

Antimikrobielle Aktivität von Zytostatika

Und dennoch führt kein Weg an einer strikt aseptischen Herstellung vorbei

Von Carmela Schumacher und Christian Schmutz, Aarau

Patientenspezifisch verordnete Zytostatika werden heute in Spitälern in der Regel zentralisiert in der Spitalapotheke hergestellt. Das fachliche Know-how und die Erfahrung bezüglich der Herstellung durch geschultes Personal werden hiermit an einem Ort gebündelt. Dies ermöglicht nicht nur eine GMP-konforme aseptische Herstellung, sondern gewährleistet auch den erforderlichen Schutz des herstellenden Personals durch eine adäquate Infrastruktur wie Reinraum und Sicherheitswerkbank. Eine korrekte aseptische Herstellung und ein dazugehöriges Monitoring sind ohne diese Voraussetzungen nicht zu garantieren.

Die aseptische Herstellung von Parenteralia erfolgt idealerweise streng nach Qualitätsmanagement- (QM-) Richtlinien, wie dem PIC-Leitfaden einer Guten Herstellungspraxis für pharmazeutische Produkte (europäische Good Manufacturing Practices, GMP), der United States Pharmacopeial Convention (797) und den GMP-Richtlinien zur Herstellung in kleinen Mengen der Helvetischen Pharmacopoe. Die Herstellung erfolgt entsprechend dieser Regeln in einem Reinraum (idealerweise der Klasse B) und unter vertikalem Laminar-Air-Flow (LAF) einer Sicherheitswerkbank der Reinraumklasse A. Diese strengen Herstellungsbedingungen entsprechen dem Stand der Technik und dienen der bestmöglichen Eliminierung des Risikos einer mikrobiellen und partikulären Kontamination und bieten darüber hinaus einen optimalen Personenschutz.

Traditionelle Zytostatika sind meist per se zytotoxisch. Einige der heute gängigen Zytostatika gehören zur Gruppe von antimikrobiell wirksamen Substanzen, so zum Beispiel Doxorubicin (eine Wirksubstanz der Anthracycline), welches allerdings aufgrund der Toxizität keine Anwendung als Antibiotikum gefunden hat.

Vor diesem Hintergrund kann die Überlegung, solche Zubereitungen als selbstkonservierend anzusehen, durchaus gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Keimwachstum bei einer mikrobiellen Kontamination einer Zytostatikums-Infusion untersucht werden. Hierbei wurde der Wachstumsverlauf von 4 verschiedenen Mikroorganismen in 4 Zytostatikallösungen studiert.

Hintergrund

Zytostatika werden in der Regel nach der Körperoberfläche, teilweise nach dem Körpergewicht dosiert, weshalb die Zubereitungen patientenspezifisch herzustellen sind. Die individuell berechnete Wirkstoffmenge wird einer Medikamentenstammlösung entnommen und einer Infusionslösung (meist NaCl 0,9%) zugesetzt. Ein Behältnis (Stechampulle) Stammlösung kann bei gegebener physikalisch-chemischer Stabilität und unter aseptischen Bedingungen für mehrere Zubereitungen verwendet werden. Die mehrfache Stammlösungsentnahme und die damit einhergehende mehrfache Manipulation des Gummistopfens stellt ein Kontaminationsrisiko dar.

Da Parenteralia nach Vorgabe des Arzneibuches (Pharmacopoe Europeia) steril sein müssen, bei Einzelanfertigungen jedoch keine Sterilitätsprüfung stattfinden kann – deren Resultate bei einer ad hoc Herstellung zur sofortigen Anwendung ohnehin viel zu spät vorliegen würden –,

muss durch geeignete Massnahmen eine mikrobielle Kontamination verhindert werden. Dazu gehören Umgebungsmonitoring, Personalmonitoring, Prozessvalidierungen und Endproduktvalidierungen.

In den meisten Fällen werden die Zytostatika für den sofortigen Gebrauch hergestellt. Je nach physikalisch-chemischer Stabilität des Produktes ist eine Aufbewahrung bis zu einigen Tagen oder wenigen Wochen möglich. Bei einer allfälligen Lagerung ist aus mikrobieller Sicht aufgrund einer Keimwachstumsreduktion oder -hemmung durch niedrige Temperaturen eine Aufbewahrung im Kühlschrank bei 2–8°C grundsätzlich zu bevorzugen. Die Frage nach der Autokonservierung einer Zubereitung durch das Zytostatikum ist durchaus berechtigt.

Für die Versuche wurden vier Substanzen ausgewählt, die verschiedenen Wirkstoffklassen angehören und als Zytostatika häufig eingesetzt werden: 5-Fluorouracil (5-FU, Antimetabolit), Gemcitabin (Antimetabolit), Doxorubicin (Anthracyclin), Vinorelbin (Vinka-Alkaloid). Als Untersuchungskeime wurden die folgenden ubiquitär vorkommenden, fakultativ pathogenen Bakterienspezies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus epidermidis* sowie *Candida albicans* als Pilzspezies definiert.

Hinweise in der Literatur

Verschiedene Publikationen zu Untersuchungen mit vergleichbaren Fragestellungen liegen vor. Die Ergebnisse sind nicht einheitlich und lassen somit keine klaren Rückschlüsse zu, was teilweise durch unterschiedliche Versuchsanordnungen zu erklären sein dürfte. Proben wurden zum Teil nur über

wenige Stunden [5, 6] oder bis zu mehreren Wochen [3] und unter verschiedenen Bedingungen aufbewahrt und untersucht. Auch die Zytostatikakonzentrationen und die Bakterienstämme waren unterschiedlich.

Deshalb können nur wenige allgemeine Schlüsse gezogen werden: Generell wurde für 5-FU die höchste antimikrobielle Aktivität

Doxorubicin 0,15 mg/ml und 1,2 mg/ml; *Gemcitabin* 8 mg/ml und 20 mg/ml; *Vinorelbin* 0,15 mg/ml und 0,6 mg/ml).

Diese Versuchslösungen wurden analog den zur Chemotherapie eingesetzten Herstellungen in einer LAF-Sicherheitswerkbank der Klasse A in jeweils 50 ml NaCl 0,9% (PP-Infusionsbeutel) hergestellt.

Im Weiteren wurden nach dem 5. Tag jeweils weitere 100 µl der Zytostatikallösungen entnommen, zu 9 ml des Flüssignährmediums Thio-T (Nährmedium für Anaerobier, Firma bioMérieux) gegeben und nach 14 Tagen Bebrütung wurde das Nährmedium auf Trübung, d.h., auf Keimwachstum hin untersucht.

Bakterien in Doxorubicinlösungen

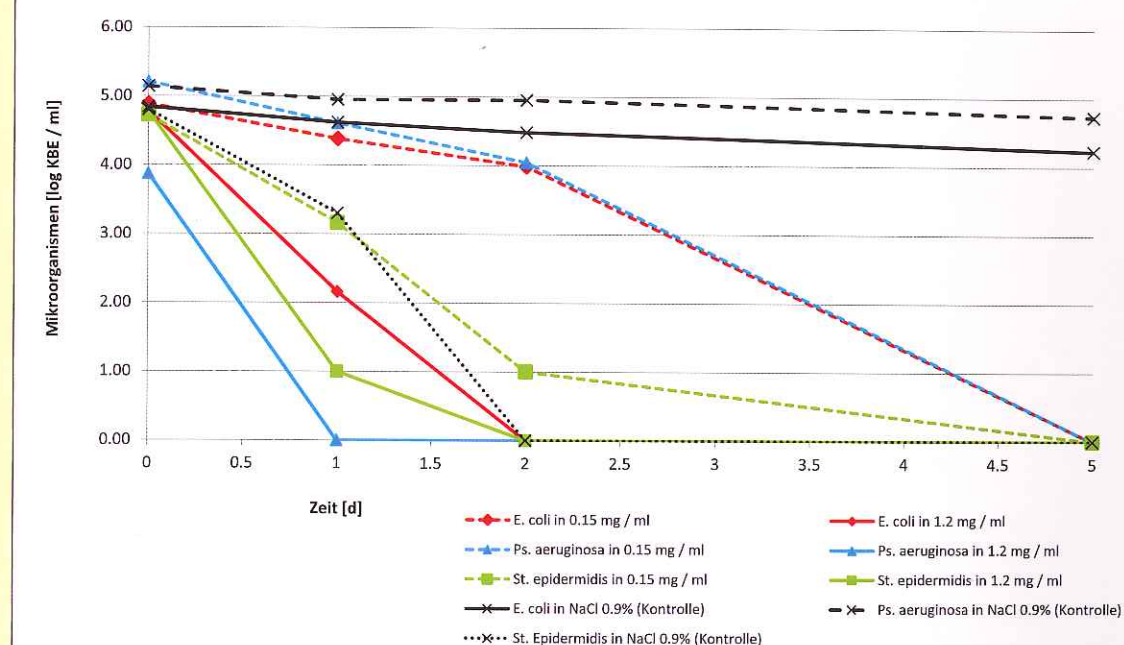


Abb. 1

sowohl gegen Bakterien als auch *C. albicans* nachgewiesen [1–4, 6, 7]. Auch für Doxorubicin konnte eine gewisse antimikrobielle Aktivität festgestellt werden [1, 6]. Des Weiteren zeigte sich auch Vinorelbin schwach antimikrobiell aktiv, wohingegen bei Gemcitabin keine Aktivität beobachtet werden konnte [5].

Methoden

Die vier Zytostatika-Wirkstoffe wurden in jeweils 2 Konzentrationen untersucht – entsprechend dem Bereich, in dem diese Medikamente therapeutisch eingesetzt werden (5-FU 10 mg/ml und 25 mg/ml;

Von diesen Zytostatikallösungen wurden je 990 µl in die Slots einer Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden die Slots jeweils im Triplet mit 10 µl einer Keimsuspension (Inokulation 10^5 Kolonie bildende Einheiten, KBE) beimpft. Parallel dazu wurden auch Slots als positive Kontrolle mit NaCl 0,9% (Infusionsträgerlösung) befüllt und mit den jeweiligen Keimen inokuliert. Die Lagerungstemperatur betrug 30–35°C (Inkubator Typ B6060, Firma Heraeus). Proben wurden jeweils nach < 30 min, 24 h, 48 h und nach 5 Tagen entnommen und auf Schafblut-Agarplatten ausgestrichen. Die Proben wurden anschließend für mindestens 48 h bebrütet, bevor die Kolonien/Platten ausgezählt wurden.

Zusätzlich wurden mit jedem Mikroorganismus Hemmhoftests durchgeführt, bei welchen die Filterpapierscheibchen jeweils mit einer der beiden unterschiedlich konzentrierten Zytostatikallösungen getränkt waren.

Die mikrobiologischen Arbeiten wurden mit Unterstützung der Mikrobiologen im mikrobiologischen Institut des Kantonsspitals Aarau durchgeführt. Als Keime wurden *E. coli* (ATCC 25922), *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853), *St. epidermidis* (ATCC 12228) und *C. albicans* (ATCC 10231) eingesetzt, die Stämme wurden bei der Firma LGC Standards GmbH beschafft.

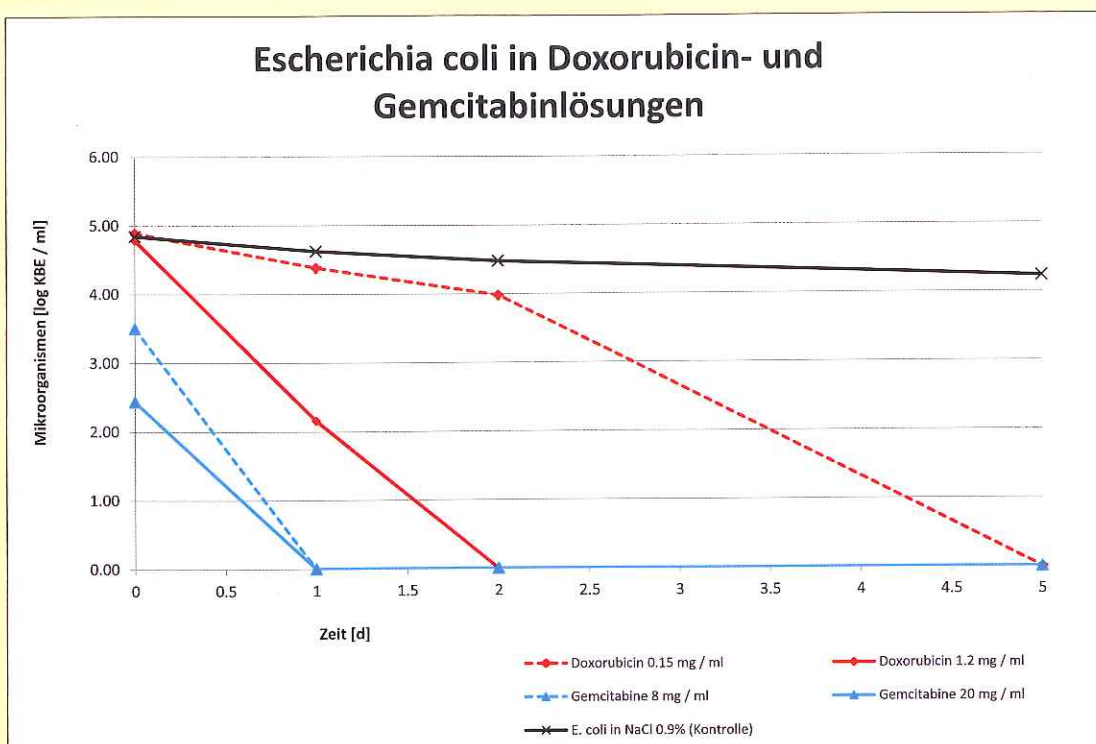


Abb. 2

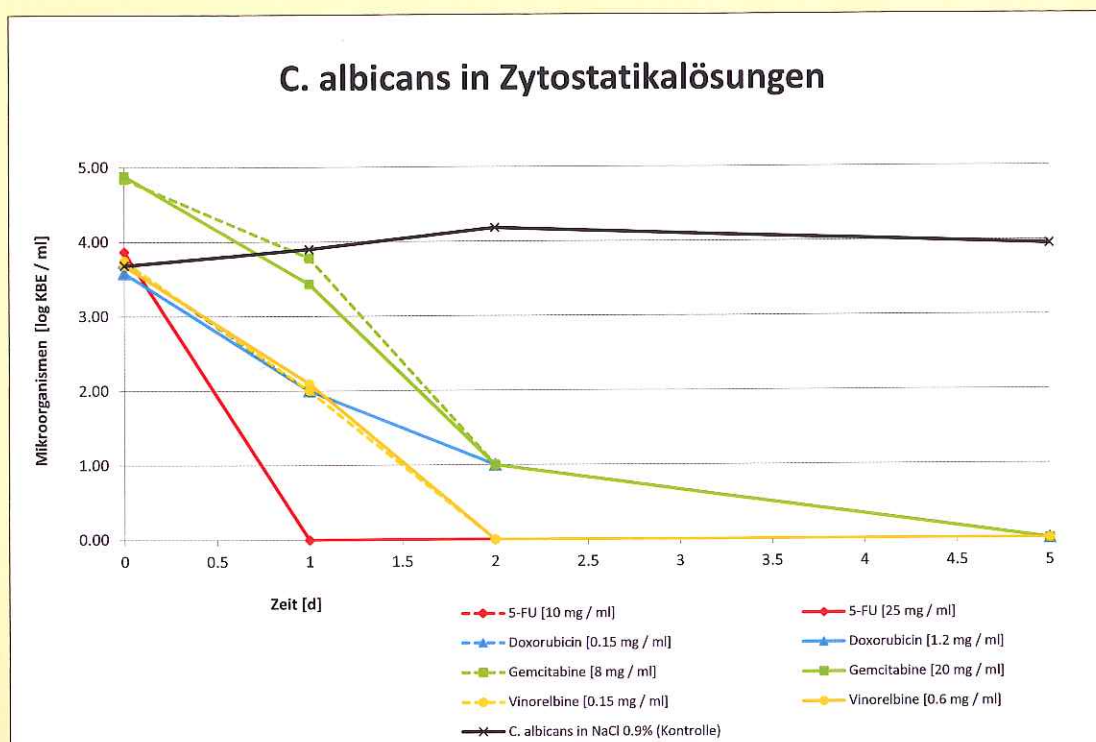


Abb. 3

Resultate

Insgesamt wurden 576 Proben genommen. Fünf Tage nach der Inokulation und Bebrütung konnte in keiner der Proben Keimwachstum festgestellt werden. Die Thio-T Flüssignährmedien blieben

14 Tage nach Bebrütung klar, d.h. es konnte kein Wachstum nachgewiesen werden. In der Kontrolllösung NaCl 0.9% blieben die Keime dagegen, mit Ausnahme von St. Epidermidis, über den ganzen Untersuchungszeitraum von fünf Tagen lebensfähig.

Die eingesetzten Bakterien (Abb. 1) und C. albicans (Abb. 3) zeigten sich deutlich unterschiedlich empfindlich gegenüber den getesteten Wirkstoffen. Am Beispiel E. coli zeigte Gemcitabin die stärkste, Doxorubicin die schwächste antimikrobielle Aktivität

(Abb. 2). Für 5-FU wurde die stärkste antimykotische Aktivität festgestellt (Abb. 3).

In den Hemmhöftests bildete nur 5-FU bei allen eingesetzten Keimen Hemmhöfe (Abb. 4., 5-FU bei E. coli). Weitere Hemmhöfe bildeten auch Doxorubicin und Gemcitabin bei St. epidermidis.

Diskussion

Die Resultate bekräftigen bezüglich 5-FU und Doxorubicin die Ergebnisse der meisten vergleichbaren, vorangegangenen Studien und dokumentieren, dass die beiden Substanzen gegenüber den ausgewählten Keimen antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Aber auch die anderen Zytostatika waren so weit antimikrobiell aktiv, dass nach 5 Tagen Inkubation kein Keimwachstum mehr festgestellt werden konnte.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der eingesetzten Bakterien und des eingesetzten Pilzes kann möglicherweise mit der unterschiedlichen Morphologie von Bakterien und Pilzen erklärt werden. Außer bei 5-FU zeigte sich C. albicans robuster als die Bakterien, was mit der stärkeren Zellmembran von Pilzen und einem daraus resultierenden, im Vergleich zu den Bakterien unterschiedlichen Aufnahmemechanismen für die Wirkstoffe erklärt werden könnte. 5-FU wird tatsächlich auch als Antimykotikum eingesetzt, was durch den festgestellten schnellen Wachstumsabfall bei C. albicans verständlich ist.

Bei den Bakterien war die Reduktion der Lebensfähigkeit konzentrationsabhängig, d.h., ausgeprägter bei höherer Wirkstoffkonzentration. Bei C. albicans zeigte sich dagegen keine konzentrationsabhängige Aktivität.

Als einziger Keim war St. epidermidis in der NaCl-Kontrolllösung nur über 48 Stunden überlebensfähig. Bei einer Wiederholung des Versuchs wurde dieses Resultat bestätigt. In anderen Arbeiten wurden für St. aureus ähnliche Resultate gefunden [5]. Als Begründung hierfür kann eine stärkere Abhängigkeit des Keims von Nährstoffen vermutet werden.

Die Inokulumkonzentration war in diesem Versuch aufgrund der geringen Sensitivität der Auszählungsmethode mit ca. 10^5 Mikroorganismen pro ml relativ hoch gewählt. In einer weiteren analogen Untersuchung sollte das Inokulum reduziert werden, z.B. einer Kontaktkontamination entsprechen und die Proben sollten zudem zu früheren Zeitpunkten genommen werden, um allenfalls dem genauen Zeitpunkt festzustellen, ab dem kein Keimwachstum mehr feststellbar ist.

Die vorliegenden Daten unterstreichen die Notwendigkeit einer strikten aseptischen Herstellung unter den geforderten kontrollierten Bedingungen zur Erzielung eines sterilen Endproduktes.

LITERATUR

- [1] Hamilton-Miller JMY. Br J Cancer 1984; 49:367-9
- [2] Bodet et al. Antimicrobial Agents Chemother 1985; 28:437-39
- [3] Holmes et al. Am J Hosp Pharm 1988; 45:1089-91

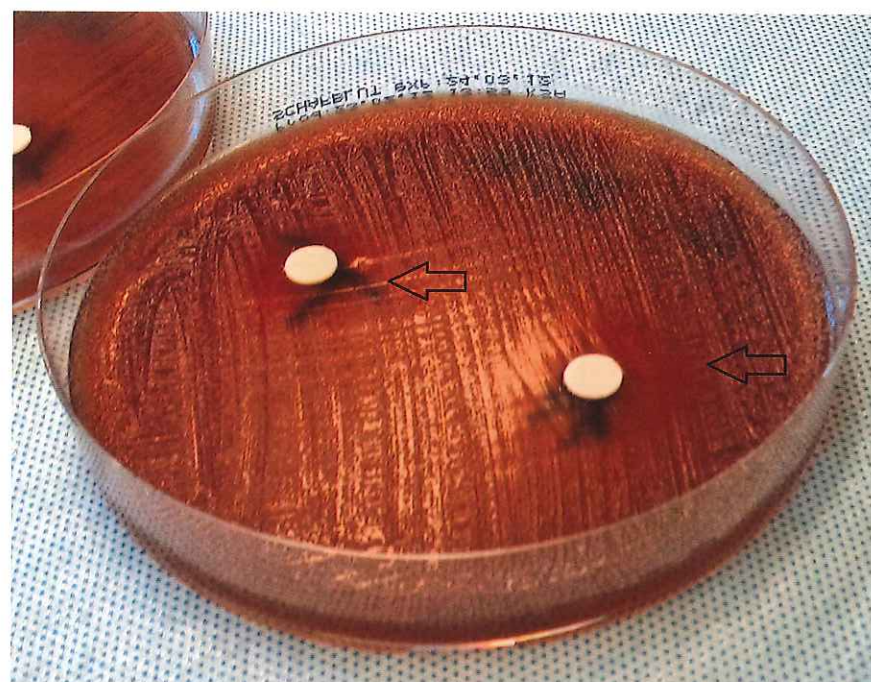


Abb. 4: Hemmhöfe durch 5-FU bei E. coli [5-FU 10 mg/ml (links) und 25 mg/ml (rechts)]

Schlussfolgerung

Die untersuchten Zytostatika zeigten unter den Bedingungen dieser Studie in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration antimikrobielle Eigenschaften. Die Abnahme der Lebensfähigkeit der Keime erfolgt nicht schlagartig, sondern erstreckte sich über einen Zeitraum von 24 bis über 72 Stunden. Deshalb kann grundsätzlich – insbesondere bei niedrig konzentrierten Wirkstoffen – nicht von einer durch das Zytostatikum bewirkten Autosterilität der Lösung ausgegangen werden.

- [4] Krämer I. et al. Krankenhauspharmazie 1988; 11:439-42
- [5] Krämer I. et al. J Oncol Pharm Pract 1998; 4:32-7
- [6] Favier et al. J Oncol Pharm Pract 2001; 6:167-71
- [7] Paris et al. J Oncol Pharm Pract 2005; 11:7-12

FÜR DIE AUTOREN:

Dr. Christian Schmutz
Kantonsspital Aarau AG
Spitalapotheke
Leiter Zytostatikaherstellung
CH 5001 Aarau