

Praxisstämme und deren Verwendung im Rahmen des mikrobiologischen Qualitätsmanagements in der Kosmetik

Dr. Benjamin Kästle* (benjamin.kaestle@sebamed.de), U. Eigener, R. Simmering, Y. Manrique Otero, J. Finke

Dieser Text stellt einen beispielhaften Leitfaden für den Umgang mit Mikroorganismen in der Praxis der Entwicklung, Herstellung und Anwendung kosmetischer Mittel dar. Beleuchtet werden Maßnahmen, die jenseits einer Freigabe- oder Sperr-Entscheidung liegen. Schwerpunkt ist dabei die Verwendung von Mikroorganismen für In-House-Zwecke und den Konservierungsbelastungstest. Idealerweise werden diese Maßnahmen als Teil des Mikrobiologischen Qualitätsmanagements (MQM) begriffen (1,2). Diese Empfehlungen bestehen bereits (ISO1930, SCCS Notes of Guidance), sollen aber hier um neue Details, v.a. hinsichtlich der im Produktionskontext aufgefundenen Stämme erweitert werden.

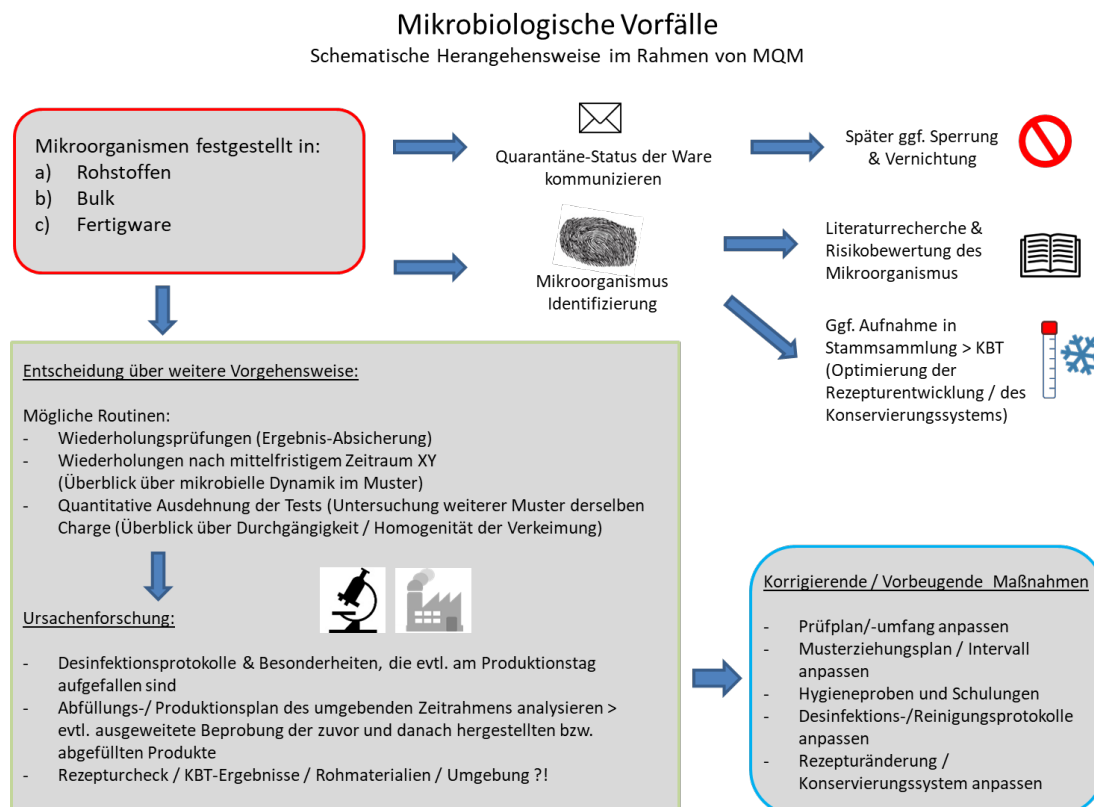


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung zur schematischen Herangehensweise bei mikrobiologischen Vorfällen im Rahmen des Mikrobiologischen Qualitätsmanagements (MQM). Nach der Detektion von Mikroorganismen schließt sich der Sperr- bzw. Freigabeprozess inklusive nachgeschalteter Untersuchungen an. Nach unten und rechts folgen aber ebenso QM-Maßnahmen und Ursachenforschung sowie CAPA-Maßnahmen (corrective actions/preventive actions). Ebenfalls dem Flowchart nach rechts folgend ist das nachhaltige Arbeiten mit dem Praxisstamm im KBT aufgezeigt.

Kontaminationsbefunde und daraus abgeleitete Maßnahmen

Sobald Mikroorganismen in Produkten aufgefunden werden, sollte man sich idealerweise nicht nur mit Informationen bezüglich absoluter Quantität (Total Aerobic Mesophilic Count = TAMC, Total Yeast & Mold Count = TYMC) oder der Abwesenheit von spezifizierten Mikroorganismen zufriedengeben, um eine Freigabe-Entscheidung zu erwirken, sondern auch die Identität des Mikroorganismus klären (3). Hierbei wird von klassischen Kosmetika ausgegangen. Produkte die bestimmungsgemäß lebende/lebensfähige Mikroorganismen enthalten (Probiotika), sind von dieser Betrachtung ausgenommen. Das Erfordernis einer Ursachenanalyse im Falle von mikrobiologischen OOS (out of specification) und OOE's (out of expectation) Ereignissen kann hierbei nicht genug betont werden. Nur bei genauem Überblick über die in kontaminierten Produkten/Rohstoffen vorkommenden Mikroorganismen lassen sich wichtige Erkenntnisse ableiten für:

- a) Mikrobielle Belastung am jeweiligen Produktionsstandort. Dazu gehören auch Probennahme bei Transporteingängen, Bulk & Rohstoffen. Darauf können geänderte/optimierte Hygienemaßnahmen, Reinigungs- und Desinfektionsprotokolle aufbauen.
- b) „Lücken“ in der Konservierung. Schwachstellen gegen einzelne, teils wenig geläufige Mikroorganismen werden erkannt und bieten Anhaltspunkte zur Optimierung von Rezepturen und Konservierungs-Systemen (z.B. Wirkstoffe speziell gegen Gram+/ Gram-Bakterien oder Pilze hinzugeben/erhöhen).
- c) Ausgeweitete bzw. angepasste Konservierungsbelastungstests durch Aufnahme der Mikroorganismen in eine Stammsammlung.
- d) Sinnvolle Erweiterung der Untersuchungsmethodik, des Musterziehungsplans und der Untersuchungsziele/-anforderungen. Unbedingt nachgegangen werden sollte der Frage, woher welche Mikroorganismen eingeschleppt worden sein könnten. Sind Mikroorganismen eher in Rohstoffen (Bacillus spp., Lactobacillus spp. aus biotechnologisch hergestellten Produkten), im Wasser (Enterobakterien, Pseudomonaden) oder durch suboptimale Personalhygiene (Staphylokokken, Mikrokokken) zu erwarten und nach welchem Zeitraum können sie detektiert werden bzw. erwarte ich sie zu entdecken (große Abweichungen der üblichen 3-5 Tagen Bebrütung möglich)?
- e) Verbesserungen hinsichtlich Kontrollen, Freigabekriterien und Spezifikationsfestlegungen auf produkt- bzw. fallbezogene Mikroorganismen. Es wird ermöglicht, Problemkeime aus der Praxis gezielt anzusprechen und künftige Schwierigkeiten mit ihnen gezielt zu verhüten.

In diesem Artikel soll schwerpunktmäßig Punkt c diskutiert werden, während Abb.1 den Gesamtkontext im Mikrobiologischen Qualitätsmanagement auf grafische Weise darstellt.

Umgang mit Praxisstämmen/Umweltisolaten

Näher beschrieben wird im Folgenden das nachhaltige Arbeiten mit potenziell relevanten Mikroorganismen, d.h. deren Aufnahme in die hauseigene Stammsammlung bzw. den Konservierungsbelastungstest. Miteinbezogen werden sollten dabei:

- Die Häufigkeit des Problems (Einzelfall oder wiederholtes Auftreten), Relevanz und Risikobewertung der Spezies, sowie das Handling des Stamms (Biosafety-Level, Diagnostik, Kultivierbarkeit).
- Stämme mit bekannter Resistenz oder Toleranz ggn. bestimmte Konservierungsmittel.
- Potenzielle Krankheitserreger und produktschädigende Mikroorganismen, die aus Gebrauchstests isoliert werden.
- Stämme, die bei Reklamationen oder Rückrufaktionen auftreten. (4)

Grundsätzlich muss entschieden werden, ob der Stamm in die Stammsammlung aufgenommen wird. Auch Mehrfachführungen sind zu überdenken, ob z.B. ein *Pseudomonas aeruginosa* mehrfach aufgenommen wird, wenn er in verschiedenen Produkten, Werken oder Abfüll-Linien innerhalb desselben Werks auffällig wird.

Auch Details hinsichtlich der Anlage einer Kryokultur für die Stammsammlung sind zu berücksichtigen (Einfriertemperatur, Einfriermedium > Glycerin-basiert, Milch etc.). Große Aufmerksamkeit sollte auf die Lagerungsbedingungen von Praxisstämmen gelegt werden, besonders, wenn sie für mikrobiologische Prüfungen bestimmt sind. Die Art der Lagerung sollte die ursprünglichen Eigenschaften und die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen erhalten können.

Die meisten Richtlinien zum KBT empfehlen die Aufnahme spezifischer Mikroorganismen in das Testkeimspektrum und schließen auch alle weiteren Mikroorganismen ein, die bei bestimmten Produkten als potenzielle Kontaminanten auftreten können (5). Die Guidelines des PCPC weisen zum Beispiel eine ausführliche Liste von Testmikroorganismen auf. SCCS, USP und Ph. Eur. erwähnen ebenfalls die Verwendung von zusätzlichen Stämmen die eventuell ein Kontaminationsrisiko für das Produkt darstellen können (5).

Offizielle Stammsammlungen wie die DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) oder die ATCC (American Type Culture Collection) beinhalten von Forschern hinterlegte, „standardisierte“ Stämme, die eine höhere Reproduzierbarkeit aufweisen als Praxisstämmen/Umweltisolate. Dies wird sichergestellt, indem die verkauften Subkulturen nie mehr als zwei bis drei Passagen vom hinterlegten Originalstamm entfernt sind. Die sich daraus ergebende Reproduzierbarkeit ist meist höher als die Praxisstämmen/Umweltisolate.

Hernach gilt es zu entscheiden, ob der Stamm als Einzelstamm oder integriert in einen Pool im KBT verwendet werden soll und ob er für alle kosmetischen Produktgruppen relevant ist (6,7). Bei einem Pool handelt es sich um einen Mix verschiedener Mikroorganismen, für die aber kein genormtes Bewertungsverfahren existiert. Verschiedene galenische Formeltypen (o/w, w/o Emulsionen, Tenside, Gele) ermöglichen teilweise einem sehr unterschiedlichen Mikroorganismen-Spektrum das Überleben bzw. eine Vermehrung.

Daraus folgt der Schluss, dass es strategisch sinnvoll sein kann, zusätzliche Mikroorganismen nicht generell einzubeziehen, um den Testaufwand nicht unnötig nach oben zu treiben, sondern dass diese produkt- bzw. produktgruppenspezifisch verwendet werden sollten. Dadurch wird das Prüfkonzept auf die Einzelsituation ausgerichtet, statt einen Mikroorganismus über die ganze Produktpalette hinweg durchzutesten.

Praktische Fragen sind die Kultivierbarkeit unter Beibehaltung von evtl. interessanten Eigenschaften wie Adaption bzw. temporäre Unempfindlichkeit (Biozid-Resistenz oder Biozid-Toleranz) (8,9,10,11,12,13).

Infoblock

Resistenz ist die Fähigkeit eines Mikroorganismus in der Anwesenheit von Antibiotika zu überleben bzw. sich zu vermehren.

Maße für die Resistenz sind die **Minimale Hemmkonzentration (MHK)**, diejenige Konzentration, ab der eine Vermehrung der Bakterien verhindert wird, sowie die **Minimale bakterizide Konzentration (MBK)**, die eine Konzentration beschreibt die benötigt wird, um 99,9% der Bakterien in einer bestimmten Zeit abzutöten. Resistenzfaktoren sind genetisch determiniert, d.h. an eine Mutation geknüpft. Entfällt der Selektionsdruck durch ausbleibende Konfrontation mit dem Antibiotikum, kann sich die Mutation verlieren, da Resistenzplasmide oder andere mobile genetische Elemente abgestoßen werden.

Persistenz hingegen ist die Fähigkeit einer bestimmten Population, den Kontakt mit antimikrobiellen Substanzen zu überleben, so lange sich die MHK nicht erhöht. Das heißt hier werden nicht alle Bakterien innerhalb der Population mit derselben Rate durch die antimikrobielle Substanz abgetötet (biphasische Absterbekinetik).

Im Unterscheid zu resistenten Mikroorganismen können sich persistente in Anwesenheit von antimikrobiellen Substanzen nicht besser/schneller vermehren als nicht-persistente Anteile ihrer entsprechenden Gesamtpopulation.

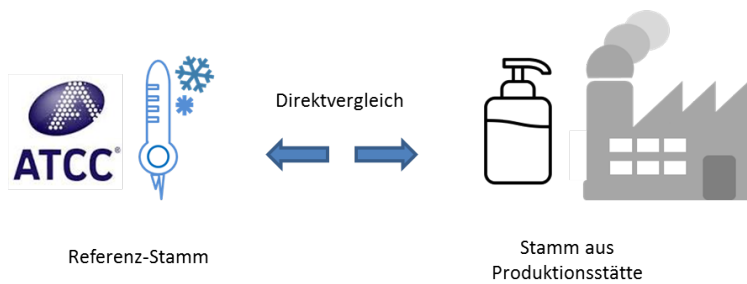
Toleranz wird oft synonym mit Persistenz verwendet, v.a. im molekularen Kontext, beschreibt jedoch nur die Eigenschaften eben jener Subpopulation. Tolerante Mikroorganismen überleben Phasen mit harschen Umweltbedingungen - wie z.B. geringes Nährstoffangebot, ungeeignete Temperaturen, pH-Werte oder Behandlung mit antimikrobiellen Substanzen - besser, zeigen aber diese Eigenschaft nur solange die Bedingungen vorherrschen.

Resistenzen haben einen sehr spezifischen Wirkmechanismus, werden gezielt als Gegenreaktion auf Antibiotika herausselektiert und basieren üblicherweise auf Mutationen. Konservierungsmittel wie sie in der Kosmetik eingesetzt werden gehören dagegen zu den Bioziden und haben einen eher unspezifischen Wirkmechanismus, der üblicherweise nicht durch eine z.B. einzelne Mutation der Zielstruktur umgangen werden kann. Hier sorgen phänotypische Veränderungen der Mikroorganismen für eine Adaptation. Mikroorganismen,

die in Anwesenheit von Konservierungsmitteln überleben, sind also eher im Bereich Persistenz (die gesamte Population) bzw. Toleranz (eine Sub-Population) zu verorten. Beispiele für Toleranzmechanismen sind die Ausbildung eines Biofilms oder ein verringerter Metabolismus (Dormanz, Slow Growers, Small Colony Variants, Viable But Non-Culturable Cells) (15,16,17,18,19).

Ein resistenter/toleranter Stamm kann im KBT realistischere Daten liefern als ein über die oben beschriebenen offiziellen Stammsammlungen bezogener Laborstamm.

Beispielsweise beobachtet man wesentlich geringere Abtötungsraten von *P. gergoviae*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* (Praxisstämme) gegenüber Phenoxyethanol, Benzylalkohol und Na-Benzoat als bei den korrespondierenden ATCC Stämmen Nr. 33028, 4352 und 9027. Für eine realitätsnähere Einschätzung der Konservierungswirkung sollte vom „Worst Case“ ausgegangen und Praxisstämmen Vorzug vor Laborstämmen gegeben werden (2).



Standard-KBT / Tensidische Basisrezeptur /
 Konservierungssystem: 0,8% Phenoxyethanol, 0,8% Natriumbenzoat

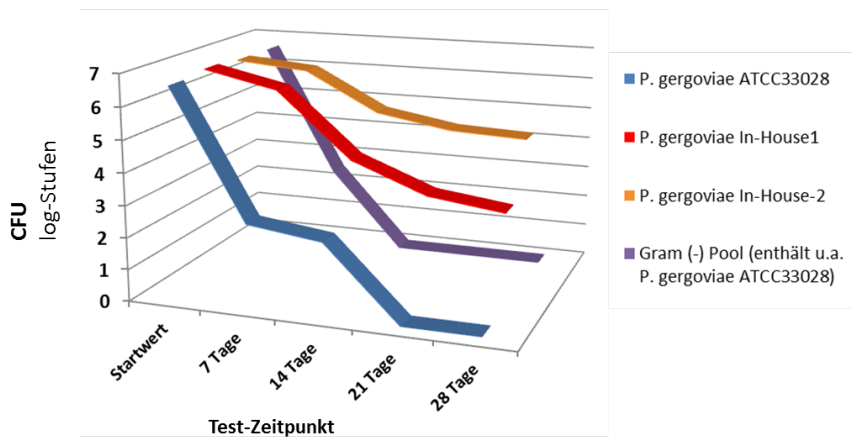


Abb. 2: KBT mit unterschiedlich widerstandsfähigen *Pluralibacter gergoviae* Stämmen bzw. einem Gram-Negativen Pool im Direktvergleich.

Gleichzeitig steigen oft der Aufwand bzw. die technischen Probleme beim Handling der entsprechenden Stämme. Die interessanten Eigenschaften der oben beschriebenen Mikroorganismen verlieren sich nicht selten beim Aufbewahren in Kryo-Kultur und/oder anschließender Anzucht auf Standard-Nährböden (TSA oder Sab); v.a. nach mehreren Passagen.

Wir vermuten dahinter den nicht länger aufrecht erhaltenen Selektionsdruck und einen erhöhten Fitness-Cost durch das genetische Element, welches die Widerstandsfähigkeit

vermittelt, nun aber nicht länger benötigt wird (15). Anders könnten auch alternative Mechanismen wie Stress-Toleranz, Persistier-Subpopulationen oder Biofilmbildung Ursache für die temporäre, nicht dauerhaft fixierte Widerstandsfähigkeit gegen die eingesetzten Konservierungsmittel sein.

Dies macht den Umstand einer Weiterkultivierung in der ursprünglichen Matrix / im Originalprodukt zu einer Option.

Diese Kultivierung kann - in Abhängigkeit von Stamm und Produkt (Galenik, Konservierungssystem, a_w -Wert) - über mehrere Jahre gelingen. Dies spiegelt sich in gleichbleibenden Gesamtkeimzahlen bei einer turnusmäßigen Überprüfung des Produkts wider (grüner Graph). Als Gegenbeispiel gibt es Stämme, deren Gesamtkeimzahl bereits nach wenigen Monaten zurückgeht und der Keim schließlich nicht mehr aus dem Produkt isoliert werden kann (roter und blauer Graph). (Beispiele für beide Fälle unten)

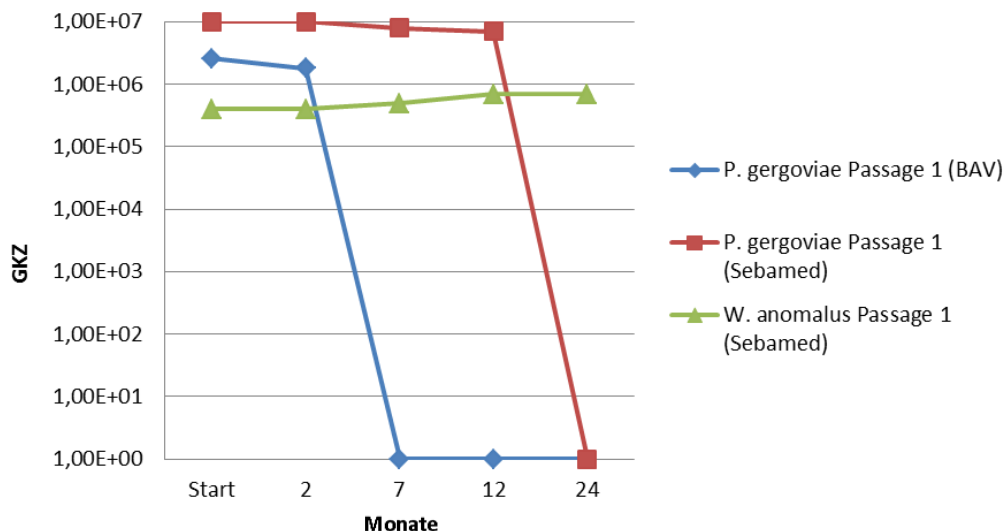


Abb. 3: Gesamtkeimzahl bei der Weiterkultivierung von *Pluralibacter gergoviae* und *Wickerhaemomyces anomalus* im Originalprodukt über lange Zeiträume hinweg.

Eine Alternative zur regelmäßigen Subkultivierung des Praxisstammes im Produkt - was nicht immer erfolgreich ist – stellt die Modifizierung von Labormedien dar, die einen Teil der Konservierungsstoffe des Produkts in subletaler Konzentration enthalten, um eine Kultur zu erzeugen, die die gewünschten Eigenschaften beibehält (20,21).

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Adaptation von Praxisstämmen nicht ausschließlich durch das Konservierungsmittel einer Rezeptur hervorgerufen wird, sondern auch durch Belastungen oder subletale Schäden, die während der Herstellung auf den Stamm wirken, auftreten können. Zum Beispiel können in der industriellen Umgebung häufig oxidativer, hyperosmotischer, thermischer und Säure-Stress auftreten.

Eine regelmäßige Re-Evaluierung der kontaminierten Produkte, in denen Praxisstämme aufbewahrt werden, erscheint also angebracht, wenn routinemäßig mit ihnen gearbeitet werden soll.

Ein Nachteil einer solchen Probe ist ihre Endlichkeit. Wird sie genutzt, wie unten beschrieben, ist sie irgendwann verbraucht. Eine Möglichkeit, dennoch solch einen Stamm zu halten, kann der Versuch sein, den Stamm in einer identischen Formel weiter zu kultivieren. Dabei ist es häufig möglich eine identische Formel, wie das kontaminierte Produkt, erneut zu kontaminieren. Dafür wird ein Teil der kontaminierten Probe in die neu hergestellte Formel gegeben und dann das Wachstum in dieser überwacht. So ist es möglich auch in Zukunft diesen Stamm zu erhalten. Leider ist dies aber nicht immer möglich, da manchmal die kontaminierten Produkte, gar nicht so einfach nachstellbar sind, z.B. wenn es durch einen nicht mehr nachvollziehbaren Schritt in der Produktion zu leichten Veränderungen der Formel kam, die dann letztendlich die mikrobiologische Stabilität der Formel beeinflusst haben. Weiterhin ist manchmal auch die Zugänglichkeit einiger Rohstoffqualitäten nicht mehr gegeben, die zum Zeitpunkt der eigentlichen Kontamination noch Standard waren.

(Da solche Produktveränderungen aber nach Kosmetikverordnung (KVO) bzw. Guter Herstellungspraxis (GMP) nicht vorgesehen sind, sei auf die Notwendigkeit einer Neuprüfung bzw. Neubewertung hingewiesen.)

Für einen KBT muss dann aber beim Animpfen eine kleine Menge Produkt A in zu testendes Produkt B eingearbeitet werden, was unweigerlich zu dessen Veränderung führt – mit allen ihren potenziellen Konsequenzen. Relativierend sei hier erwähnt, dass auch bereits das Einarbeiten der Pufferlösung, über die die Bakterien beim KBT üblicherweise in die zu testende Matrix eingearbeitet werden, oben beschriebene Veränderung mit sich bringen kann. Mögliche Komplikationen sind Änderungen in der Zusammensetzung, des Wassergehalts, sowie der Konzentration an Konservierungsmitteln. Bei eigenen Versuchen wurden beim Einarbeiten von 0,5% kontaminiertes Originalprodukt in 40ml KBT-Ansatz selten Probleme beobachtet, wenn gleichartige Rezepturen ineinander eingearbeitet wurden, aber auch Verklumpungen oder Trennungen bei galenisch verschiedenen Produkttypen. Beispielsweise gelang eine o/w in o/w, oder Tensid in Tensid Einarbeitung, während Tensid in eine Emulsion problematisch sein kann.

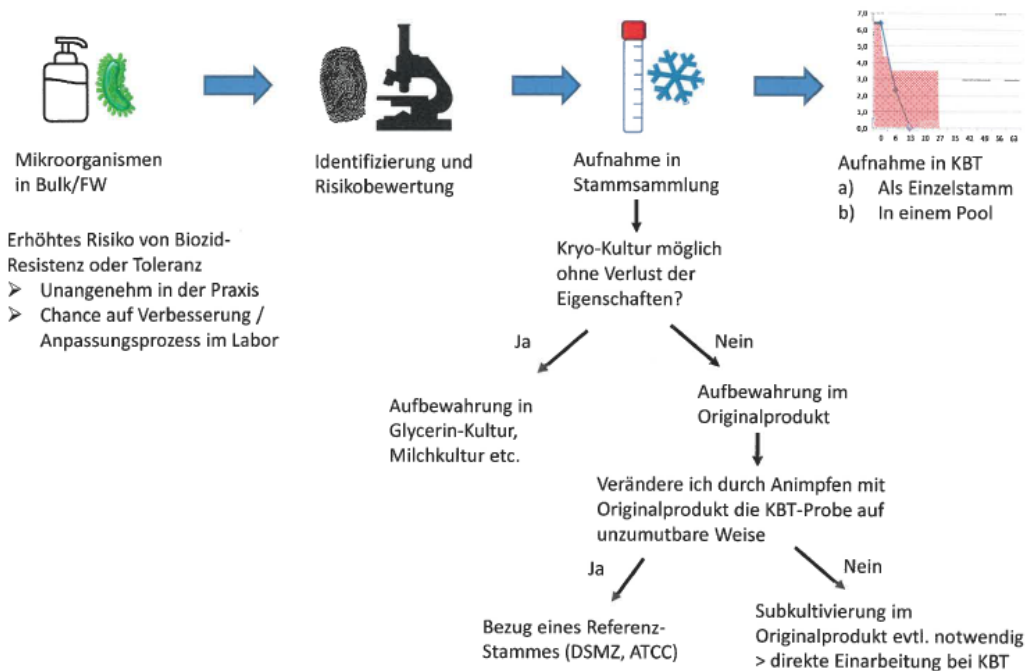


Abb. 4: Umgang mit Praxisstämmen und anschließende Fragestellungen bei Stammhaltung und Einsatz im KBT.

Beim Einsatz der Kulturen im KBT ist auch der physiologische Zustand der Zellen ein Aspekt. Die Wachstumsphase hat einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse eines KBTs. Reproduzierbare Daten können nur erhalten werden, wenn die Kultur immer in der gleichen Wachstumsphase verwendet wird. In der Regel wird für ATCC-Kulturen in den Guidelines die stationäre Phase (Bebrütung nach 18-24 Stunden) verwendet. Wenn die Kultur aus einem Produkt entnommen wird, sollte vorher geprüft werden, wann die Kultur in der stationären Phase ist, damit eine Reproduzierbarkeit erreicht wird.

Aussichten und Möglichkeiten

Die beschriebenen Maßnahmen sollen das Wissen über Mikroorganismen die im kosmetischen Produktionsumfeld gefunden werden erweitern und dazu einladen, sich mit der Thematik näher zu beschäftigen. Die Implementierung der beispielhaft aufgezeigten Sicherheits- und Vorbeugemaßnahmen durch Einbeziehung von Praxiskeimen eliminieren Risiken und schaffen einen höheren Verbraucherschutz, v.a. wenn sich die Vorgehenseise auf Seiten von Firmen, Suppliern und Lohnabfüllern durchsetzt. Darüber hinaus wird wertvolles Kollektivwissen aufgebaut, an dem es in diesem Bereich oft noch fehlt (3).

Dieser Artikel fokussiert auf die Verwendung der Stämme im Konservierungs-Belastungs-Test. Weitere Maßnahmen, die aus dem Auffinden von praxisrelevanten Stämmen in der Kosmetik resultieren (siehe Abb. 1), werden fachgruppenintern weiter diskutiert und ggf. entsprechend verschriftlicht.

- 1) Eigener U., 2021, „Mikrobiologische Qualität und Produktsicherheit kosmetischer Mittel – Anforderungen, Qualitätssystem, Untersuchungen“, Behr’s Verlag
- 2) Deutsche Gesellschaft für Wissenschaftliche und Angewandte Kosmetik e.V., 2015, „Konservierung kosmetischer Mittel – Prüfmethode, Teststrategie und Wirkungsabsicherung“, Verlag für chemische Industrie
- 3) Michalek M. et al., 2019, “Microbiological contamination of cosmetic products – observations from Europe, 2005-2018”.
- 4) Sutton S., et al., 2006, “Antimicrobial preservative efficacy and microbial content testing.”
- 5) Sutton, S., 2013 “The Antimicrobial Efficacy Test, GMP and Investigations”
- 6) Eigener U., 2018 Konservierungsbelastungstest für kosmetische Mittel – Erreichung einer angemessenen Wirkungsaussage, SOFW Journal 5-2018
- 7) Eigener U., 1993, Methoden zur Bewertung der Konservierung kosmetischer Mittel. In: Mikrobiologische Qualität kosmetischer Mittel (Hrsg. M. Heinzl), Behr’s Verlag
- 8) Cunningham-Oakes E. et al., 2019, “Understanding the challenges of non-food industrial product contamination”
- 9) Scientific Committees, DG Health and Consumers of the European Union, 2009, “Effects of Biocides on Antibiotic resistance”
- 10) Maillard J.Y., 2018, “Resistance of bacteria to biocides”
- 11) Poole, K., 2002, “Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance
- 12) Mauricio H. et al., 2020, “A Physiological Basis for Noninheritable Antibiotic Resistance”
- 13) Stellungnahme DGK_Fachgruppe für Mikrobiologie und Betriebshygiene, 1999, „Entwickeln Mikroorganismen eine Resistenz gegen antimikrobielle Biozide“
- 14) Morenta E.O. et al., 2013, “Biocide Tolerance in Bacteria”
- 15) Starikova I. et al., 2013, “Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*”
- 16) Lewis K., 2010, “Persister Cells”
- 17) Andersson D.I. et al, 2011, “Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations”
- 18) Stewart P.S., 2015, “Antimicrobial Tolerance in Biofilms”
- 19) Balaban N.Q. et al., 2019, “Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence”
- 20) Perry, B. F., 1995. “*Preservation Efficacy Testing in the Cosmetics and Toiletries Industries.*” In: Microbiological quality assurance. Guide Towards Relevance and Reproducibility of Inocula. (Eds. M. R. W. Brown and P. Gilbert), CRC Press, New York, pp. 163-187.
- 21) Brannan, D.K., 1995. *Preservation of personal care products.* In: Preservation of Surfactant Formulations. (Ed. F. F. Morpeth), Chapman & Hall, UK.

* Corresponding Author