



Stellungnahme zur mikrobiologischen Kontrolle von hämatopoietischen Stammzellzubereitungen (Version 2 vom 02.06.2015)

Das Paul-Ehrlich-Institut hat in umfangreichen experimentellen Studien die grundsätzlichen Bedingungen ermittelt, welche für eine aussagekräftige mikrobiologische Kontrolle von hämatopoietischen Stammzellen geeignet sind. Hierfür sind die konventionellen manuellen Methoden nur sehr eingeschränkt anwendbar, weil einerseits nach Zugabe von Zellen naturgemäß eine Trübung der mikrobiologischen Kulturmedien auftritt, andererseits Trübung als Parameter für Bakterienwachstum herangezogen wird. Diesem Problem kann durch den Einsatz von Kulturautomaten begegnet werden, weil hier die Produktion von Kohlendioxid als Parameter für Bakterienwachstum verwendet wird. Die Bedingungen für eine aussagekräftige mikrobiologische Kontrolle von hämatopoietischen Stammzellen mittels Kulturautomaten werden im Folgenden dargestellt.

1. Geeignete mikrobiologische Kulturmedien für die mikrobiologische Kontrolle von hämatopoietischen Stammzellen in den automatisierten Kultursystemen BacT/ALERT (bioMérieux) und BACTEC (Becton Dickinson)

Die oben genannten experimentellen Studien am Paul-Ehrlich-Institut wurden zum einen mit den unter "Growth Promotion Test" nach Ph. Eur. General Chapter 2.6.27 "Mikrobiologische Kontrolle zellulärer Produkte" des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur.) aufgeführten Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *Clostridium sporogenes*, *Bacteroides fragilis*) nach Beimpfung mit jeweils 10 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Flasche durchgeführt. Zusätzlich wurden in diese Untersuchungen *Propionibacterium acnes* und *Micrococcus sp.*, ebenfalls mit Keimzahlen von 10 KBE pro Flasche, einbezogen. Außerdem wurde eine Reihe von speziell für die Testung von Blutkomponenten isolierten und charakterisierten Stämmen (PEI Blood Bacteria Standards, von der WHO als "Repository Transfusion-Relevant Bacteria Reference Strains" etabliert) eingesetzt. Für die letztgenannten Experimente wurden die Kulturmedien mit Keimzahlen von 10^0 - 10^1 , 10^1 - 10^2 , 10^2 - 10^3 und 10^3 - 10^4 KBE pro Flasche beimpft und die Nachweisbarkeit geprüft.

Die mikrobiologischen Kulturmedien sollten in ihrer grundsätzlichen Zusammensetzung mit den Vorgaben nach Ph. Eur. General Chapter 2.6.1 "Prüfung auf Sterilität" des Europäischen Arzneibuches übereinstimmen. In den o.g. experimentellen Studien erwiesen sich für die beiden untersuchten Automatenysteme die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Kulturmedien als geeignet für die mikrobiologische Kontrolle gemäß Ph. Eur. 2.6.27 ("Medienvalidierung").

Getestete Kulturflaschen	Casein (%W/V)	Sojamehl (%W/V)	Hefeextrakt (%W/V)	Tierisches Gewebe (%W/V)
BACTEC ¹ Standard/10 Aerobic/F	3	3	0,3	0,01
BACTEC ¹ Standard/Anaerobic/F	3	3	0,4	0,01
BacT/Alert ² SA	1,7	0,3	-	-
BacT/Alert ² SN	1,36	0,24	0,376	-
BacT/Alert ² iAST	1,7	0,3	-	-
BacT/Alert ² iNST	1,36	0,24	0,38	-

¹ Becton Dickinson Kulturautomat

² bioMérieux Kulturautomat





Alle aufgeführten Kulturflaschen enthalten 40 ml flüssiges Nährmedium. In allen Kulturflaschen ist weiterhin das Antikoagulans Natrium Polyanethole Sulfonat (SPS) enthalten, in einigen Kulturflaschen zusätzlich dazu noch Menadion und Hämin. Die Medien BacT/ALERT BPA und BPN entsprechen in ihrer Zusammensetzung der von SA und SN und sind damit gleichermaßen für die mikrobiologische Kontrolle geeignet.

2. Validierung der Methode zur mikrobiologischen Kontrolle von hämatopoietischen Stammzellen

Bei der Validierung der mikrobiologischen Kontrolle muss zwischen der Medien-Validierung ("Growth Promotion Test" gemäß Ph. Eur. 2.6.27, d.h. der Nachweis, dass mikrobielles Wachstum in der aktuellen Charge des eingesetzten mikrobiologischen Kulturmediums erfolgt) und der Matrix-Validierung ("Method Validation" gemäß Ph. Eur. 2.6.27, d.h. der Nachweis, dass Mikroorganismen auch in Gegenwart der Untersuchungsprobe wachsen bzw. nachgewiesen werden können) unterschieden werden.

Bei Einsatz der unter Punkt 1 aufgeführten Medien-Varianten fordert das Paul-Ehrlich-Institut keine Medien-Validierung durch den Anwender, sofern ein entsprechendes Qualitäts-Zertifikat (Chargenfreigabe) durch den Medienhersteller vorliegt. Falls andere als die genannten Medien verwendet werden, ist eine Medien-Validierung mit der unter Punkt 1 beschriebenen Palette von Mikroorganismen erforderlich (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *Clostridium sporogenes*, *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium acnes*, *Micrococcus sp.*).

In jedem Fall muss der Anwender eine Matrix-Validierung vornehmen. Hierzu werden, jeweils im Doppelansatz, etwa 10 (bis maximal 100 KBE) von mindestens vier verschiedenen Mikroorganismen in Proben hämatopoietischer Stammzellpräparate eingebracht und diese anschließend in jeweils eine aerobe bzw. anaerobe Kulturflasche inokuliert. Eine Anleitung für die Matrix-Validierung inklusive einer Liste von Mikroorganismen findet sich in der Ph. Eur. General Chapter 2.6.27 unter "Method Validation". In einer vom Paul-Ehrlich-Institut vorgenommenen Auswertung mikrobieller Kontaminationen in hämatopoietischen Stammzellzubereitungen konnten übereinstimmend mit der o. g. Liste (Ph. Eur. 2.6.27) die Mikroorganismen *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* gefunden werden. Für die o. g. Matrix-Validierung mit mindestens vier verschiedenen Mikroorganismen bieten sich daher die zuletzt genannten drei Keime an sowie als vorwiegend obligat aerob wachsender Vertreter zusätzlich *Bacillus subtilis*, der ebenfalls in der Ph. Eur. General Chapter 2.6.27 Methode aufgeführt ist. Die Probenvolumina der Validierungsexperimente ergeben sich aus den für die mikrobiologische Kontrolle vorgesehenen Volumina. Diese Matrix-Validierung wird mit mindestens zwei Präparationen von hämatopoietischen Stammzellen verschiedener Spender durchgeführt. Anstelle des Stammzellpräparates kann ein Surrogatpräparat verwendet werden, das hinsichtlich der Zusammensetzung der löslichen Bestandteile dem Stammzellpräparat gleicht, dessen Zellanteil aber beispielsweise durch Buffycoat-Zellen ersetzt wird.

Empfehlung zur Durchführung:

Um den Aufwand zu begrenzen, kann folgende Vorgehensweise gewählt werden: Die Validierung wird mit den ausgewählten Mikroorganismenstämmen für mindestens einen Spender komplett durchgeführt. Pro Stamm werden hierbei zwei aerobe und zwei anaerobe Flaschen verwendet. Wird Wachstum nachgewiesen, kann bei der Wiederholung auf die Verwendung eines Flaschentyps pro Bakterienstamm reduziert werden, d. h. einige Stämme werden nur in den aeroben, andere nur in den anaeroben Flaschen getestet, dabei jeweils in Doppelbestimmung.

Bei der Matrix-Validierung ist es möglich, dass Stämme von Mikroorganismen in einzelnen Stammzellproben nicht nachgewiesen werden können, weil Abwehrmechanismen des Stammzell-Spenders zu deren Abtötung bzw. Wachstumshemmung führen. In diesem Fall ist die Matrix-Validierung mit einer anderen Spezies bzw. einem anderem Stamm von Mikroorganismen zu wiederholen. Es ist empfehlenswert, auf Isolate aus der mikrobiologischen Kontrolle von hämatopoietischen Stammzellpräparaten zurückzugreifen, falls solche verfügbar sind.



3. Inkubation der Untersuchungsproben

Für die mikrobiologische Kontrolle eines Präparates sind jeweils ein aerobes und ein anaerobes Kulturmedium in Kombination zu verwenden.

Die Inokulum-Volumina sind nach Ph. Eur. 2.6.27 abhängig vom Präparatevolumen. Ein Auffüllen auf die vom Medien-Hersteller für klinisch-mikrobiologische Untersuchungsproben empfohlenen Volumina ist nicht erforderlich.

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Inkubation der beimpften Medienflaschen im Kulturautomaten bei einer Temperatur zwischen 35 und 37 °C das Spektrum detektierbarer Mikroorganismen zu sehr einschränkt [1, 2]. Hintergrund ist die Tatsache, dass verschiedene Bakterien und Pilze im höheren Temperaturbereich nicht wachsen können, was zu falsch-negativen Ergebnissen der mikrobiologischen Kontrolle führen kann. Etliche Schritte der Entnahme, Herstellung und Lagerung finden aber bei Umgebungstemperaturen statt, so dass Kontaminationen und Wachstum entsprechender Mikroorganismen möglich sind. Die Inkubationstemperaturen sollten deshalb dahingehend adaptiert werden, dass sie diese Aspekte in Betracht ziehen und für die mikrobiologische Testung berücksichtigen. Optimale Inkubationstemperaturen, mit denen ein breites Spektrum psychotoleranter und mesophiler Keime abgedeckt wird, sind 20 bis 25 °C für die aerobe Kultur und 30 bis 35 °C für die anaerobe Kultur. Die Inkubation nach Vorgaben der Ph. Eur. 2.6.27 reicht aus Sicht des Paul-Ehrlich-Instituts nicht aus. Empfohlen wird eine alternative Testung entsprechend einer der nachfolgend aufgeführten Varianten:

	Aerobe Inkubation	Anaerobe Inkubation
Variante 1 (es stehen 2 Automaten, davon einer mit Kühleinheit, zur Verfügung)	20-25 °C im Automaten	30-35 °C im Automaten
Variante 2 (es steht nur ein Automat zur Verfügung)	35-37 °C im Automaten und zusätzlich Raumtemperatur außerhalb des Automaten*	35-37 °C im Automaten
Variante 3 (es steht nur ein Automat zur Verfügung)	30-32 °C im Automaten	30-32 °C im Automaten
Variante 4 (es stehen mehrere Automaten zur Verfügung, aber ohne Kühleinheit)	30-32 °C im Automaten	35-37 °C im Automaten

* Die Raumtemperatur sollte hierbei zwischen 20 und maximal 30 °C liegen und nach Möglichkeit überwacht werden. Für die Inkubation werden kommerziell erhältliche Medien, entweder die für die Kulturautomaten vorgesehenen aeroben Flaschen oder Trypticase-Soja-Bouillon, empfohlen. Probenvolumen und Volumen des Kulturmediums sollten so gewählt werden, dass sie denen der Automatentestung entsprechen, wobei das Probenvolumen bei Inkubationsbedingungen ohne kontinuierliche Durchmischung des Mediums maximal 10% des Medienvolumens betragen soll. Aufgrund der Trübung des Mediums durch das Produkt selber kann die Beurteilung nicht direkt, sondern erst nach Subkultivierung, welche nach frühestens sieben Tagen erfolgen sollte, vorgenommen werden.

4. Einfluss von DMSO auf die Nachweisbarkeit von Mikroorganismen

Für die Tiefkühl-Konservierung wird hämatopoietischen Stammzellen üblicherweise Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kryoprotektans in einer Konzentration von bis zu 10% zugesetzt. Daraus ergibt sich die Frage, ob DMSO im Kulturmedium zu einer Beeinträchtigung des Wachstums kontaminierender Mikroorganismen und somit zu falsch-negativen Ergebnissen in der Sterilitätstestung führen kann. In experimentellen Studien im Paul-Ehrlich-Institut konnte bis zu einer Endkonzentration von 5% DMSO in mikrobiologischen Kulturmedien keine Beeinträchtigung der Nachweisbarkeit der eingesetzten Bakterienstämme beobachtet werden. Bei der Sterilitätstestung von DMSO-haltigen



Präparationen erfolgt eine Verdünnung des DMSO im mikrobiologischen Kulturmedium, so dass bei Konzentrationen von 10% DMSO in der zu testenden Probe und Medienvolumina von 40 ml in den Kulturflaschen je nach Probenvolumen (0,1 bis 10 ml) Endkonzentrationen von 0,025% bis 2% DMSO im Kulturmedium vorhanden sind. Somit ist bei der mikrobiologischen Kontrolle von hämatopoietischen Stammzellen nicht mit Beeinträchtigungen durch im Kulturmedium enthaltenes DMSO in den üblichen Konzentrationen zu rechnen.

5. Maximale Lagerungs- und Transportzeiten für beimpfte Kulturmedien

Der Parameter für die Messbarkeit mikrobiellen Wachstums in automatisierten Kultursystemen ist die Produktion von Kohlendioxid durch die Mikroorganismen; die Zunahme der CO₂-Konzentration wird von den Geräten für die Diagnose ausgewertet. Nach der Probeninjektion in mikrobiologische Kulturmedien für automatisierte Kultursysteme besteht die Möglichkeit, dass sich kontaminierende Mikroorganismen während des Transportes vermehren. Dadurch können bereits vor deren Eingabe in die Kulturautomaten relativ hohe Konzentrationen an CO₂ in den Medien-Flaschen bestehen. Durch diesen hohen Ausgangswert ist die weitere Zunahme von CO₂ in den Flaschen eingeschränkt und es besteht das Risiko, dass die Automaten keinen ausreichenden Anstieg registrieren, wodurch es zu falsch negativen Ergebnissen in der mikrobiologischen Kontrolle kommen kann.

Aus den genannten Gründen sind die mit den Untersuchungsproben inokulierten Kulturflaschen unverzüglich in die Kulturautomaten einzustellen. Falls die beimpften Kulturflaschen im Einzelfall mehr als 12 Stunden gelagert bzw. transportiert wurden, muss der Flascheninhalt nach der 7-tägigen Inkubation auf zwei feste Kulturmedien ausgestrichen werden, welche aerob bzw. anaerob zu bebrüten und auf Wachstum von Mikroorganismen zu überprüfen sind. Ist eine sofortige Beimpfung und Inkubation der Proben nicht möglich, kann alternativ die Probe vor Beimpfung der Kulturflaschen unter Bedingungen gelagert werden, die der Lagerung der Stammzellpräparate vor Transplantation bzw. vor Kryokonservierung gleicht. DMSO-haltige Präparateproben sollten im Falle einer Lagerung verdünnt werden.

6. Ansprechpartner

Fachgebiet Bakteriologische Sicherheit

Referenzen

1. Montag, T., M. Störmer, U. Schurig, J. Brachert, M. Bubenzer, U. Sicker, R. Beshir, I. Spreitzer, B. Löschner, C. Bache, B. Becker, C.K. Schneider: Probleme der mikrobiellen Sicherheit bei neuartigen Therapien: Bundesgesundheitsbl 2010, 53: 45 – 51
2. Schurig, U., R. Beshir, S.-B. Nicol, J. Brachert, C.K. Schneider, T. Montag: Sensitivity of the BacT/Alert for detection of different bacteria species (PEI bacteria standards) in dependency on incubation temperature. Poster DGTI Annual Congress 2007, Friedrichshafen, Germany

Änderungsübericht

06/2015: Vorschlag für die Auswahl von Testkeimen für die Matrix-Validierung in Kapitel 2

11/2012: Erläuterungen zur Inkubation bei verschiedenen Temperaturen in Kapitel 3