

Nutzen der EN-Prüfungen von Desinfektionsmitteln

Im Rahmen der FDA-Richtlinie für die pharmazeutische Industrie

Production hygiene is of major importance in many areas, as it is directly related to the quality and safety of the products manufactured. Statutory requirements are increasing in line with the rising significance of hygiene in production processes, and international standards are becoming evermore important in the wake of globalisation and the associated activities in the international marketplace. An example of this is the growing influence of the American Food and Drug Administration (FDA) in international competition, which presents the user with new challenges. At the same time, the harmonization of international testing regulations (e.g. European Norms, EN) opens up new options of risk assessment for the user, which are to be addressed in the following article.

Die Produktionshygiene spielt in vielen Bereichen eine große Rolle, hängt sie doch direkt mit der Qualität und der Sicherheit der hergestellten Produkte zusammen. Mit der zunehmenden Bedeutung der Hygiene in Produktionsprozessen steigen die gesetzlichen Anforderungen, und im Zuge der Globalisierung und der damit einhergehenden Tätigkeit im internationalen Umfeld gewinnen internationale Standards zunehmend an Bedeutung. Ein Beispiel hierfür ist der steigende Einfluss der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) im internationalen Wettbewerb, die den Anwender vor neue Herausforderungen stellt. Gleichzeitig eröffnet die Vereinheitlichung von internationalen Prüfvorschriften (z. B. Europäische Normen, EN) dem Anwender neue Chancen zur Risikobewertung, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

FDA-Richtlinie und Desinfektionsmaßnahmen

Die Richtlinie der Food and Drug Administration, FDA (9/2004) für den Bereich der pharmazeu-

tischen Industrie sieht vor, dass die Wirksamkeit der verwendeten Desinfektionsmittel sowie der angewendeten Desinfektionsmaßnahmen nachgewiesen werden muss, potentielle mikrobielle Kontaminanten wirksam von Oberflächen zu



Abb. 2: ... und so erkennen Sie die EN-geprüften Desinfektionsmittel von Schülke & Mayr

entfernen. Zur Überwachung der Wirksamkeit der angewendeten Desinfektionsverfahren sieht die Richtlinie eine regelmäßige Überwachung durch Hygiene-Kontrollen vor (z. B. Abklatschuntersuchungen, Luftkeimzahlbestimmungen, etc.). Mit Hilfe dieser Überwachung ist es den Verantwortlichen möglich, Hygienemängel zu erkennen und Korrekturmaßnahmen einzuleiten.

Die praxisnahen Desinfektionsmittelprüfungen gemäß EN können dem Anwender helfen, ein geeignetes Desinfektionsprogramm basierend auf der FDA-Richtlinie gemäß den individuellen Anforderungen, zu erstellen. Dazu ist es hilfreich, die in den entsprechenden Bereichen zu erwartende mikrobielle Kontamination einzuschätzen. Legt man die empfohlenen Grenzwerte für mikrobiologische Überwachung reiner Bereiche zugrunde (EG-GMP-Leitfaden, Annex 1), so liegt die maximale Kontamination bei 50 KBE (Kolonie bildende Einheiten)/Platte (Ø 55 mm; Fläche 23,8 cm²) (Reinraumklasse D). Mit einem flächendesinfizierenden Mittel, das gemäß EN 13697 unter praxisnahen Bedingungen getestet wurde, wird dagegen eine Reduktion der Keimzahl von 3-4 log-Stufen auf einer Oberfläche mit Ø 20 mm (3,1 cm²) erreicht. Tabelle 1 stellt die nach Annex 1 EG-GMP-Leitfaden empfohlenen Grenzwerte den Anforderungen der EN-Prüfmethode EN 13697 gegenüber und zeigt deutlich, dass ein nach EN getestetes Produkt folglich einen Sicherheitsbereich von 2-3-log-Stufen bei Verwendung in reinen Bereichen bietet.

Sichere Wirksamkeit durch EN-Prüfungen

Die Prüfungen nach EN sind in verschiedene Kategorien (CEN/TC 216) eingeteilt, die dazu

Bakterielle Sporen > Pseudomonaden > Schimmelpilze / Hefen > Gram-positive Bakterien > Gram-negative Bakterien

Abb. 1: Übersicht über die relative Widerstandsfähigkeit verschiedener Mikroorganismen gegenüber Desinfektionsmitteln. In Abhängigkeit von den verwendeten Wirkstoffen kann es zu hier zu Variationen kommen.

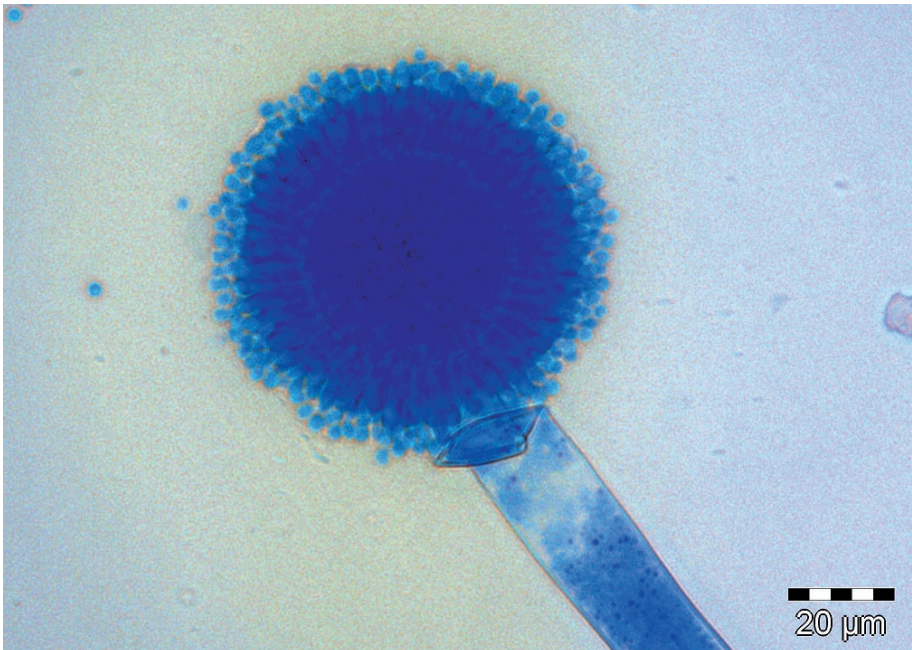


Abb. 3: Mikroskopische Aufnahme von *Aspergillus niger* ATCC 16404, Konidienträger, 400 x. Färbung mit Neissers Lösung Ia (Merthylenblau).

Tab. 1: Gegenüberstellung der empfohlenen Grenzwerte nach EG-GMP-Richtlinie und der Anforderungen der EN-Prüfungen für Desinfektionsmittel unter praxisnahen Bedingungen (Phase 2/Stufe 2).

[†] Testoberfläche standardisiert, Ø 20 mm, nicht-rostender Stahl 1.4301 (nach EN 10088-1)

* Es existiert noch keine Phase 2/Stufe 2-Prüfmethode für Sporizidie. Die sporizide Wirksamkeit kann aber gemäß der Methodik der EN 13697 analog der Prüfung auf Bakterizidie und Fungizidie geprüft werden. Die Sporenanzucht erfolgt gemäß EN 13704 (Phase 2/Stufe 1).

[†] Kontaktplatten KBE/ Platte Ø 55 mm

Europäische Norm (EN)	geforderte Produktion	empfohlener Grenzwert gemäß EG-GMP-Leitfaden (Klasse D) [†]
EN 13697 [†] Phase 2/Stufe 2 bakterizide Wirksamkeit	4-log	50 KBE/Platte (1 log-Stufe)
EN 13697 [†] Phase 2/Stufe 2 fungizide Wirksamkeit	4-log	50 KBE/Platte (1 log-Stufe)
EN 13697 [†] (modifiziert)* Phase 2/Stufe 2 sporizide Wirksamkeit	3-log	50 KBE/Platte (1 log-Stufe)

dienen, das Produkt sukzessive auf seine Eignung unter simulierten Praxisbedingungen zu



Abb. 4: Kolonien von *A. niger* auf Sabouraud-Medium. Der Schimmelpilz *Aspergillus niger* ATCC 16404 dient als Prüforganismus bei Testung von Desinfektionsmitteln auf fungizide Wirksamkeit.

testen. Das Kriterium, nach dem beurteilt wird, ob das geprüfte Produkt gemäß EN wirksam ist, ist dabei die Reduktion der Keimzahl der Mikroorganismen, die in 10-er Potenzen (= log-Stufen) angegeben wird. Die für die Auslobung der jeweiligen mikrobiziden Wirksamkeit geforderte Reduktion von Mikroorganismen liegt dabei je nach Prüfvorschrift zwischen 3-log und 5-log-Stufen, d.h. die vom Hersteller angegebene Konzentration muß in der vorgegebenen Einwirkzeit zu einer Reduktion um mindestens 99,9% bzw. 99,999% Mikroorganismen führen.

Die Prüfkategorien zur sukzessiven Prüfung von Desinfektionsmitteln nach EN sind wie folgt charakterisiert:

Phase 1-Prüfungen

Quantitative Suspensionsversuche, mit denen bestätigt werden soll, ob das Produkt bakterizide, fungizide oder sporizide Wirksamkeit besitzt.

Tab. 2: Prüfbedingungen der Phase 1-Prüfungen nach EN.

Europäische Norm (EN)	Testorganismen	Organische Belastung	geforderte Reduktion
EN 1040 Phase 1 bakterizide Wirksamkeit	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	/	5,0 log
EN 1275 Phase 1 fungizide Wirksamkeit	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	/	4,0 log
EN 14347 Phase 1 sporizide Wirksamkeit	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 12826	/	4,0 log

Bei diesen Prüfungen, den sog. „Basistests“ geht es noch nicht um die Prüfung der besonderen Bedingungen unter Berücksichtigung der zukünftigen Verwendung des Produktes, sondern lediglich um die Fragestellung, ob das Produkt prinzipiell eine ausreichende mikrobizide Wirksamkeit besitzt. Die Phase 1-Prüfungen beinhalten daher keine Prüfung in Anwesenheit von organischer Belastung (z. B. Rinderserumalbu-

min). Da die Prüfungen unterteilt sind in Prüfung der bakteriziden (EN 1040), fungiziden (EN 1275) und sporiziden (EN 14347) Wirksamkeit, kann mit Hilfe dieser Untersuchungen ermittelt werden, welches prinzipielle Wirkspektrum das Desinfektionsmittel besitzt. Gefordert ist dabei eine Reduktion der Keimzahl von mindestens 4,0 log für fungizide und sporizide Wirksamkeit (EN 1275 und EN 14347) und 5,0 log für bakteri-

Tab. 3: Prüfbedingungen der Phase 2-Prüfungen nach EN.

* weitere zusätzliche Prüfbedingungen gestattet

† weitere zusätzliche Spezies gestattet

Europäische Norm (EN)	Testorganismen	Organische Belastung	geforderte Reduktion
Phase 2/Stufe 1-Prüfungen			
EN 1276 Phase 2/Stufe 1 bakterizide Wirksamkeit	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 †	niedrige Belastung: 0,03 % BSA hohe Belastung: 0,3 % BSA*	5,0 log
EN 1650 Phase 2/Stufe 1 fungizide Wirksamkeit	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 †	niedrige Belastung: 0,03 % BSA hohe Belastung: 0,3 % BSA*	4,0 log
EN 13704 Phase 2/Stufe 1 sporizide Wirksamkeit	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (obligatorisch) <i>Bacillus cereus</i> ATCC 12826 <i>Clostridium sporogenes</i> 51 CIP 7 939 (zusätzlich)	niedrige Belastung: 0,03 % BSA	3,0 log
Phase 2/Stufe 2-Prüfungen			
EN 13697 Phase 2/Stufe 2 bakterizide Wirksamkeit (Bereiche Lebensmittel, Industrie u. öffentliche Einrichtungen)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 †	niedrige Belastung: 0,03 % BSA hohe Belastung: 0,3 % BSA*	4,0 log
EN 13697 Phase 2/Stufe 2 fungizide Wirksamkeit (Bereiche Lebensmittel, Industrie u. öffentliche Einrichtungen)	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 †	niedrige Belastung: 0,03 % BSA hohe Belastung: 0,3 % BSA*	4,0 log

zide Wirksamkeit (EN 1040). Tabelle 1 zeigt die Prüfungen der Phase 1 mit den vorgegebenen Prüfororganismen noch einmal im Überblick:

Phase 2-Prüfungen

Sind in zwei Stufen aufgeteilt:

Phase 2/Stufe 1: Quantitative Suspensionsversuche, die die bakterizide, fungizide oder sporizide Wirksamkeit eines Produktes unter simulierten Praxisbedingungen bestätigen sollen. Bei diesen Untersuchungen geht es darum, zu zeigen, dass das Produkt für die vorgesehene Verwendung geeignet ist, indem das Desinfektionsmittel im Gegensatz zu Phase 1-Prüfungen nun in Anwesenheit von organischer Belastung getestet wird (z.B. Rinderserumalbumin). Dabei wird unterschieden zwischen hoher organischer Belastung (z.B. 0,3 % Rinderserumalbumin) und niedriger organischer Belastung (z.B. 0,03 % Rinderserumalbumin). Die Art der Belastungssubstanz orientiert sich dabei an der vorgesehenen Verwendung des Produktes (z.B. Milch für Produkte, die im Lebensmittelbereich eingesetzt werden; Erythrocyten (zusätzlich zu Rinderserumalbumin) für Instrumentendesinfektionsmittel).

Gefordert ist hier eine Reduktion der Keimzahl von mindestens 3,0 log für sporizide Wirksamkeit (EN 13704), von mindestens 4,0 log für fungizide Wirksamkeit (z. B. EN 1650) und eine Reduktion von mindestens 5,0 log für bakterizide Wirksamkeit (z. B. EN 1276).

Phase 2/Stufe 2: Quantitative Laborversuche, in denen die praktischen Bedingungen bei der Anwendung nachgestellt werden, dazu gehören u. a.:

- Versuche auf Testoberflächen (Flächendesinfektionsmittel)
- Versuche mit Keimträgern (Instrumentendesinfektionsmittel)
- Händedesinfektionsversuche

Ziel dieser Untersuchungen ist es, unter Bedingungen, die die spezifischen Charakteristika der vorgesehenen Anwendung möglichst praxisnah nachstellen, die Wirkung des Desinfektionsmittels zu testen. Auch diese Versuche werden in Anwesenheit spezifischer Belastungssubstanzen in Analogie der Phase 2/Stufe 1-Versuche durchgeführt. Neben der Anwesenheit der Belastungssubstanzen kommen hier noch weitere Simulationsparameter wie beispielsweise die Antrocknung auf Oberflächen bei der Untersuchung von Flächen- und Instrumentendesinfektionsmitteln u. ä. hinzu.

Gefordert ist hier eine Reduktion der Keimzahl von mindestens 4,0 log für bakterizide Wirksamkeit (z. B. EN 13697) und eine Reduktion von mindestens 3,0 log für fungizide Wirksamkeit (z.B. EN13697). Tabelle 3 zeigt die Prüfungen der Phase 2 mit den vorgegebenen Prüfororganismen noch einmal im Überblick.

Die Prüfung gemäß EN beinhaltet weiterhin immer die Prüfung von Gram-positiven (z.B. *Staphylococcus aureus*) und Gram-negativen (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) Bakterien bei

Prüfung der bakteriziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln, wobei die vergleichsweise widerstandsfähigen Pseudomonaden als Prüfororganismus mitgeführt werden. Bei Testung auf Fungizidie werden als Testorganismen standardmäßig *Candida albicans* als Vertreterin der Hefen und *Aspergillus niger* als Vertreter der filamentösen Pilze getestet. Die Testung auf Sporizidie sieht als Testorganismus *Bacillus subtilis* vor. Außerdem können *Bacillus cereus* oder *Clostridium sporogenes* bei Bedarf getestet werden. Somit sind die Testorganismen so gewählt, dass das gesamte und in der Praxis relevante Spektrum von Mikroorganismen getestet wird und basierend auf den Unterschieden in der Empfindlichkeit der verschiedenen Testorganismen (s. Abb. 1) eine Wirksamkeit gegenüber dem real zu erwartenden Keimspektrum gewährleistet ist.

EN-Prüfungen als Basis für die interne Risikoabschätzung

Die standardisierten Testparameter und insbesondere die Verwendung eindeutig identifizierter Teststämme im Zuge der EN-Prüfungen gewährleisten eine hohe Validität und bieten somit die Möglichkeit der Erstellung eines geeigneten Desinfektionsprogramms basierend auf der FDA-Richtlinie. Die häufig diskutierte Verwendung von Hausisolaten ist dagegen in diesem Zusammenhang als kritisch zu betrachten, da hier eine Veränderung der Eigenschaften des jeweiligen Isolates im Verlaufe der Kultivierung im Labor als unkalkulierbarer Parameter von Bedeutung ist und somit die Reproduzierbarkeit und Validität der Testergebnisse beeinträchtigt.

Im Rahmen der betriebsspezifischen Risikoabschätzung auf Basis der EN-Prüfungen, werden die realen Parameter der mikrobiellen Kontamination, die durch Hygiene-Kontrollen ermittelt wurden mit den Prüfparametern verglichen (s. Tabelle 1 und Abbildung 1). Auf Basis der durch das Hygienemonitoring ermittelten Kontamination kann dann eine entsprechende Anpassung der Desinfektionsmaßnahmen (z.B. Einsatz eines Produktes mit sporizider Wirksamkeit bei Kontamination mit bakteriellen Sporen) erfolgen. Die grobe Einteilung der Mikroorganismen in Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmitteln (Abb. 1) ermöglicht dabei, abzuschätzen, ob eine Wirksamkeit gegenüber einer zu erwartenden oder im Monitoring nachgewiesenen Spezies (z.B. *Klebsiella pneumoniae*), gegeben ist. So handelt es sich bei dem Beispiel *K. pneumoniae* um einen Gram-negativen Organismus, gegen den ein bakterizides Produkt, das gemäß EN 13697 gegen den ebenfalls Gram-negativen Testorganismus *Escherichia coli* ATCC 10541 geprüft wurde, wirksam ist. Die Wirksamkeit der aus dieser Abschätzung resultierenden Maßnahmen kann dann konsequent mit Hilfe regelmäßiger Hygienekontrollen überprüft und dokumentiert werden. Dieser Monitoringprozeß ist von überaus großer Bedeutung, da nur durch die regelmäßige Überwachung festgestellt werden kann, ob die gewählten Desinfektionsparameter in der Praxis

tatsächlich wirksam sind, oder ob eine Anpassung notwendig ist. Weder die Risikoabschätzung noch eine aus oben genannten Gründen als kritisch zu bewertende Prüfung von Hausisolaten kann dies leisten und den Monitoring-prozeß ersetzen.

Die EN-Prüfungen von Desinfektionsmitteln bilden somit zusammen mit der hausinternen Risikobewertung eine gute Basis zur Erfüllung der FDA-Richtlinie.

Literatur

1. **U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2004):** Guidance for Industry. Sterile drug products produced by aseptic processing – current good manufacturing practice.
<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.html>
2. **EG-GMP-Leitfaden, Anhang 1,** deutsche Übersetzung - Herstellung steriler Arzneimittel, In: GMP-Berater (Stand September 2006): Maas & Peither GMP Verlag, Schopfheim
3. **European Committee for Standardisation.** 2001. European standard EN 13697: chemical disinfectants and antiseptics – quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic, and institutional areas – Test method and requirements without mechanical action (phase2/step1).

European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium

4. **European Committee for Standardisation.** 2003. CEN/TC 216 – Application of European standards for chemical disinfectants and antiseptics. European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium
5. **European Committee for Standardisation.** 2005. European standard EN 1040: chemical disinfectants – quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase1). European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium
6. **European Committee for Standardisation.** 2005. European standard EN 1275: chemical disinfectants – quantitative suspension test for the evaluation of basic fungicidal or basic yeaticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase1). European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium
7. **European Committee for Standardisation.** 2005. European standard EN 1040: chemical disinfectants – quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase1). European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium
8. **European Committee for Standardisation.** 2005. European standard EN 1040: chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension

test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase1). European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium

9. **European Committee for Standardisation.** 2005. European standard EN 14347: chemical disinfectants and antiseptics – basic sporicidal activity – Test method and requirements (phase1). European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium
10. **European Committee for Standardisation.** 1997. European standard EN 1276: chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas – Test method and requirements (phase2/step1). European Committee for Standardisation, Brussels, Belgium

Weitere Literatur beim Autoren erhältlich

KONTAKT

Dr. Katrin Steinhauer
Schülke & Mayr GmbH
Forschung und Entwicklung
Norderstedt
Tel.: 040/52100557
Fax: 040/52100577
katrin.steinhauer@schuelke-mayr.com
www.schuelke-mayr.com