einzelner Gebinde aufweisen können. Nach dieser Monographie wird die Anzahl der zu öffnenden Gebinde, aus denen ein Mischmuster für Untersuchungen entnommen werden sollte, für homogene Chargen definiert.

Wenn Inhomogenitäten zu erwarten sind, insbesondere nach visueller Begutachtung der Lieferung und Bewertung des Verschmutzungsgrads etc., soll die Charge in homogene Subchargen unterteilt werden und diese dann nach dem Schlüssel in Abbildung 14.A-9 bemustert werden. Dieses Verfahren ist analog auch bei anderen Ausgangsstoffen anwendbar, wenn beschädigte oder stark verschmutzte Gebinde vorliegen.

Anzahl der Behältnisse je Charge (N)	Anzahl der Behältnisse, aus denen Proben entnommen werden (n)
1 bis 3	Alle = N
> 3	$n = 1 + \sqrt{N}$ n wird auf die nächstgrößere ganze Zahl aufgerundet.

Abbildung 14.A-9 Anzahl der zu bemusternden Behältnisse (nach Ph. Eur. 2.8.20 *Pflanzliche Drogen: Probenahme und Probenvorbereitung*)

Wenn ein **nicht-steriles Arzneimittel** aus mikrobiologisch unkritischen Ausgangsstoffen unter kontrollierten, GMP-konformen Bedingungen gefertigt wird, ist normalerweise ein Mischmuster, wie es für chemisch-physikalische Untersuchungen eingesetzt wird, repräsentativ für die Charge.

Bei **sterilen Arzneimitteln** gibt das Arzneibuch eindeutig vor, wie viele Einheiten für die Untersuchung auf Sterilität entnommen und geprüft werden müssen (Ab-

Anzahl der Behältnisse je Charge	Mindestprobenanzahl je Nährmedium*
Parenteralia	
≤ 100	10% der Behältnisse, jedoch mindestens 4 Behältnisse; stets die größere Anzahl
$100 < x \leq 500$	10 Behältnisse
> 500	2% der Behältnisse, jedoch höchstens 20 Behältnisse; stets die kleinere Anzahl
Ophthalmika und andere nicht zur Injektion bestimmte Zubereitungen	
≥ 200	5% der Behältnisse, jedoch mindestens 2 Behältnisse; stets die größere Anzahl
> 200	10 Behältnisse
Wird das Produkt in Einzeldosis-Behältnissen in den Handel gebracht, so ist nach dem für Parenteralia aufgezeigten Schema zu verfahren.	
Feste Stoffe als Bulkprodukte	
≤ 4	jedes Behältnis
$4 < x \leq 50$	20% der Behältnisse, jedoch mindestens 4 Behältnisse; stets die größere Anzahl
> 50	2% der Behältnisse, jedoch mindestens 10 Behältnisse; stets die größere Anzahl
Bulkpackungen von Antibiotika (> 5 g)	6 Behältnisse
* Falls der Inhalt eines Behältnisses für die Beimpfung beider Nährmedien ausreicht, gibt diese Spalte die benötigte Behältnisanzahl für beide Medien gemeinsam an.	

Abbildung 14.A-10 Mindestprobenanzahl für die Prüfung auf Sterilität
(nach Ph. Eur. 2.6.1 Prüfung auf Sterilität)

bildung 14.A-10). Zudem wird im Annex 1 des EU-GMP-Leitfadens (Kapitel H.6.1 *Anhang 1: Herstellung steriler Arzneimittel*) ausgeführt, dass die Muster für die Sterilitätsprüfung repräsentativ für die Charge sein sollen und auch Teile der Charge mit dem größten Risiko für mikrobielle Kontaminationen enthalten müssen. Für die aseptische Abfüllung sind als Beispiele Muster vom Anfang und vom Ende der Charge sowie Muster nach Eingriffen in den Prozess aufgeführt, bzw. für endsterilisierte Produkte Muster z.B. vom kältesten Punkt der Autoklavenladung.

14.A.4.3 Gerätschaften zur Probenahme und Probenbehältnisse

Die Gerätschaften, die zur Probenahme eingesetzt werden können, sind vielfältig und hängen von der Beschaffenheit des zu bemusternden Produktes ab. Sie unterscheiden sich nicht von den Geräten, die zur Bemusterung für die chemisch-physikalischen Prüfungen eingesetzt werden. Für feste, nicht pulverförmige Stoffe eignen sich *Spatel, Löffel oder Zangen* am besten, für pulverförmige Stoffe werden in der Regel *Schaufeln* oder *Stechheber* eingesetzt.

Der Stechheber bietet den Vorteil, dass ein Muster auch aus dem Innern eines Gebindes gezogen werden kann, wohingegen mit Schaufeln oder Löffeln die Probe in der Regel aus dem oberen Teil des Gebindes entnommen wird. Für die Entnahme flüssiger oder viskoser Muster gibt es eine Reihe von Gerätschaften wie beispielsweise *Pipetten* oder *Einmalspritzen, Bechergläser mit Griffen oder Stielen* sowie direkte *Auslauf- oder Probenahmehähne* an den Anlagen. Am einfachsten ist die Entnahme von einzelnen Einheiten aus einer Produktionscharge (z.B. Vials, Ampullen, Tuben, Blister etc.).

Generell gilt für alle eingesetzten Gerätschaften, dass diese vor Beginn der Probenahme sauber, trocken und staubfrei sein müssen. Um eine wirksame Reinigung und Desinfektion der Probenahmeausrüstung durchführen zu können, muss das Material eine glatte Oberfläche aufweisen (z.B. polierter Edelstahl, Glas). Soweit möglich, sollten zumindest für wasserhaltige, flüssige oder halb feste, nicht sterile Arzneiformen auch Verfahren wie Autoklavieren, Sterilisieren oder Abflammen zur sicheren Keimabtötung der direkt mit Produkt in Kontakt stehenden Teile angewendet werden. Die Probenahmeausrüstung sollte auch Bestandteil einer mikrobiologischen Reinigungs- und Standzeitvalidierung sein. Wenn die Möglichkeit der Sterilisation gegeben ist, können Probenahmegeräte nach der Reinigung in wasserdampfdurchlässige Verpackungen eingeschweißt und darin sterilisiert werden. Eine Rekontamination bis zur Verwendung kann so wirkungsvoll verhindert werden. Sterile Produkte, die nicht in ihrer Primärverpackung bemustert werden können, werden grundsätzlich nur mit sterilisierten Gerätschaften bemustert.

Die zu verwendenden **Probenbehältnisse** hängen von der Beschaffenheit des Musters ab. Hinsichtlich der mikrobiologischen Ausgangsbelastung gelten die gleichen Anforderungen, die auch an die Probenahmegeräte gestellt werden. Probengefäße müssen – wie auch die Ausrüstung – sauber und trocken sein, Schutz vor äußeren Umgebungseinflüssen bieten und dicht verschließbar sein, um Sekundärkontaminationen zu vermeiden. Hierzu eignen sich Glasschraubflaschen oder -kolben mit großer Öffnung und dicht sitzendem Deckel oder Einmalbehältnisse wie Kunststoffbecher oder Minigrip-Beutel, die ebenfalls sicher verschließbar sein müssen.

Mehrfachbehältnisse wie beispielsweise Glasflaschen sollten vorab mit feuchter oder trockener Hitze keimfrei gemacht werden. Hier ist darauf zu achten, dass sich während einer eventuellen Zwischenlagerung kein Kondenswasser in den Behältnissen gebildet hat. Einmalartikel aus Glas, Kunststoff sowie Plastikbeutel sind aufgrund ihres Herstellprozesses kaum mikrobiologisch verunreinigt.

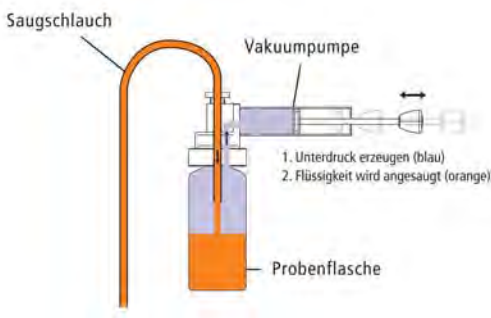


Abbildung 14.A-11
Probenahme von
Flüssigkeiten mittels
Vakuumpumpe
(Quelle Bürkle GmbH)



Abbildung 14.A-12 Beispiel einer Probenahme von
Flüssigkeiten mittels Vakuumpumpe (Quelle Bürkle
GmbH)



Abbildung 14.A-13 Bemusterung von Gebinden mittels
Musterzuglanze (Quelle Bürkle GmbH)



Abbildung 14.A-14 Stech-
heber (Quelle Bürkle GmbH)