

Einsatz der Durchflusszytometrie im Reinstwassermonitoring

Seit einiger Zeit werden Schnellmethoden (Rapid Microbiological Methods) als Alternative zum konventionellen Kulturnachweis in der Keimbelastungsdiagnostik diskutiert. Gerade beim Bioburdenmonitoring von Reinstwasser eignet sich die Echtzeitanalyse mit Durchflusszytometrie bestens als Frühwarnsystem.

Wasser ist der wichtigste Hilfsstoff der pharmazeutischen Industrie und essenziell für die Sicherheit von Patienten und die Qualität von pharmazeutischen Produkten (1). Die mikrobiologische Qualität dieses Wassers wird mithilfe des Plattentests bestimmt und in Koloniebildenden Einheiten (KBE) angegeben. Diese Methode ist eindeutig in den Pharmakopöen definiert. Ihre Durchführung nimmt 5 Tage in Anspruch und ist damit ein offensichtliches Hindernis zur schnellen Produktfreigabe. Mikrobiologische Schnellmethoden (engl.: rapid microbiological methods = RMM) dagegen bestimmen die mikrobiologische Qualität schneller und in einigen Fällen sogar kontinuierlich, wie zum Beispiel bei der Bioburden-Analyse von Wasser in Echtzeit. In vielen Industrien kommen mikrobiologische Schnellmethoden bereits seit mehr als drei Jahrzehnten zum Einsatz. In der pharmazeutischen Industrie wächst das Interesse an RMM seit einigen Jahren stetig und immer mehr Unternehmen sind von den Vorteilen der kontinuierlichen mikrobiologischen Überwachung überzeugt (2). «Online Water Bioburden Analysers» (OWBA) sind seit einigen Jahren auf dem pharmazeutischen Markt verfügbar und das Interesse an ihnen wächst, was beispielsweise an der Gründung der OWBA Arbeitsgruppe (3) zu erkennen ist. Leitfäden, wie der neuste Revisionsentwurf des EU-GMP Annex 1, unterstützen ausdrücklich die Implementierung von RMM und weisen darauf hin, dass diese Technologien «in Erwägung gezogen werden sollten, um den Schutz von Produkten vor mikrobiellen Kontaminationen zu erhöhen» (4).

Automatisierte Online-Durchflusszytometrie

Eine der zukunftsfähigsten Alternativen zur Arzneibuchmethode ist die Durchflusszytometrie, die erstmalig in den späten Neunzigerjahren zur Anwendung kam. Ursprünglich wurde diese Technologie für die Messung von menschlichen Zellen

eingesetzt, heute findet sie insbesondere bei immunologischen Untersuchungen Verwendung (5). Mit dem Fortschritt der Technologie und der Verfügbarkeit neuartiger Farbstoffe für spezifische bakterielle Eigenschaften (6) wurde es möglich, die Durchflusszytometrie auf zahlreiche industrielle mikrobiologische Prozesse anzuwenden (7). So auch in der Trinkwasserindustrie, wo die Durchflusszytometrie vor gut einem Jahrzehnt eingeführt wurde. Seither etabliert sie sich als mikrobiologisches Standardwerkzeug zur Zählung der im Wasser vorhandenen Bakterien, zur Überwachung von Aufbereitungsprozessen wie Desinfektion oder Ultrafiltration und zur Beurteilung der allgemeinen mikrobiologischen Qualität von Roh- und aufbereitetem Wasser (8). Wie bereits in der Europäischen Pharmakopöe (Ph. Eur. 5.1.6) erwähnt, ist die Durchflusszytometrie eine ernstzunehmende Technologie auf dem Gebiet der kontinuierlichen pharmazeutischen Wasserüberwachung, sowohl was die Genauigkeit als auch die Zeit bis zum Ergebnis betrifft.



Abbildung 1: AQU@Sense MB (Bilder: BWT)

Das Grundprinzip der durchflusszytometrischen Messung ist der Nachweis und die Quantifizierung von Schwebeteilchen, die in einer Wasserprobe vorhanden sind. Durch die Anfärbung von Bakterien mit DNS-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen werden die Zellen präzise von anorganischen Partikeln unterschieden. Die Wasserprobe wird in einem engen Strahl fokussiert und mit einem eng gebündelten Laserstrahl angeregt. Optische Detektoren zeichnen die Lichtstreuung und die emittierte Fluoreszenz auf und können so multiparametrische Informationen sichtbar machen, die von der Zellkonzentration bis zur Lebensfähigkeit der detektierten Zellen reichen.

Der AQU@Sense MB, der in Zusammenarbeit mit bNovate Technologies entwickelt wurde, ist ein vollautomatisches Durchflusszytometer für die Online-Bioburdenanalyse von Reinstwasser (Abbildung 1). Der kontinuierliche Batch-Prozess der Probenahme, die Anfärbung und die Messung sind durch eine integrierte mikrofluidische Probenvorbereitungseinheit vollständig automatisiert. Darüber hinaus sind die Reagenzien, die für bis zu 1.000 Messungen ausreichen, in einer hermetisch verschlossenen und recycelbaren Kartusche verpackt, die ohne Handhabung von Chemikalien ausgetauscht werden kann. Mit dem wählbaren Messintervall von 30 Minuten bis 6 Stunden kann der AQU@Sense MB während mehrerer Monate autonom arbeiten.

Der AQU@Sense MB quantifiziert schnell und direkt die Intakt-Zellzahl (ICC). Dabei handelt es sich um eine mikrobiologische Einheit, die bei im Labor kultivierten Bakterien eine lineare Beziehung zur KBE gezeigt hat (9). ICC wird mit einem bereits etablierten Verfahren der Doppelfärbung quantifiziert. Dieses Verfahren verwendet die fluoreszierenden DNS-Farbstoffe SYBR Green I (SGI) und Propidiumiodid (PI) (10). Die Beurteilung der bakteriellen Membranintegrität ist aufgrund der unterschiedlichen Penetrationseigenschaften

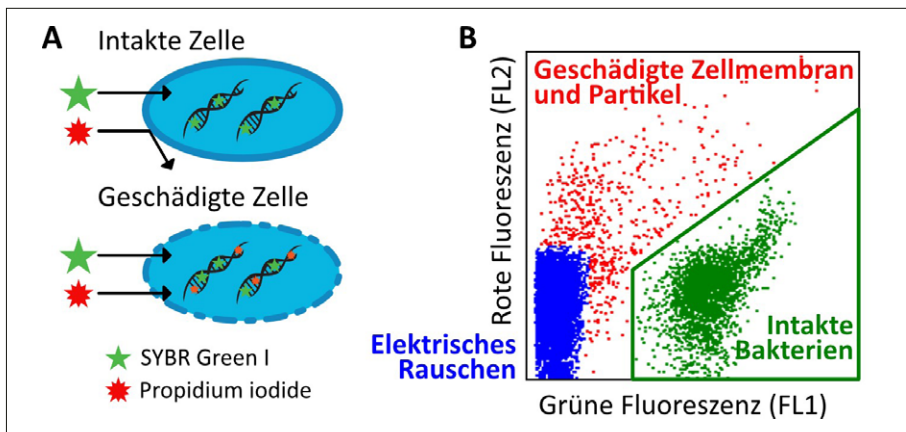


Abbildung 2: (A) Die ICC-Auszählung basiert auf der Bewertung der bakteriellen Membranintegrität mit den DNS-Farbstoffen SGI (grüne Fluoreszenz) und PI (rote Fluoreszenz). SGI färbt alle nukleinsäurehaltigen Bakterien, während das nicht durchdringungsfähige PI nur beschädigte Membranen durchqueren kann. (B) Typische Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Messung. Jeder Punkt stellt ein vom Durchflusszytometer erfasstes Partikel dar. Intakte Bakterien sind grün und geschädigte Bakterien und anorganische Partikel sind rot dargestellt.

der beiden Farbstoffe möglich. Während hydrophobe SGI-Moleküle bakterielle Zellmembranen frei durchqueren können, ist PI ein membranundurchlässiger Farbstoff, der nur Zellmembranen von Bakterien mit beeinträchtigter Membranintegrität (z. B. nach Hitzeschock oder oxidativen Prozessen) durchdringen kann (8) (Abbildung 2). Somit ist die Membranintegrität ein wesentliches Kriterium der bakteriellen Le-

bensfähigkeit. Diese Methode hat den zusätzlichen Vorteil, dass sie alle in einer Probe vorhandenen lebensfähigen Bakterien nachweist, einschliesslich der so genannten Viable-But-Non-Culturable-Bakterien (VBNC) (11).

Typische Daten des AQU@Sense MB
Gemäss für die Pharmaindustrie relevanter Leitfäden wie den Pharmakopöen und

dem PDA TR-33 müssen alternative mikrobiologische Methoden in der Lage sein, eine Auswahl pharmazeutisch relevanter Bakterien nachzuweisen (12; 13; 14). Diese Auswahl sollte die in den entsprechenden Kapiteln erwähnten Kultursammelstämme enthalten und möglichst eine Vielzahl der Bakterien abdecken, die häufig in pharmazeutischen Wassersystemen vorkommen. Einige der relevanten Bakterien sind möglicherweise mit dem Standard-Plattentest nicht nachweisbar (15). Wie in Abbildung 3 (A und B) dargestellt, weist der AQU@Sense MB die relevanten Bakterien in einer beimpften Suspension nach.

Die grösste Herausforderung für den Einsatz von OWBA, die auf der intrinsischen Fluoreszenz beruhen, ist die Neigung, Partikel fälschlicherweise als Bakterien zu identifizieren (16). Falsch-positive Ergebnisse werden oft durch Teflon- und Roundingpartikel aus dem Wassersystem verursacht. Da die Durchflusszytometrie eine DNS-spezifische Anfärbung verwendet, kann der AQU@Sense MB zwischen den Signalen von Partikeln und gefärbten Zellen eindeutig unterscheiden (Abbildung 3 C und D). Darüber hinaus stellt der oben beschriebene kontinuierliche Batch-Prozess sicher, dass Schwankungen in Temperatur und Durchflussrate des Mediums das Signal nicht beeinflussen.

Weit denken – umsetzbar planen

Profitieren Sie von Engagement und Weitsicht. Mit innovativen Ideen und erprobten Technologien für Energie- und Gebäudetechnik finden wir die richtige Lösung für Ihr Vorhaben. Sagen Sie uns, was wir für Sie tun können.

Vadea AG
Bahnhofplatz 1c
8304 Wallisellen

T +41 44 874 13 00
info@vadea.ch
vadea.ch

VADEA
Engineering

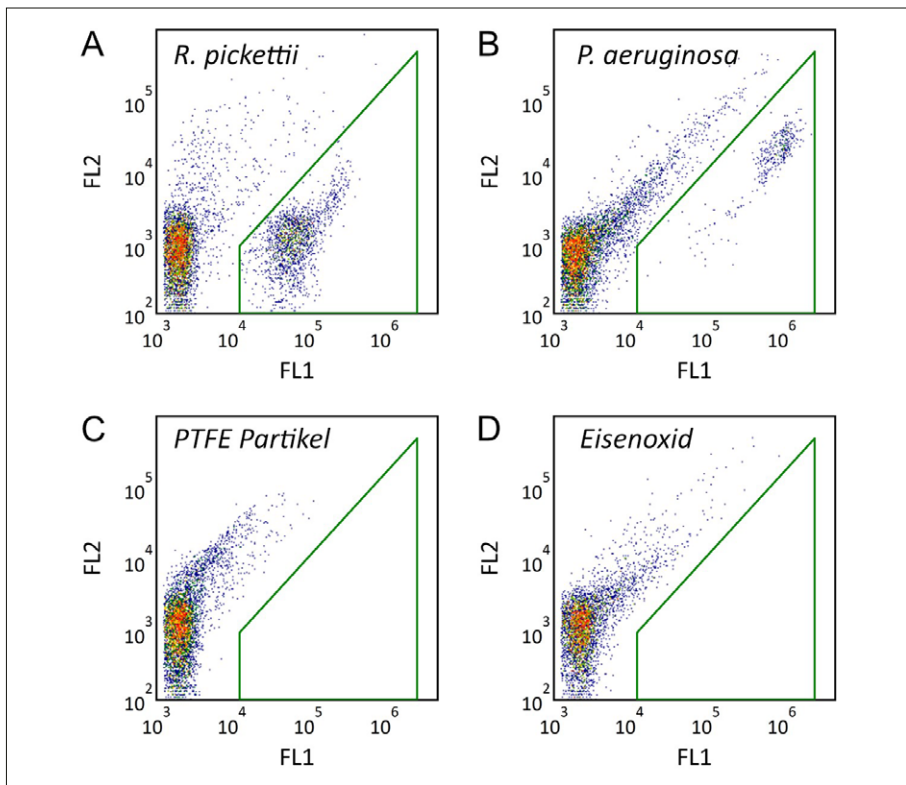


Abbildung 3: Beispiele für mit dem AQU@Sense MB gemessene Dotplots. (A) *Ralstonia pickettii*, (B) *Pseudomonas aeruginosa*, (C) 1 µm Polytetrafluorethylen (PTFE)-Partikel mit 10 mg/ml in H₂O und (D) 5 µm Fe₃O₄-Partikel mit 10 mg/ml in H₂O.

Kontinuierliches Monitoring von gereinigtem Wasser

Kundentests konnten eindeutig nachweisen, dass die kontinuierliche Überwachung klare betriebliche Vorteile hat. Am 22.10.2019 implementierte ein Kunde aus der pharmazeutischen Industrie den AQU@Sense MB in ein Verteilsystem von gereinigtem Wasser und analysierte kontinuierlich alle 30 Minuten die mikrobiologische Qualität des Wassers (Abbildung 4). Die Basislinie war stabil im sehr niedrigen Bereich, bis am 27.10.2019 Werte von bis zu 4.500 ICC/ml festgestellt wurden.

Da der Kunde die konventionelle Platten-tests nur auf monatlicher Basis durchführ-

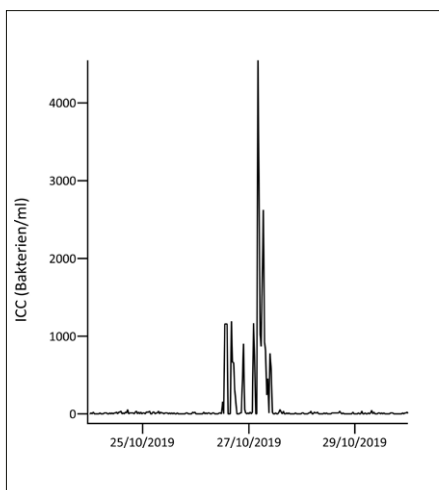


Abbildung 4: Kontinuierliches Monitoring von gereinigtem Wasser.

te, konnte kein direkter Zusammenhang mit den erhöhten Messwerten des AQU@Sense MB hergestellt werden. Als der routinemässige Plattentest am 05.11.2019 durchgeführt wurde, wurden jedoch ungewöhnlich hohe KBE-Werte festgestellt. Daraufhin führte das Unternehmen eine interne Untersuchung durch und fand technische Probleme im Wasserverteilungssystem, die den Anstieg der Keimzahlen und der ICC erklärten. Der AQU@Sense MB funktionierte erfolgreich als Frühwarnsystem, da er korrekt ein mikrobiologisches Problem im Wasserverteilungssystem erkannte.

Wenn der AQU@Sense MB in ein Lager- und Verteilsystem oder einem Erzeuger eingesetzt wird, kann er die weitere Kontamination in nachgelagerten Systemen und Produktionseinrichtungen verhindern. Als Frühwarnsystem eingesetzt kann er das Risiko für Patienten und Produkte minimieren.

Schlussfolgerung

Die relevanten Behörden der Pharmaindustrie unterstützen den Einsatz von RMM zur Verbesserung der Produktsicherheit. Die Durchflusszytometrie verwendet einen DNS-spezifischen Farbstoff und vermeidet damit die Probleme anderer OWBAs. Der AQU@Sense MB ist ein Frühwarnsystem, das es den Anwendern ermöglicht, die Wasserqualität jederzeit genau zu beurteilen und so einen sicheren und effizienteren Anlagenbetrieb zu gewährleisten.

Autoren:

Dr. Luigino Grasso, Chief Technology Officer bNovate Technologies
Felix Thiele, Product Manager Analytical Technology, BWT AQUA AG

Erstveröffentlichung: European Pharmaceutical Review, Volume 25, Issue 03

Referenzen:

- ¹⁾ ISPE Baseline Guide Volume 4. Water and Steam Systems. 2nd Edition. December 2011
- ²⁾ Miller M. The regulatory acceptance of rapid microbiological methods [Internet]. European Pharmaceutical Review. 2020 [cited 12 June 2020]. Available from: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/62880/rapid-microbiological-methodsregulatory-acceptance/>
- ³⁾ Cundell, Gordon, Haycocks, Johnston, Luebke, Lewis et al. Novel Concept for Online Water Bioburden Analysis: Key Considerations, Applications, and Business Benefits for Microbiological Risk Reduction [Internet]. Americanpharmaceuticalreview.com. 2020 [cited 12 June 2020]. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/140513-Novel-Concept-for-Online-Water-Bioburden-Analysis-Key-Considerations-Applications-and-Business-Benefits-for-Microbiological-Risk-Reduction/>
- ⁴⁾ EU GMP Annex 1 Revision: Manufacture of Sterile Medicinal Products (Draft) – GMP Navigator [Internet]. Gmp-navigator.com. 2020 [cited 12 June 2020]. Available from: <https://www.gmp-navigator.com/guidelines/gmp-guideline/eu-gmp-annex-1-revision-manufacture-of-sterile-medicinal-products-draft>
- ⁵⁾ Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Critical Reviews in Biotechnology. 2016;37(2):163-176.
- ⁶⁾ Hammes F., Egli T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010;397(3):1083-1095.
- ⁷⁾ Diaz M., Herrero M., García L., Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical Engineering Journal. 2010;48(3):385-407.
- ⁸⁾ Van Nevel S., Koetzsch S., Proctor C., Besmer M., Prest E., Vrouwenvelder J. et al. Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. Water Research. 2017;113:191-206.
- ⁹⁾ Ou F., McGoverin C., Swift S., Vanholsbeeck F. Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry. Journal of Applied Microbiology. 2017;123(2):464-477.
- ¹⁰⁾ Nescerecka A., Hammes F., Juhna T. A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. Journal of Microbiological Methods. 2016;131:172-180.
- ¹¹⁾ Oliver J. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. J Microbiol. 2005;43:Spec No:93-100.
- ¹²⁾ USP <1223>
- ¹³⁾ Ph. Eur. 5.1.6
- ¹⁴⁾ PDA TR-33
- ¹⁵⁾ Sandle T., Burkholderia cepacia complex: review of origins, risks and test methodologies [Internet]. European Pharmaceutical Review. 2020 [cited 12 June 2020]. Available from: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/80557/burkholderia-cepacia-complexreview-of-origins-risks-and-test-methodologies/>
- ¹⁶⁾ Experimental Methods For Microorganism Challenges On Online Water Bioburden Analyzers [Internet]. Pharmaceuticalonline.com. 2020 [cited 12 June 2020]. Available from: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/experimental-methods-for-microorganismchallenges-on-online-water-bioburdenanalyzers-0001>

Weitere Informationen

BWT AQUA AG
Hauptstrasse 192
CH-4147 Aesch
+41 61 755 88 99
info@bwt-aqua.ch
www.bwt-aqua.ch