

Fraunhofer Institute for Manufacturing
Engineering and Automation

Institute Directors
Prof. Dr.-Ing. Prof. e.h. Dr.-Ing. e.h.
Dr. h.c. mult. Engelbert Westkämper
Prof. Dr.-Ing. Alexander Verl

Nobelstraße 12
D-70569 Stuttgart

Phone + 49 (0) 711 / 9 70-00
Fax + 49 (0) 711 / 9 70-1399

Biokontaminationskontrolle

Autor: Dipl.-Biol. (technisch orientiert) Markus Keller
Abteilung Reinst-und Mikroproduktion

Inhalt:

1	Einleitung	4
2	Reinraumtechnik	5
2.1	Standortwahl	6
2.2	Hygienisch reine Räume verschiedener Disziplinen	6
2.2.1	Schutzkonzepte in Krankenhäusern	6
2.2.2	GMP-Reinräume	7
2.2.3	Reinräume in der Lebensmittelindustrie	9
2.3	Betrieb eines Reinraums	10
3	Hygienegerechtes Design	10
3.1	Hygienegerechtes Design von Reinräumen	11
3.2	Eignung von Reinräumen für die verschiedenen GMP-Reinheitsklassen	11
3.3	Barriersysteme/Isolatoren	12
3.3.1	Barriersysteme	12
3.3.2	Blow-Fill-Seal-Systeme	12
3.3.3	Isolatoren	12
3.3.4	Sicherheitswerkbank	13
4	Materialeigenschaften	13
4.1	Materialien	14
4.2	Korrosionsbeständigkeit	14
4.3	Verstoffwechselbarkeit und antimikrobielle Ausrüstung	14
4.4	Oberflächenrauheit und Benetzbarkeit	15
4.5	Chemische Beständigkeit	15
4.6	Mechanische Beständigkeit	15

4.7	Reinigbarkeit	16
4.8	Elektrostatische Eigenschaften	17
5	Reinigungs- und Desinfektionsverfahren	18
5.1	Reinigung	18
5.1.1	Reinigungsverfahren	19
5.2	Desinfektion	20
5.2.1	Desinfektionsmethoden	20
5.2.2	Validierung	21
6	Biomonitoring	21
6.1	Bestimmung von Mikroorganismen in der Raumluft	22
6.1.1	Sedimentationsverfahren	22
6.1.2	Filtrationsverfahren	23
6.1.3	Impaktionsverfahren	23
6.1.4	Impingerverfahren	24
6.2	Bestimmung von Mikroorganismen auf Oberflächen	25
6.2.1	Abklatschverfahren	25
6.2.2	Tupferverfahren/Swabs	26
6.3	Handschuhe	27
6.4	Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen	28
6.5	Keimidentifizierung	29
7	Schulung	29
8	Zusammenfassung	30
9	Literaturverzeichnis	31

1 Einleitung

Die Biokontaminationskontrolle spielt in vielen Bereichen eine wichtige Rolle. In der Pharmazie und Biotechnologie, Medizin und Medizintechnik, Nahrungs- und Genussmittel- und Kosmetikindustrie werden Hygieneverfahren oder Verfahren zur Biokontaminationskontrolle eingesetzt, um sichere und stabile Produkte zu erzeugen. Dazu gehört auch der Einsatz von entsprechender Reinraumtechnik. Auch im Krankenhauswesen ist die Reinraumtechnik allgegenwärtig, besonders bei den Operationssälen, der Krankenhausapotheke und Sterilisierbereichen.

Mikrobiologische Kontamination hat ihre Ursache meist in Verunreinigungen von produktberührenden Teilen der Produktionsumgebung und einer keimbelasteten Prozess- und Umgebungsluft. Keimherde in unzureichend gereinigten Stellen, in Ecken und Vertiefungen stellen mit eingeschleppten Keimen (Kleidung, Zuluft,...) die größte Gefahrenquelle dar. Diese gilt es zu kontrollieren und bestenfalls zu vermeiden. Eine geeignete Werkstoffauswahl, geeignetes hygienegerechtes Design der Anlagen und Produktionsumgebungen, sachgerecht durchgeführte Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen und ein entsprechendes Biomonitoring sind für die Kontrolle der Produktumgebung unabdingbar.

Der Mensch als potentiell starke Keimquelle bedarf einer besonders detaillierten Betrachtung. Entsprechende persönliche Schutzausrüstungen (PSA) schützen zum einen den Menschen vor Keimen und Krankheitserregern. Handschuhe zählen zu den wichtigsten PSA-Ausrüstung, da aufgrund des direkten Kontaktes der Haut mit eventuell kontaminierten Oberflächen ein starkes Infektionsrisiko darstellt. Des Weiteren dienen Schutzanzüge bis zum komplett geschlossenen Schutzanzug für Keime der Risikoklasse 4 dem erforderlichen Schutz des Arbeiters. Aber auch der Patient oder das Produkt wird durch PSA-Ausrüstung vor unerwünschter Kontamination geschützt. Der Chirurg im Operationssaal trägt einen Mundschutz, Handschuhe, eine Kopfbedeckung und einen sterilen Mantel zum Schutz des Patienten vor Keimen, welcher er sonst mit Leichtigkeit auf den Patienten übertragen kann. Aber auch er schützt sich vor Keimen, welche von Patienten stammen können.

In der eigentlichen Sterilproduktion der Pharmazeuten wird versucht, den Menschen komplett außen vor zu lassen. Somit wird das Kontaminationsrisiko geringer und auch, nennen wir es einmal salopp, kalkulierbarer. Sind in Bereichen der GMP-Klasse B Arbeiter von Nöten, sind diese ebenfalls mit kompletter Schutzmontur bestehend aus Mundschutz, Brille, Kopfbedeckung, Handschuhe, Mantel und Überschuhen bekleidet. Entsprechende Schleusenkonzepte erfordern oft eine mehrlagige Bekleidungs Vorschrift. Um beispielsweise in GMP D zu gelangen, legt man Kittel, Mundschutz, ggf. Bartschutz, Haarnetz und Überschuhe an. Schleust man sich dann von GMP D in GMP C ein, werden sterile

Handschuhe, ein weiterer Kittel, nochmals Überschuhe, eine Brille und ein weiterer Mundschutz angelegt. Somit ist die Trennung der Bereiche gewährleistet und eine Keimverschleppung zwischen den Bereichen minimiert (1).

Im Sinne dieser Quellenbetrachtung stellen Vermeidungsstrategien wirksame Maßnahmen dar, um die Konzentrationen mikrobiologischer Kontamination von Produkten unter den Grenzen zu halten, die schädigende Wirkung auf den Prozess und das Produkt ausüben. Der Reinraum für hygienekritische Produktionsprozesse unterscheidet sich wesentlich von anderen Reinraum-Anwendungen - allein vom darin verarbeiteten Produkt und der Gefahr dessen mikrobiologischer Kontamination. Dem Risiko einer mikrobiologischen Kontamination wird durch entsprechende Reinraumkonzepte, Reinigungs-, Desinfektions- und Sterilisationsschritte, Kontrollmechanismen und durch erhöhte hygienische Maßnahmen begegnet. Ferner kann der Erhalt einer gezielt dotierten Umgebung für die Produktion notwendig sein (2).

Mikrobiologische Kontaminationen der Oberflächen und der Luft, auch der Reinraumluft, sind alle vermehrungsfähigen Keime (Bakterien, Bakteriensporen, Pilze, Pilzsporen), die in der Lage sind, Produkte durch deren Besiedelung und die Vermehrung der Keime zu schädigen.

Nicht mit eingeschlossen in mikrobiologische Kontaminationen sind organische Zellfragmente und Stoffwechselprodukte biotischer Herkunft. Diese spielen als Pyrogene in der Pharmazie eine wichtige Rolle.

Prozessmedien dienen neben der Luft ebenfalls als Überträger von mikrobiologischen Kontaminationen in Reinräumen. Dies sind insbesondere Wasser, wässrige Lösungen, weitere Prozessflüssigkeiten und Prozessgase. Einflüsse der mikrobiologischen Kontamination dieser Prozessmedien haben Auswirkungen in allen genannten produzierenden Industrien. Auch für diese Medien gibt es entsprechende Beprobungsverfahren und Grenzwerte.

2 Reinraumtechnik

Zur Schaffung kontrollierter hygienischer Umgebungen bedarf es als Infrastruktur entsprechende Reinräume. Ein Reinraum dient vor allem zur Aufrechterhaltung einer kontrollierten Fertigungsumgebung mit erhöhten Reinheitsanforderungen gegenüber normalen unkontrollierten Umgebungsbedingungen. Dies beinhaltet zu allererst eine extreme Reduzierung der Partikelkonzentration in der Luft. In normaler urbaner Umgebungsluft herrscht eine Partikelkonzentration pro Kubikmeter Luftvolumen von 0,5 bis 35 Milliarden Partikel mit einem Durchmesser $>0,5 \mu\text{m}$. Durch aufwändige Filtrationstechniken kann diese Konzentration in Reinräumen auf unter 1 Partikel/ m^3 $> 0,5 \mu\text{m}$ Durchmesser gesenkt werden, was in etwa einer Reinraumklasse ISO 1 nach DIN EN ISO 14644-

1 (3) entspricht. Diese extreme Reinheit hinsichtlich Partikeln ist vor allem in der Halbleiterindustrie von Bedeutung.

In der Life-Science-Industrie, die zum Teil nach den Vorgaben des EU GMP Annex 1 (1) arbeiten muss, spielt die Partikelkonzentration in der Reinraumluft ebenfalls eine entscheidende Rolle. Ein Großteil der luftgetragenen Biokontamination in Form von Mikroorganismen (Sporen, Bakterien,...) ist an Partikel zwischen 10 und 20 μm gebunden (4). Prinzipiell geht somit eine Reduktion von luftgetragenen Partikeln mit einer entsprechenden Reduktion von luftgetragenen Mikroorganismen einher. Zum Vergleich: bei einer Flüssigfiltration mit einem Ausschlusskriterium von Partikeln $>0,2 \mu\text{m}$ spricht man von einer Sterilfiltration. In steriler GMP-A Fertigungsumgebung wird eine Reinheitsklasse entsprechend ISO 5 gefordert, was einer Konzentration von 3520 Partikeln/ m^3 Luft $> 0,5 \mu\text{m}$ Durchmesser entspricht.

2.1 Standortwahl

Bei der Auswahl von Standorten sind solche mit möglichst niedriger mikrobiologischer Belastung der Luft zu bevorzugen. Die Ausrichtung der Ansaugrichtung von Außenluftanlagen sollte so erfolgen, dass mögliche äußere Quellen mikrobiologischer Belastung (Kompostieranlagen, Abluft von Klimaanlage,...) unter Berücksichtigung der Hauptwindrichtung keine oder lediglich geringen Einflüsse haben. Die Verwendung geeigneter Filter und Filtrationsanlagen zur Filtration der Zuluft und Schaffung einer kontrollierten Reinraumumgebung ist zu berücksichtigen. Die anerkannten Regeln der Lüftungstechnik gilt es konsequent umzusetzen. Besonders sei hier die erfolgreichste VDI-Richtlinie VDI 6022 Blatt 1 erwähnt, welche 2011 in einer neuen Fassung erschienen ist. (5).

2.2 Hygienisch reine Räume verschiedener Disziplinen

2.2.1 Schutzkonzepte in Krankenhäusern

Im Krankenhauswesen müssen seit kurzem die Apotheken auch unter GMP arbeiten. Das bedeutet auch den Einsatz entsprechender (Reinraum)-technik. Active Pharmaceutical Ingredients müssen mit Hilfe einer entsprechenden Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. In der sogenannten Krankenhausrichtlinie VDI 2167 Blatt 1 werden verschiedene räumliche Bereiche ebenfalls eindeutig klassifiziert (6). Der eigentliche Schutzbereich eines Operationssaals (OP) muss durch eine turbulenzarme Verdrängungsströmung (TAV) von der Decker her versorgt werden. In einem OP-Saal der Klasse 1a wird dies durch eine TAV-Decke von mindestens 9 m^2 realisiert. Dieser Bereich muss auf dem Boden kenntlich gemacht werden, damit das OP-Team jederzeit weiß, ob es sich noch komplett in dieser Schutzzone befindet. In OP-Räumen der Klasse 1b wird von einem geringeren Kontaminationsrisiko ausgegangen. In diesen OPs genügen kleinere TAV-Belegungen oder andere Schutzkonzepte. Weiterhin können klei-

ne invasive Eingriffe ohne maschinelle Belüftung erfolgen. Aber auch hier muss die weitgehende Sterilität des Eingriffes gewährleistet sein.

2.2.2 GMP-Reinräume

2.2.2.1 Allgemeines

Für die Herstellung steriler Arzneimittel und anderer hygienekritischer Produkte dient als gesetzliche Richtlinie der Leitfaden für die gute Herstellungspraxis der Europäischen Kommission (EU-GMP-Leitfaden, siehe auch Kapitel 19). Im Anhang 1 des EU-GMP-Leitfadens wird speziell auf die Anforderungen einer hygienischen Produktionsumgebung eingegangen. Reine Bereiche für die Herstellung steriler Produkte werden gemäß den geforderten Umgebungsmerkmalen eingestuft. Jeder Herstellungsvorgang erfordert einen angemessenen Reinheitsgrad der Umgebung im Betriebszustand, um das Risiko einer Kontamination des betreffenden Produktes oder Materials mit Partikeln oder Mikroorganismen möglichst gering zu halten. Um den Bedingungen im Betriebszustand zu entsprechen, müssen diese Bereiche so ausgelegt sein, dass bestimmte Luftreinheitsgrade im Ruhezustand erreicht werden. Der Ruhezustand ist der Zustand, in dem die gesamte technische Einrichtung installiert und ohne anwesendes Personal betriebsbereit ist. Der Betriebszustand ist der Zustand, in dem die Anlage in der vorgesehenen Art mit der festgelegten Personenzahl betrieben wird. Eine Reinraumumgebung sollte entsprechend den notwendigen zu kontrollierenden Parametern wie Konzentration luftgetragener Partikel und Mikroorganismen, Filterdichtheit, Luftwechselrate, Stömungsführung und Luftdruckverhältnisse zu den einzelnen Umgebungen regelmäßig abgenommen werden.

2.2.2.2 GMP-Reinheitsklassen

Für die Herstellung steriler Arzneimittel gelten in Bezug auf die erforderlichen Bereiche vier Reinheitsklassen:

Reinheitsklasse A/B: Sterilräume

Bei der Reinheitsklasse A handelt es sich um die lokale Zone für Arbeitsvorgänge mit hohem Risiko, zum Beispiel Abfüllbereich, Stopfenbehälter, offene Ampullen und Fläschchen und Herstellung aseptischer Verbindungen, wenn der Arbeitsvorgang ein ungewöhnliches Risiko darstellt. Solche Bedingungen werden durch ein laminares Luftströmungssystem von 0,45 m/s + 20% sichergestellt. Die Reinheitsklasse B dient bei der aseptischen Zubereitung und Abfüllung als Vorbereich für eine Zone der Reinheitsklasse A. Beim Einsatz von Isolatortechnik (RABS-Systemen) für eine A-Umgebung ist eine vorgelagerte B-Umgebung nicht notwendig.

Reinheitsklassen C und D: Reine Bereiche

Labore und Produktionsräume für weniger kritische Schritte bei der Herstellung steriler Produkte. In der Reinheitsklasse C geschieht zum Beispiel die Zubereitung von Lösungen, wenn der Arbeitsgang ein ungewöhnliches Risiko darstellt. Die Zubereitung von Lösungen und Be-

standteilen für die anschließende Abfüllung kann in einer Umgebung mit Reinheitsklasse D erfolgen.

Die lufttechnische Trennung von Reinraumbereichen mit hohen hygienischen Anforderungen von Bereichen mit niedriger hygienischer Relevanz (Minimierung des Risikos von Kreuzkontamination) ist seitens der EU-GMP gefordert.

Neben der kontrollierten Umgebungstemperatur und Luftfeuchte ist vor allem die Partikelkonzentration in der Reinraumumgebung von entscheidender Bedeutung. Folgende Tabelle enthält die Klassifizierung der Reinheitsgrade nach den in der Luft enthaltenen Partikeln:

Reinheits- klasse	Maximal erlaubte Zahl von Partikeln pro m ³ im Ruhezustand		Maximal erlaubte Zahl von Partikeln pro m ³ im Betriebszustand	
	> 0,5 µm	> 5 µm	> 0,5 µm	> 5 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	nicht festgelegt	nicht festgelegt

Abbildung 1

Klassifizierung der Luftqualität für die Herstellung steriler Produkte: Partikel (EU-GMP Annex 1)

Die in der Tabelle unter der Rubrik "Ruhezustand" genannten Partikelbedingungen sollten in unbemanntem Zustand nach einer kurzen "clean up"-Phase von 15-20 Minuten (Richtwert) nach Beendigung der Arbeitsvorgänge erreicht werden. Die in der Tabelle genannten Partikelbedingungen für die Reinheitsklasse A im Betriebszustand sollten in der das Produkt unmittelbar umgebenden Zone aufrechterhalten werden, wenn das Produkt oder das offene Behältnis der Umgebung ausgesetzt ist.

Aus der Überwachung der Partikelkonzentrationen in den entsprechenden Größenklassen kann keine Information über die mikrobiologische Zusammensetzung der Umgebungsluft gewonnen werden. Somit ist hierfür eine gesonderte mikrobiologische Überwachung notwendig. Diese muss nicht alle vorhandenen Biokontaminationen identifizieren und quantifizieren, jedoch muss das eingesetzte Biomonitoring-System eine ausreichende Information bieten, um sicherzustellen, dass die kontrollierte Umgebungsbedingung entsprechend den Vorgaben eingehalten werden kann [3]. Zur Erfassung aussagekräftiger Daten sollte die mikrobiologische Überwachung während des normalen Produktionsbetriebs erfolgen (in operation). Es sollte folgende Messungen mit einschließen: Raumluft, Prozessluft, sofern sie in der hygienischen Fertigung eingesetzt wird und ein Kontakt mit dem Produkt nicht ausgeschlossen werden kann, Oberflä-

chen der Geräte, Böden, Wände und persönliche Schutzausrüstung (Anzüge, Handschuhe,...). Sobald Änderungen im gewohnten Produktionsablauf eingeführt werden (Personen- und Materialfluss, Klimatechnik, Anlagen- und Maschinen), bedarf es einer erneuten engen Kontrolle aller relevanten Parameter.

Folgende Tabelle enthält die Klassifizierung der Reinheitsgrade nach der Anzahl der detektierten Mikroorganismen gemäß EU-GMP Annex 1:

Reinheitsklasse	Grenzwerte für die mikrobiologische Kontamination			
	Luftprobe [KBE/m ³]	Sedimentationsplatten (Ø 90 mm) [KBE/4 Stunden]	Kontaktplatten (Ø 55 mm) [KBE/Platte]	Fingerabdruck (5 Finger) [KBE/Handschuh]
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	Empfohlen: 25 ^{a)}
D	200	100	50	--

Abbildung 2

Klassifizierung der Luftqualität für die Herstellung steriler Produkte: Biokontamination (EU-GMP Annex 1)
 a) dies ist eine mögliche Empfehlung, ist aber nicht im EU-GMP Leitfadens Annex 1 definiert (Pflugmacher et al, 2004)

Innerhalb eines bestehenden Monitoring-Programms können Trends schon frühzeitig erkannt werden, selbst wenn die Grenzwerte nicht überschritten werden. Durch ein Aufstellen von entsprechenden Warnwerten (alert level) unterhalb der Grenzwerte (action level) kann ein mögliches Kontaminationsrisiko schon vorab erkannt werden, bevor ein entsprechender Grenzwert überschritten wurde. Beim Vorhandensein mehrerer örtlich differenzierbarer Kontrollpunkte kann ein Geschehen entsprechend lokalisiert werden. Mögliche Handlungen beinhalten ein Verbessern der Desinfektionsmaßnahmen, Bestimmung und Beseitigung des Kontaminationsherdes, Verbesserung des Ausbildungsstands des Personals und Anpassung des Produktionssystems.

2.2.3 Reinräume in der Lebensmittelindustrie

Selbst in der Lebensmittelindustrie gewinnt die Reinraumtechnik stark an Bedeutung. Die Verbraucher fordern immer mehr einen Verzicht von Konservierungsstoffen. Um dennoch die Lagerfähigkeit und Haltbarkeit eines Produkts zu gewährleisten, müssen die Produkte teils unter Sterilbedingungen hergestellt und verpackt werden. Die Lebensmittelindustrie bedient sich meist an den bestehenden Vorgaben der Pharmazeuten und der GMP-Regularien (1) (7).

2.3 Betrieb eines Reinraums

Zum bestimmungsgemäßen Betrieb eines Reinraums gehören unter anderem folgende Punkte: Den Bedienungs- und Wartungsvorschriften für Prozesse unter Reinraumbedingungen, welche zu einer periodischen oder ungewollten Freisetzung von Mikroorganismen beitragen können, muss Rechnung getragen werden. Die in den Reinraum eingebrachten Packmittel und –hilfsmittel dürfen kein Kontaminationsrisiko beinhalten und müssen ebenfalls überwacht und kontrolliert werden. Die mit dem Betrieb der Anlage verbundenen Risiken sind durch entsprechende Risikoanalysen zu ermitteln (z.B. HACCP oder FMEA). Gegebenenfalls müssen Maßnahmen ergriffen werden, um diese Risiken auf ein akzeptables Minimum zu reduzieren. Die Wirksamkeit der Maßnahmen ist in regelmäßigen, geplanten und zulässigen Intervallen zu überprüfen. Folgendes Prüfschema ist ein Vorschlag für eine Mindestanforderung der durchzuführenden Tests und deren Häufigkeit (8):

Parameter	Testplan für die einzelnen Zonen der jeweiligen Reinheitsklassen		
	Kritische Zone A	Prozesszone B/C	Umgebungszone C/D
Biokontamination			
Luft	Jede Schicht	Jede Schicht...wöchentlich	monatlich
Oberflächen	Jede Schicht	Jede Schicht...wöchentlich	monatlich
Personal	Jede Schicht	Jede Schicht ...abhängig vom Prozess	
Physikalische Parameter			
Partikel	Kontinuierliche automatische Aufzeichnung, Alarm	Kontinuierliche automatische Aufzeichnung, manuelle Aufzeichnung, Alarm	
Differenzdruck	Kontinuierliche automatische Aufzeichnung, Alarm	Kontinuierliche automatische Aufzeichnung, manuelle Aufzeichnung, Alarm	
Temperatur	-	Kontinuierliche automatische Aufzeichnung, manuelle Aufzeichnung, Alarm	
Relative Luftfeuchtigkeit	-	Kontinuierliche automatische Aufzeichnung, manuelle Aufzeichnung, Alarm	

Anmerkung: GMP Reinheitsklassen nach EU-GMP Annex 1

3 Hygienegerechtes Design

Reinräume, in welchen hygienekritische Prozesse ablaufen, müssen neben ihrer spezifischen Funktion die Funktion einer hygienisch einwandfreien Reinigung ermöglichen. Der Aspekt des „hygienegerechten Designs“ betrachtet die notwendigen Gesichtspunkte, damit der Reinraum aufgrund seines geometrischen Designs und der Materialauswahl keine Gefahr für das Produkt und somit für den späteren Nutzer des Produkts darstellt. Ein hygieneoptimiertes Design sollte so früh wie möglich in die Planung und Auslegung eines Reinraums einfließen.

Dies gewährleistet einen gefahrlosen Betrieb, lange Standzeiten und geringere Reinigungskosten.

3.1 Hygienegerechtes Design von Reinräumen

Beim hygienegerechten Design von Reinräumen müssen zuerst die behördlichen Vorgaben erfüllt sein. Je nachdem, ob und welche biologische Schutzstufe eingehalten werden muss (S1 bis S4), sind die Vorgaben eindeutig in der Biostoffverordnung (9) und der Richtlinie 2000/54/EG (10) verankert. Sofern gentechnisch veränderte Organismen verwendet werden, muss zusätzlich das Gentechnikgesetz beachtet werden (11).

Zur besseren Reinigbarkeit eines Raums sollten die Raumecken abgerundet sein. Die Oberflächen müssen gegen die verwendeten Chemikalien beständig, glatt und gut reinigbar sein. Fugen und Kanten sind zu vermeiden. Die Materialien sollen möglichst keine Nahrungsquelle für Mikroorganismen sein. Bodenflächen müssen geschlossenporig und bestenfalls ohne Fugen ausgeführt werden. Jedoch gilt es eine gegebenenfalls erforderliche Rutschhemmungsklasse, meist R9, einzuhalten (12), (13).

Die Lüftungstechnik muss gemäß den Anforderungen ausgelegt werden. Rauchgeneratoren ermöglichen die Visualisierung möglicher unerwünschter Totwassergebiete, Aufstauzonen und Wirbel in der gesamten Produktionsumgebung. Eine Feinabstimmung kann ein unerwünschte Strömungsführung verringern oder beseitigen.

3.2 Eignung von Reinräumen für die verschiedenen GMP-Reinheitsklassen

Laut dem GMP-Leitfaden darf die für die Produktion verwendete Ausrüstung für die Produkte kein Risiko darstellen. Kein mit dem Produkt in Berührung kommendes Ausrüstungsteil darf mit diesem so in Wechselwirkung treten, dass die Produktqualität beeinträchtigt wird und damit ein Risiko entsteht. In reinen Bereichen sollen alle exponierten Oberflächen glatt und ohne Risse sein, um eine Abgabe oder Ansammlung von Partikeln oder Mikroorganismen möglichst gering zu halten und die wiederholte Anwendung von Reinigungs- und gegebenenfalls Desinfektionsmitteln zu ermöglichen. Gemäß dem GMP-Leitfaden muss die Herstellungsausrüstung gut und gründlich reinigbar sein und darf selbst keine Quelle für Verunreinigungen sein.

Bei der Bewertung der Partikelemission nach VDI 2083 Blatt 9.1 (14) und der mikrobiologischen Reinheit der Oberflächen einer Reinraumausstattung kann direkt eine Aussage über die Eignung für eine bestimmte GMP-Reinheitsklasse getroffen werden.

Dieses gilt jedoch nur für den bewerteten Reinraum im Ruhezustand und bedarf nach Anfahren der Prozesskette einer Gesamtbetrachtung der Fertigungsumgebung. Bei einer möglichen Partikelabgabe während des Betriebs der untersuchten Reinraumumgebung muss diese gesondert erfasst und bewertet

werden, da hierbei die entsprechenden GMP-Reinraumklassen konkrete Grenzwerte vorgeben.

3.3 Barriersysteme/Isolatoren

Moderne Produktionsmethoden in der pharmazeutischen Industrie reduzieren durch entsprechende Automatisierung, Barriersysteme und Isolatoren weitestgehend das Kontaminationsrisiko durch das Personal. In Produktionsumgebungen, in denen das Personal komplett von der Produktion ausgeschlossen wurde, können die notwendigen Anforderungen an die angrenzenden Reinraumumgebungen entsprechend reduziert werden. Beispielsweise muss die Reinheitszone A in einem Isolator nicht von einer Reinheitszone B, in welcher der Isolator steht, umschlossen werden. Nachfolgend sollen einige Systeme kurz umrissen werden.

3.3.1 Barriersysteme

Generell verhindert ein Barriersystem den Kontakt des Personals mit dem Produkt in einer aseptischen Fertigungsumgebung. Die Systeme können von einem einfachen Streifenvorhang um die kritische Zone bis zu festen Zonierungen in der modernen pharmazeutischen Produktion reichen. Barriersysteme können auch Handschuheingriffe besitzen.

3.3.2 Blow-Fill-Seal-Systeme

In den sogenannten „Blow-Fill-Seal-Systemen“ werden in einer hermetisch von der Umgebung abgeriegelten Anlage die entsprechend notwendigen Verpackungen tiefgezogen, sofort mit dem Produkt befüllt und versiegelt. Aufgrund dessen, dass der Vorgang komplett in einer sterilen Umgebung in einem Durchgang stattfindet, sind geringe Biokontaminationsraten zu erreichen.

3.3.3 Isolatoren

Isolatoren erfüllen zweierlei Zwecke: Schutz des Personals vor toxischen Substanzen und Schutz des Produkts vor unerwünschter Kontamination durch die Umgebung. Isolatoren sind eine komplette Abgrenzung zwischen der aseptischen inneren Umgebung und dem Außenraum. Die Vermeidung einer Kontamination durch die Umgebungsluft kann durch eine hermetische Abdichtung und/oder einem ständigen Überdruck des Systems erfolgen. Bei der Anwendung von Isolatoren werden vorab sterilisierte Komponenten in den Isolator mittels Durchreiche-Autoklaven, Sterilisier-Tunnel oder Andocksysteme eingeschleust. Diese Komponenten bleiben während der Verweilzeit im Isolator vor mikrobieller Kontamination geschützt. Werden Handhabungsschritte durch das Personal notwendig, geschehen diese durch Handschuheingriffe oder Vollschutzanzügen. Die komplette Zuluft in einem Isolator wird endständig durch entsprechende HEPA oder ULPA Filter sterilfiltriert. Das Innere eines Isolators wird meist durch Wasserstoffperoxid oder Peressigsäure-Begasung sterilisiert. Eine Keimreduktion von 6 log-Stufen muss dabei mit entsprechenden Indikato-

ren nachgewiesen werden (4). Automatisierte Probennahmesysteme für das Monitoring der vorhandenen Partikel- und Keimbelastung vermeiden auch hier den sonst notwendigen Eingriff durch das Personal.

3.3.4 Sicherheitswerkbank

Für mikrobiologische Arbeiten oder Arbeiten mit Zellkulturen, sei es gentechnisch verändert oder nicht, werden Sicherheitswerkbänke eingesetzt. Sie dienen vornehmlich dem Personalschutz und bestehen aus einem Arbeitstisch in einem Gehäuse, das so belüftet wird, dass das Ausdringen von Mikroorganismen und Aerosolen mit dem Luftstrom bei korrektem Betrieb vermieden oder wenigstens erschwert wird (Sicherheitsstufe Klasse I). Die Innenraumluft einer Sicherheitswerkbank wird durch einen Hochleistungsschwebstofffilter abgesaugt. Neben dem Schutz des Personals dienen Sicherheitswerkbänke der Klasse II auch dem Schutz des Arbeitsgegenstands vor Kontamination. Bei dieser Schutzklasse wird eine laminare Luftströmung entlang der teilweise geöffneten Frontscheibe nach unten geblasen. Sicherheitswerkbänke werden auch als Sterilbank, Sterilkammer, oder nach der englischen Bezeichnung Laminar flow cabinet bezeichnet. Sicherheitswerkbänke der höchsten Sicherheitsstufe Klasse III sind vollständige geschlossene Systeme mit einem Unterdruck im Inneren, Handschuheingriffen und Schleusen. Ein Ausdringen von Mikroorganismen wird dadurch effektiv verhindert. Eine Abgrenzung zum Isolator besteht vor allem in der Anordnung der Druckkaskaden: Ein geringerer Druck in der hermetisch geschlossenen Sicherheitswerkbank verhindert ein Austreten von gefährlichen Keimen aus dem Produktionsprozess in die Umgebung, wohingegen ein erhöhter Druck in einem Isolator ein Eindringen von Kontaminationen aus der Umgebung in die sensitive Produktionsumgebung verhindert (15).

4 Materialeigenschaften

In GMP-konformen Produktionsumgebungen stellt die Vermeidung biogener Kontaminationen des Endprodukts eine zentrale Anforderung dar. Die Auswahl geeigneter Materialien hat entscheidenden Einfluss auf die Einsatzfähigkeit von Betriebsmitteln für die reine Produktion. Die ausgewählten Materialien und im Besonderen die angewandten Oberflächenbeschichtungsverfahren beeinflussen die Reinigbarkeit und Desinfizierbarkeit, die chemische und biologische Beständigkeit der Materialoberflächen und das elektrostatische Verhalten (z. B. Bildung von Kontaminationsagglomeraten, induziert durch Oberflächenladungen) (16). Die Reinigbarkeit und Desinfizierbarkeit von Materialien hängt unter anderem von deren Oberflächenstruktur und Benetzbarkeit ab. Wird aufgrund zu hoher Rautiefen ein effektives Reinigen und Desinfizieren verhindert, können mikrobiologische Risiken nicht auf ein akzeptables Maß reduziert werden. All diese Eigenschaften haben bei der Auswahl von Materialien für hygienekritische Bereiche eine grundlegende Bedeutung. Eine detaillierte Betrachtung der Reinraumtauglichkeit von Materialien wird in Kapitel 13 vorgenommen.

4.1 Materialien

Einige Materialien, die in hygienekritischen Bereichen eingesetzt werden können, wurden in eine Positivliste aufgenommen (17). Wegen der hohen betrieblichen Beanspruchung werden als metallische Werkstoffe oft hoch legierte, nichtrostende Edelstähle in Betracht gezogen, meist mit der Werkstoffnummer 1.4404. Diese Stähle haben eine erhöhte Korrosionsbeständigkeit gegenüber chloridhaltigen Reinigern. Der Korrosionslochfraß ist bei diesen Materialien vermindert. Edelstähle noch höherer Güte können ebenfalls verwendet werden. In hygienekritischen Bereichen werden als Elastomere vor allem Materialien aus Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk EPDM eingesetzt. Nitrilkautschuk NBR als Alternative zeigt eine geringere Chemikalienbeständigkeit als EPDM. Aktuell findet eine interessante Diskussion hinsichtlich Reinstwasseranlagen statt. In der Pharmazie sind bis dato Reinstwasseranlagen aus Edelstahl Stand der Dinge. Allerdings besteht immer noch das bekannte Problem des „Rougings“. Rouging und der damit einhergehende Abtrag kleinster Verunreinigungen als eine Art der Edelstahlkorrosion stellt bei der Herstellung empfindlicher APIs mittlerweile ein nicht zu vernachlässigendes Problem dar. Wohingegen werden in der Halbleiterindustrie schon seit jeher Reinstwasseranlagen aus hochwertigen Kunststoffen eingesetzt. Metallische Verunreinigungen bei der Herstellung integrierter Schaltkreise sind komplett zu vermeiden. Warum sollte eine Reinstwasseranlage mit entsprechender UV-Keimabtötungstechniken und endständiger Filtrationstechniken nicht auch in der Pharmazie hervorragende Dienste leisten? Hier sind in naher Zukunft interessante Neuerungen zu erwarten.

4.2 Korrosionsbeständigkeit

Korrosion verändert Oberflächen in der Weise, dass Produktreste verstärkt haften, Hygienemaßnahmen nicht den angestrebten Erfolg bringen und Reste gebrauchter chemischer Lösungen nur unvollständig ausgespült werden können. Wegen solcher Risiken sind Korrosionsschäden unbedingt zu vermeiden. Die Beständigkeit der Materialien gegenüber voraussehbaren Beanspruchungen sollte deshalb möglichst genau bekannt sein.

4.3 Verstoffwechselbarkeit und antimikrobielle Ausrüstung

Die verwendeten Werkstoffe sollten keine Nahrungsquelle für Mikroorganismen sein. Auf den Materialien dürfen sich keine Pilze oder Bakterien etablieren. Eine Biofilmbildung gilt es zu vermeiden. Falls Materialien antimikrobiell ausgestattet sind, sollte die Wirksamkeit dieser Ausrüstung nachgewiesen sein. Die Verwendung gesundheitlich bedenklicher Stoffe soll vermieden bzw. auf ein absolutes Minimum beschränkt werden. Prüfungen und daraus folgende Klassifizierungen werden nach eingesetzten relevanten Prüfnormen vorgenommen (siehe beispielsweise DIN EN ISO 846 (18); DIN EN 15457 (19) ; JIS Z 2801 (20); ISO 22196 (21)).

4.4 Oberflächenrauheit und Benetzbarkeit

Für die Oberflächenrauheit einer Reinraumumgebung gibt es keinen festgelegten Wert. Es muss jedoch eine ausreichende Reinigbarkeit gewährleistet sein. (siehe EHEDG Doc 8 (22), ISPE ISPE Baseline Volume 1: Active Pharmaceutical Ingredients (23), DIN EN 1672-2 (24); ISO 14159 (25) u.a.). Bei der Anwendung von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln sollte die dafür notwendige Benetzbarkeit der Oberflächen berücksichtigt werden.

4.5 Chemische Beständigkeit

Der Einsatz bestimmter Reinigungs- und Desinfektionsmittel kann Materialoberflächen angreifen bzw. zerstören, so dass unter anderem erhöhte Oberflächenrauheiten und eine Veränderung der chemischen Zusammensetzung sowie Materialeigenschaften die Folge sind. Daraus resultiert an chemisch nicht beständigen Oberflächen eine schlechte bzw. nicht ausreichende Reinigbarkeit und Desinfizierbarkeit. Die ausgewählten Materialien müssen daher gegen die eingesetzten Chemikalien beständig sein. Die chemische Beständigkeit kann nach den entsprechenden Normen und nach gängigen wissenschaftlichen validen Methoden nachgewiesen werden (siehe u.a. ISO 2812-1 (26) und -4 (27) und ISO 4628-1 bis -5 (28)). Soll der Raum zur Keimreduktion beispielsweise mit Wasserstoffperoxid vernebelt werden, müssen die verwendeten Materialien durchweg gegen Wasserstoffperoxid-Dampf beständig sein. Beispielsweise schreibt die Biostoffverordnung im Anhang 2 verbindlich wasserundurchlässige und leicht zu reinigende Oberflächen vor, sodass Holz hier nicht eingesetzt werden können. Weiterhin empfiehlt die Biostoffverordnung ab Stufe 2 eine ausreichende Beständigkeit gegen Säuren, Laugen, Desinfektionsmittel und Lösungsmittel. Ab Stufe 3 ist diese Vorgabe verbindlich (9). Labor- und Reinraumausstatter müssen in Ihrer Materialauswahl diesen Gesichtspunkt genau betrachten.

4.6 Mechanische Beständigkeit

Bei der Auswahl von wischenden, scheuernden und anderer möglicherweise abrasiver Reinigungs- und Desinfektionsverfahren bzw. -geräten ist zu beachten, dass die Materialien eine anforderungsgerechte mechanische Beständigkeit aufweisen. Die mechanische Beständigkeit kann nach einschlägigen Normen geprüft werden. Siehe dazu beispielsweise DIN 53233 (29), DIN EN ISO 20566 (30), DIN EN ISO 11998 (31), ASTM D 968 (32) und ASTM D 1044 (33).

4.7 Reinigbarkeit

Die Abreinigbarkeit von Partikeln von verschiedenen Oberflächen spielt in allen genannten Industriezweigen eine wichtige Rolle. Maschineneinhausungen, Fußböden, Wände, Transportbehälter, Beschichtungen,...die Liste der relevanten abzureinigenden Oberflächen ließe sich beliebig fortsetzen. Die Anforderungen an eine reine Produktionsumgebung in den genannten Industriebereichen steigen stetig. Hierfür ist zum Einen die kontinuierliche Tendenz zur Minimierung der Produkte und der hohe Anspruch an die Präzision und Reinheit von elektronischen und mikromechanischen Erzeugnissen, zum Anderen auch der vermehrte Verzicht auf Konservierungsstoffe in der Lebensmittelindustrie verantwortlich. Eine ausreichende Reinigbarkeit ist aus hygienischer Sicht generell notwendig, um einen hygienisch sicheren Prozess und möglichst lang haltbare Produkte zu schaffen (34). Des Weiteren fordert der EU-GMP-Leitfaden Annex 1 explizit eine ausreichende Reinigbarkeit von Oberflächen bei der Herstellung steriler Arzneimittel (1). Durch eine reine Produktionsumgebung werden die Störeinflüsse, welche auf die kritischen Produkte negativ einwirken, weitestgehend minimiert (35). Diese reine Fertigungsumgebung wird ebenfalls durch das Streben nach einer immer besser werdenden Qualität vorangetrieben (36). Die minimale Kontamination der Produkte steigert die Qualität und Zuverlässigkeit und senkt den kontaminationsbedingten Ausschuss. Durch die geringere partikuläre Restverschmutzung sinken daher auch die Produktionskosten (37).

Für eine wissenschaftlich abgesicherte Materialauswahl ist ein Klassifizierungssystem über die partikuläre Reinigbarkeit von Oberflächen erstrebenswert. Wie gut sich Partikel von einer Oberfläche durch Wischreinigung entfernen lassen, kann anhand einer hierfür am Fraunhofer IPA entwickelten und aktuell in dem Richtlinienentwurf VDI 2083 Blatt 9.2 standardisierten Messmethode überprüft werden. Ein linearer Wischsimulator wird für die dafür notwendige reproduzierbare Abreinigung eingesetzt.



Abbildung 3

Linearer Wischsimulator, Fraunhofer IPA, Stuttgart

Die zu untersuchenden Oberflächen müssen vor der Abreinigung reproduzierbar mit einer definierten Anzahl von Partikeln kontaminiert werden. Die Partikelbelegung wird vor und nach der Abreinigung messtechnisch direkt auf der Oberfläche erfasst. Daraus errechnet sich der relative Reinigungserfolg als Vergleichsmaß zwischen den verschiedenen Oberflächen. Die ermittelten Werte werden mit den partikulären Oberflächenreinheitsklassen (=SPC-Klasse) nach ISO/FDIS 14644-9 (38) und VDI 2083 Blatt 17draft (39) korreliert und durch Differenzbildung vor und nach Abreinigung der relative Reinigungserfolg durch die Differenz der SPC-Klassen ausgedrückt.

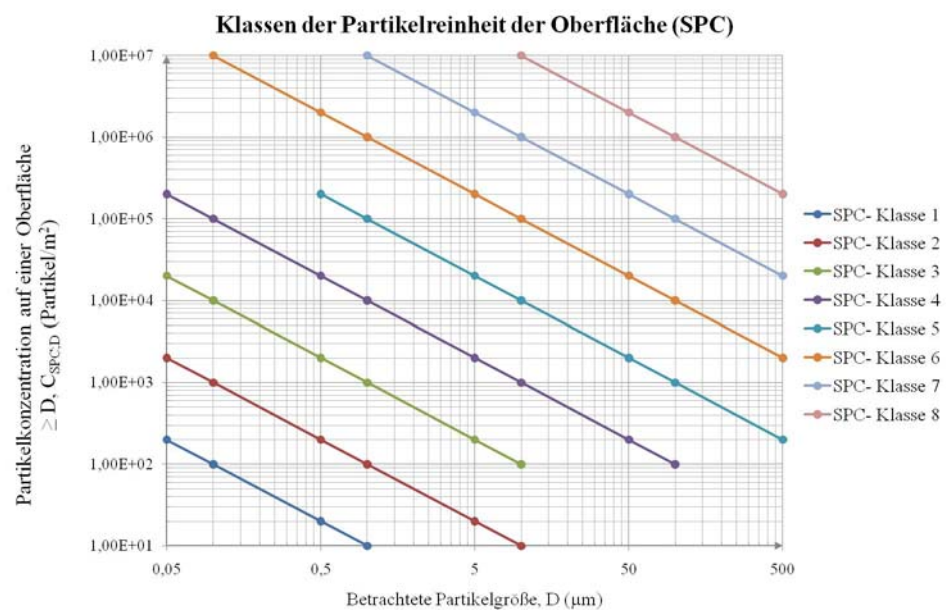


Abbildung 4 grafische Darstellung der SPC-Klassen nach ISO/FDIS 14644-9

Durch den Einsatz des linearen Wischsimulators kann auch die Abreinigbarkeit von Mikroorganismen vermessen werden im Vergleich zu den Grenzwerten des GMP-Leitfadens, siehe auch Abbildung 2 (1).

4.8 Elektrostatische Eigenschaften

Die elektrostatischen Eigenschaften von Oberflächen einer Reinraumumgebung sind von hoher Bedeutung. Durch eine mechanische Reinigung besteht die Gefahr, dass sich Oberflächen elektrostatisch aufladen und somit zu einer möglichen Anhäufung von Kontaminationen führen. Daher sollten sich Materialien und Oberflächen in hygienekritischen Bereichen nicht elektrostatisch aufladen können. Hinsichtlich einer elektrostatischen Charakterisierung und Klassifizierung sind unter anderem folgende Normen relevant: Zur Bestimmung des Durchgangswiderstands, Erdableitwiderstands und Oberflächenwiderstands von elastischen Bodenbelägen: DIN EN 1081 (40), zur Bestimmung des

Durchgangswiderstands und des Oberflächenwiderstands von festen planen Werkstoffen: DIN EN 61340-2-3 (41), zur Bestimmung des Oberflächenwiderstands, des Durchgangswiderstandes und des Widerstands gegen Erde von Bodenbelägen und verlegten Fußböden: DIN EN 61340-4-1 (42) und zur Bestimmung der elektrostatischen Schutzwirkung von Schuhwerk und Boden in Kombination mit einer Person (Systemwiderstand und Walkingtest): DIN EN 61340-4-5 (43). Die allgemeinen Anforderungen für elektrostatisch kontrollierte Bereiche sind in der Norm DIN EN 61340-5-1 definiert (44).

5 Reinigungs- und Desinfektionsverfahren

Reinigungs- und Desinfektionsverfahren führen zu einer Verminderung von Mikroorganismen auf den behandelten Flächen. Die den Anforderungen entsprechenden Reinigungs- und Desinfektionsmethoden müssen individuell ermittelt und festgelegt werden. Bei der Planung, Ausführung und Beurteilung von Reinigungs- und Desinfektionsprozessen sind die möglichen Auswirkungen von freigesetzten Chemikalien auf andere Prozesse, Produkte oder Menschen unbedingt zu beachten und ggf. messtechnisch zu überwachen. Generell ist darauf zu achten, dass Reinigungs- und Desinfektionsverfahren eingesetzt werden, welche die Konzentration von luftgetragener molekularer Verunreinigung und einer chemischen Kontamination der Oberflächen möglichst gering halten. Die Richtlinienreihe ISO 13408-1 bis -6 beschreibt und definiert die notwendigen Anforderungen zur aseptischen Herstellung von Produkten für die Gesundheitsfürsorge (45). Über die allgemeinen Anforderungen (Teil 1) wird die Sterilfiltration (Teil 2), die Gefriertrocknung (Teil 3), die Reinigung und Sterilisation vor Ort (Teil 4 und 5) und Isolatorenssysteme (Teil 6) detailliert betrachtet.

5.1 Reinigung

Die Reinigungsverfahren und Gerätschaften sollen für die jeweiligen Materialien geeignet sein (Werkstoffbeständigkeit gegen Reinigungsverfahren, chemische Beständigkeit, mechanische Beständigkeit). Für die Reinigung von Raumbereichen sollen entsprechend geeignete und möglichst rückstandsfrei anwendbare Reinigungsmittel und -verfahren verwendet werden.



Abbildung 5 Wischreinigung einer Edelstahloberfläche

5.1.1 Reinigungsverfahren

Zur Reinigung können verschiedene Prinzipien auch in Kombination eingesetzt werden: chemisch, biochemisch (Enzyme) und physikalisch (z.B. Bürsten). Es kann zwischen manuellen und automatisierten Reinigungsverfahren unterschieden werden. Das in Betracht gezogene Reinigungsverfahren bedarf einer spezifischen Betrachtung über den zu erwartenden Kontaminationsgrad, erreichbare notwendige Reinheit, mechanische und chemische Beständigkeiten der zu reinigenden Oberflächen, Kosten und Verfügbarkeit. Nach DIN 8592 (46) wird zwischen den folgenden Reinigungsverfahren unterschieden:

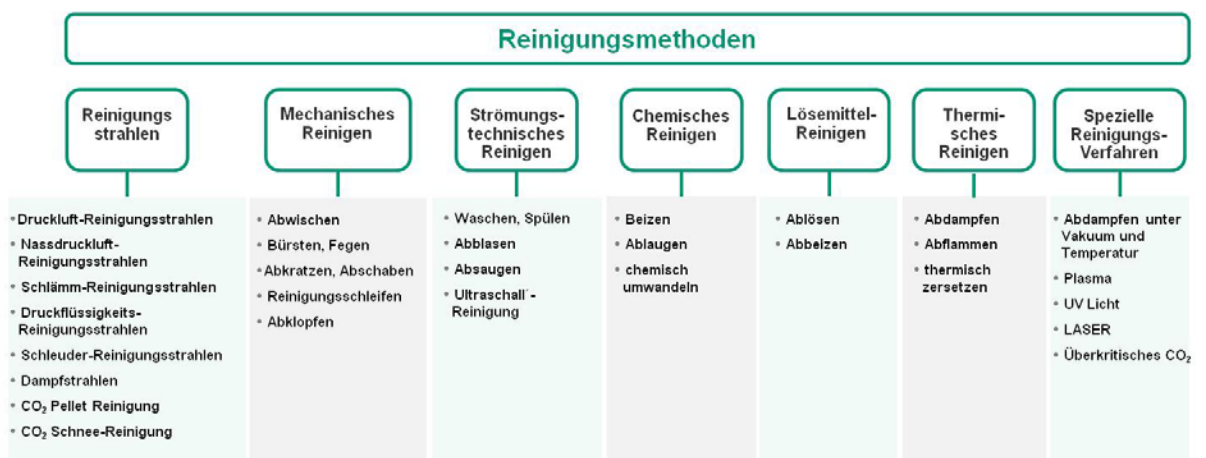


Abbildung 6 Reinigungsverfahren nach DIN 8592 (Spezielle Reinigungsverfahren und CO₂-Reinigungsverfahren wurden ergänzt durch Kreck, Fraunhofer IPA, Abteilung Reinst- und Mikroproduktion)

5.2 Desinfektion

Desinfektionsmittel müssen gemäß der vorgesehenen Anwendung ausgewählt und gemäß den einschlägigen Leitfäden und den Herstellerangaben verwendet werden. Eine Wirksamkeitsprüfung sollte beispielsweise nach einschlägigen Normen nachgewiesen werden (47). Die Wirksamkeit der angewendeten Desinfektionsverfahren muss außerdem durch regelmäßige Hygiene-Kontrollen überprüft werden (z. B. Abklatsch-, Abstrichuntersuchungen, Luftkeimzahlbestimmungen, etc.). Dazu ist es hilfreich, die in den entsprechenden Bereichen zu erwartende mikrobielle Kontamination einzuschätzen. Empfehlungen für mikrobiologische Grenzwerte sind beispielsweise im EG-GMP-Leitfaden, Annex 1 spezifiziert. Ein Testverfahren zur Überprüfung einer Oberflächendesinfektion wird im Anhang angegeben.

5.2.1 Desinfektionsmethoden

Voraussetzung für eine wirksame Desinfektion ist eine gründliche Reinigung der entsprechenden Oberflächen. Bestimmend für den Erfolg einer Desinfektionsmaßnahme ist in erster Linie die antimikrobielle Wirksamkeit (Einwirkzeit und Konzentration des Desinfektionsmittels). Bei den eingesetzten Desinfektionsmitteln soll eine möglichst rückstandsfreie Anwendung unter Berücksichtigung der Materialverträglichkeit gewährleistet sein. In der Regel werden Flächendesinfektionsverfahren unter Einwirkung eines mechanischen Effektes als sogenannte „Scheuer-Wisch-Desinfektionsverfahren“ eingesetzt.

Sofern keine Scheuer-Wisch-Desinfektion möglich ist, wird das Desinfektionsmittel ohne mechanischen Einfluss als Sprühdesinfektion auf die Oberfläche aufgebracht. Die Sprühdesinfektion ist aufgrund der Personalfährdung infolge der feinen Zerstäubung von Wirkstoffen nur dann einzusetzen, wenn eine Wischdesinfektion nicht möglich ist. Organismen werden nur abgetötet und bleiben als residuale biogene Verunreinigung auf der Oberfläche existent.

Die Tauchdesinfektion ist insbesondere bei schwer zugänglichen/ zu desinfizierenden Komponenten anzuwenden. Hohlkörper sind beispielsweise so einzulegen, dass Luft aus der Kavität vollständig entweichen kann und alle Oberflächen benetzt werden. Nach der Einwirkzeit sind desinfizierte Gegenstände gründlich unter fließendem Wasser abspülen.

Für die automatisierte Desinfektion von Räumen werden verschiedene Vernebelungstechnologien eingesetzt. Eine der Vernebelungsmöglichkeiten ist die HPV-Technologie. HPV (Hydrogen Peroxide Vapour) steht für Wasserstoffperoxid-Vernebelung (dry fogging). Weitere Vernebelungsverfahren arbeiten z.B. auf der Basis von Wasserstoffperoxid/Peressigsäure (wet fogging). Beim Einsatz von Vernebelungstechnologien muss gewährleistet werden, dass die Wirkstoffkonzentration über einen bestimmten Zeitraum gehalten wird. Mit Hilfe von Bioindikatoren wird die Desinfektionsleistung und mit chemischen Indikatoren die Wirkstoffverteilung überprüft. Die Eignung der mit dem desinfizierenden Nebel in Berührung kommenden Materialien sollte überprüft werden. Die US-

amerikanische Food and Drug Administration (FDA) referenziert dazu auf eine Materialstudie, publiziert in der PDA Vol. 57, No. 1, 2003 (48).

5.2.2 Validierung

Sämtliche Desinfektionsmaßnahmen sind als gesamtes Verfahren zu validieren und zu dokumentieren. Geeignete Validierungsverfahren sind Prozesskontrollen (z.B. Bioindikatoren, chemische Indikatoren und parametrische Überwachungsmaßnahmen) sowie Endproduktkontrollen (z.B. Abstrich, Kontaktkultur, Raumluft). Die Art der Validierung muss an die spezifischen Oberflächeneigenschaften (Ecken, Kanten, geometrische Gestaltung) angepasst werden. Darüber hinaus sind die Reinnräume selbst im Rahmen der Prozessvalidierung (PQ) Teil des notwendigen Validierungsprozesses. Bei der Prozessvalidierung in der pharmazeutischen Herstellung wird am Endprodukt getestet, ob der geführte Prozess unter denselben Bedingungen immer das beabsichtigte Ergebnis erzielt. Die Validierung muss für jedes neue Produkt trotz baugleicher oder identischer Gerätschaften und Automatisierung (siehe Kapitel 17) erneut durchgeführt werden.

6 Biomonitoring

Zur Beurteilung der Reinraumbedingungen bei hygienekritischen Anwendungen ist die reine Partikelmessung nicht allein geeignet. Jedoch besteht ein Zusammenhang zwischen der Partikelkonzentration in der Reinraumluft und der entsprechend zu erwartenden Keimbelastung. Luftgetragene Mikroorganismen befinden sich meist agglomeriert an Oberflächen von Partikeln zwischen 10 und 20 µm Durchmesser und sind demnach nicht „freischwebende einzelne Mikroorganismen“ (4). Die regelmäßige Überprüfung der mikrobiologischen Luft- und Oberflächenqualität in den jeweiligen Produktionsumgebungen und präventive Maßnahmen zur Senkung des Risikos mikrobiologischer Kontaminationen sind notwendig. Ein Wirksamkeitsnachweis der Desinfektionsmaßnahmen sollte in das bestehende Monitoring-System aufgenommen werden. Diese Monitoringergebnisse bestimmen die notwendigen Desinfektionsintervalle. Ein gesamtheitliches Biomonitoring-Konzept schließt die Überwachung des Personals mit ein. Grundsätzlich soll ein Biomonitoring zeigen, dass eine ausreichende Keimreduktion erfolgt ist. Praxisbezogene Empfehlungen zum Biomonitoring liefert unter anderem die US-Pharmacopoeia (4).

Biotische Partikel stellen in hygienekritischen Bereichen eine besondere Gefahrenquelle dar. Sie bedürfen eines entsprechenden Biomonitorings der Keimbelastung in der Luft und der Oberflächen. Die meisten Nachweisverfahren beruhen auf einer Kultivierung der entsprechenden Keime. Die anzuwendenden Methoden sind aus branchenspezifischen Standards und Regelwerken zu entnehmen (1), (49), (50). Je nach Zustand und Art der Keime (VBNC – viable but not culturable) können diese mit einem klassischen Kultivierungsverfahren teils

nicht nachgewiesen werden (51), (52), (53). Es ist davon auszugehen, dass jedes mikrobiologische Nachweisverfahren hinsichtlich der Zähl-effizienz und Entdeckungswahrscheinlichkeit, der Selektivität und Empfindlichkeit seine Grenzen hat. Die Ergebnisse der einzelnen Nachweismethoden sind nicht direkt miteinander vergleichbar und bedürfen einer vergleichenden Bestimmung. Es wird erwartet, dass zukünftige Entwicklungen alternativer mikrobiologischer Nachweisverfahren eine höhere Genauigkeit und Empfindlichkeit gegenüber den aktuell verfügbaren Verfahren zeigen. Dies kann unter anderem auch zu einer Anpassung der aktuellen Grenzwerte führen.

6.1 Bestimmung von Mikroorganismen in der Raumluft

Zur Detektion von Bioaerosolen gibt es verschiedene Nachweisverfahren, welche je nach Anforderungen (Messraum, Methode, zu bestimmende Parameter,...) entsprechend gewählt werden müssen. Für den spezifischen Nachweis bestimmter Mikroorganismen sind entsprechende Selektionsmethoden zu verwenden. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist das Volumen der analysierten Luft. Um den Grenzwert der GMP Reinheitsklasse A ($<1 \text{ KBE/m}^3$ Luft) sicher nachweisen zu können, müssen mehrere Kubikmeter Luft durch die Nachweisapparatur geführt werden. Nur dann kann eine ausreichende Messgenauigkeit und Messsicherheit gewährleistet werden.

6.1.1 Sedimentationsverfahren

Beim Sedimentationsverfahren wird ein Nährboden für eine definierte Zeit an ausgewählten Positionen offen im Raum positioniert. Die Auswertung erfolgt nach Bebrütung über die Auszählung der Kolonien. Aufgrund der rein zufallsorientierten und nicht quantifizierbaren Sedimentation der Keime pro Luftvolumen auf dem Nährboden ist der Einsatz des Sedimentationsverfahrens vor allem als einfaches qualitatives Screening zu sehen. Eine bewährte Einsatzmöglichkeit von ausgelegten Nährböden ist jedoch in kontrollierten Strömungsbereichen (laminare Luftführung) zu sehen, um in einem ersten Screening eine eventuell vorhandene Keimbelastung zu identifizieren. Für die Einschätzung der daraus zu ermittelnden Luftqualität müssen Erfahrungswerte basierend auf vorhergegangenen Mehrfachmessungen vorliegen.

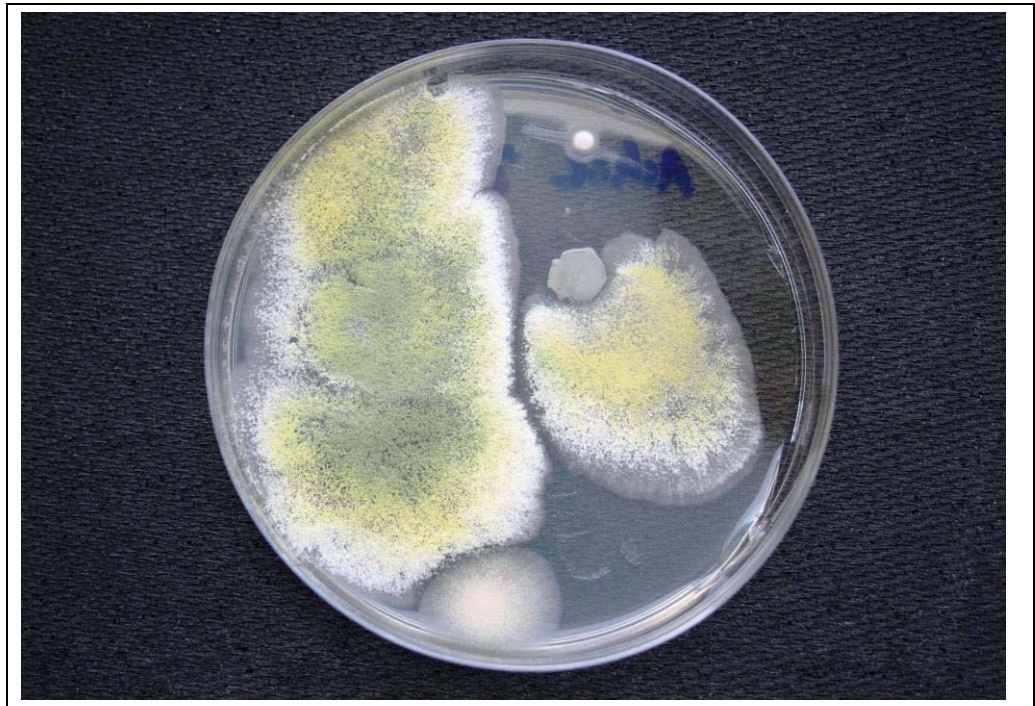


Abbildung 7 Sedimentationsplatte nach Auslegen über eine definierte Probenahmezeit mit Wachstum von Pilzkolonien

6.1.2 Filtrationsverfahren

Beim Filtrationsverfahren wird ein volumendefinierter Luftstrom durch einen Filter (z.B. Membranfilter; Gelatinefilter) gesaugt. Zur Auswertung werden die Filter auf ein festes Nährmedium überführt. Die Auswertung erfolgt nach Bebrütung über die Auszählung der Kolonien (49), (50).

6.1.3 Impaktionsverfahren

Ähnlich laufen Messungen nach dem Impaktionsverfahren ab. Die zu untersuchende Luft wird aus einem angesaugten volumendefinierten Luftstrom direkt über eine definierte Öffnung auf der Oberfläche eines festen Mediums (Agarplatten, Agarstreifen) abgeschieden. Die Auswertung erfolgt nach Bebrütung über die Auszählung der Kolonien. Beim Schlitz-Probennehmer (Slit-to-Agar Air Sampler, STA) passiert das feste Nährmedium kontinuierlich einen Impaktionsschlitz, sodass eine gewisse zeitliche Auflösung der Ergebnisse möglich wird. Kaskadenimpaktoren ermöglichen eine Aussage über die mikrobiologische Belastung einzelner Partikelgrößenfraktionen.



Abbildung 8 Keimsammler nach dem Impaktionsverfahren. Die Agarplatten werden unter der Düsenplatte fixiert.

6.1.4 Impingerverfahren

Beim Impinger-Verfahren oder Gaswaschverfahren wird die zu untersuchende Luft mit einem volumendefinierten Luftstrom durch eine Flüssigkeit gesaugt. In der Luft enthaltene Mikroorganismen werden in der Flüssigkeit abgeschieden. Teile der Flüssigkeit werden auf einem festen Nährboden ausplattiert und inkubiert. Die Auswertung erfolgt nach Bebrütung über die Auszählung der Kolonien.



Abbildung 9

Gaswaschflasche mit Nährmedium und angeschlossener Probenahmepumpe zur Bestimmung von luftgetragenen Mikroorganismen

6.2 Bestimmung von Mikroorganismen auf Oberflächen

Zur Bestimmung von Mikroorganismen auf Oberflächen werden das Abklatschverfahren und das Tupferverfahren/Abstrichverfahren (oft Swab genannt) angewandt. Zu beachten ist, in wie weit Keime in Ritzen, Vertiefungen und Spalten überhaupt mit dem Medium oder Tupfer in Kontakt kommen können und in wie weit eine Ablösung von der Oberfläche erfolgt, denn nur abgelöste Keime können später als koloniebildende Einheit (KBE) nachgewiesen werden.

6.2.1 Abklatschverfahren

Beim Abklatschverfahren (54) wird ein festes Inkubationsmedium (Casein-Soja-Pepton-Agar o.ä.) mit einer Oberfläche von etwa 50 cm² (siehe EU-GMP Annex (1)) auf eine plane Oberfläche mit einem definierten Druck über eine definierte Zeit gedrückt (fünf Sekunden mit einem Druck, sodass nach Möglichkeit die gesamte Oberfläche mit dem Medium in Kontakt kommt, aber keine Luftblasen entstehen. Bewährt haben sich beispielsweise ein Auflagegewicht von 1 kg). Die Inkubation erfolgt analog zu den anderen Kultivierungs-Nachweisverfahren.

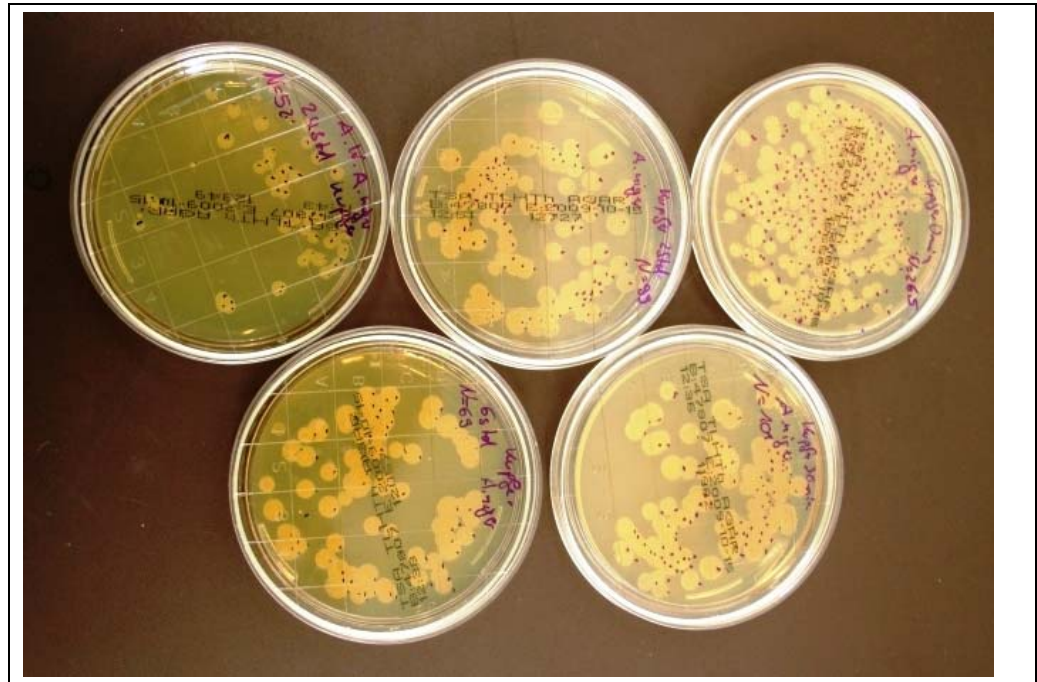


Abbildung 10

Abklatschplatten nach Analyse einer mit *B. pumilus* kontaminierten Kupferoberfläche kontaminierten Oberfläche nach Inkubation. Der Abklatsch erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Es konnte die mikrobizide Wirkung von Kupfer veranschaulicht werden (55).

6.2.2 Tupfverfahren/Swabs

Die Tupfverfahren (56) werden bevorzugt bei nicht planen Oberflächen angewandt, bei denen das Abklatschverfahren nicht eingesetzt werden kann. Dabei wird mit einem geeigneten Tupfer eine vorab mit einer sterilen Schablone begrenzte definierte Oberfläche (meist zwischen 20 und 50 cm²) abgereinigt und die sich anschließend auf dem Tupfer befindenden Mikroorganismen werden dann in eine entsprechende Lösung überführt. Ein bestimmtes Volumen der Lösung wird zur Zählung der Mikroorganismen ausplattiert. Für die Untersuchung von Isolatoren oder Bereichen der GMP Reinheitsklasse A mit einem Limit von <1 KBE kann der Tupfer direkt in ein flüssiges Inkubationsmedium gegeben werden. Es kann dabei nur eine +/- -Aussage getroffen werden durch ein Vorhandensein einer Trübung (= Wachstum von Mikroorganismen) des Inkubationsmediums. Aufgrund des erforderlichen Limits von <1 KBE ist hierbei jedoch eine +/- -Aussage ausreichend.



Abbildung 11

Abstrich einer Edelstahloberfläche mit einem sterilen Tupfer

6.3 Handschuhe

Dabei werden die Fingerspitzen der einzelnen Finger nach Anlegen des sterilen Handschuhs auf eine Petrischale, gefüllt mit einem entsprechenden Nährboden, gedrückt. GleichermäÙen kann für die Bekleidung verfahren werden. Die Nährböden werden anschließend inkubiert und die koloniebildenden Einheiten nach erfolgreicher Inkubation ausgezählt. Diese Messung wird gegen Ende einer Arbeitsschicht oder nach Durchführung hygienekritischer Prozesse empfohlen.

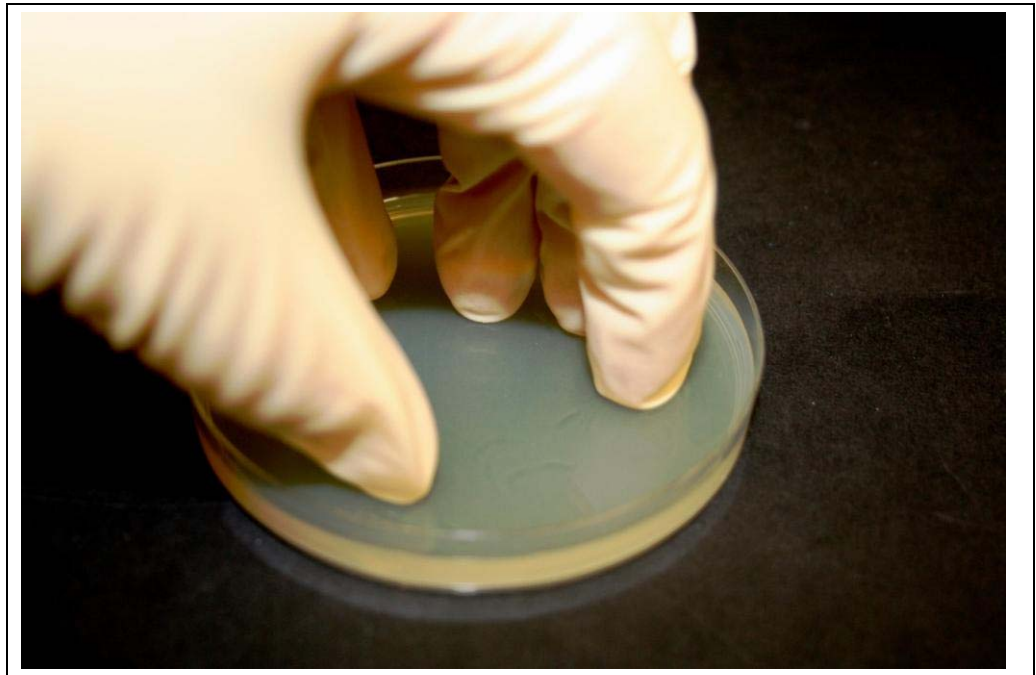


Abbildung 12

Bestimmung der mikrobiologischen Belastung der Fingerspitzen von Handschuhen durch Eindrücken der Fingerspitzen auf einen Agar-Nährboden

6.4 Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen

Als mögliche mikrobiologische Nährböden kommen unter anderem ein in den einzelnen Arzneimittelbüchern (4), (57), (58) identisch standardisiertes Sojabohnen Casein Pepton Agar (CSD-Agar, CASO Bouillon) als Vollmedium zur Detektion von Bakterien und Pilzen in Frage. Je nach Anwendungsfall können dem Vollmedium noch Additive zur Reduktion des Einflusses von Reinigungsmitteln und Antibiotika zu selektiven Kultivierung zugesetzt werden. Zur speziellen Umgebungskontrolle hinsichtlich Pilzen können allgemeine Pilzmedien wie beispielsweise das Sabouraud Dextrose Agar-Medium (SDA) eingesetzt werden.

Typischerweise werden die Nährböden bei Temperaturen zwischen 22 und 30 °C für zwei bis drei Tage unter hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Parallel zu jedem Biomonitoring sollte auch die Sterilität der Medien überwacht werden. Ein weiterer sinnvoller Test ist der Wachstumskontrolltest. Dieser zeigt auf, ob und in wie weit das ausgesuchte Medium das Wachstum ausgesuchter Stämme unterstützt. Generell kann gesagt werden, dass ein geeignetes Medium das Wachstum nach einem Ansatz mit 10-100 koloniebildenden Einheiten (KBE) ermöglichen muss. (4).

6.5 Keimidentifizierung

Je nach Fragestellung kann es notwendig sein, die isolierten Keime nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ zu bestimmen. Hierzu gibt es verschiedene Verfahren mit entsprechend unterschiedlicher Detailtiefe. Selektivnährböden stellen eine erste einfache Möglichkeit der Eingrenzung der möglichen Genese des Isolats dar. Die Anfärbung der bei gram-positiven Bakterien vorhandenen Mureinhülle stellt eine weitere Differenzierungsmöglichkeit dar (Gram-Färbung). PCR (Polymerase chain reaction) Methoden basieren auf der Bestimmung einer DNA-Sequenz des Isolats und deren Abgleich mit einer bestehenden Datenbank. PCR-Methoden sind sehr spezifisch, aber teils teuer und aufwändig in der Anwendung. Es gibt mittlerweile sehr viele „ready to use“ Kits auf dem Markt zu Eingrenzung und Bestimmung der Isolate vor Ort, meist basierend auf einem immunologischen Nachweis oder Echtzeit PCR (real-time PCR).

7 Schulung

Die Hauptquelle mikrobiologischer Kontamination in einer hygienischen Fertigung ist das Personal. Der Betrieb eines Reinraums erfordert neben der Wartung, Instandhaltung und Kontrolle der erforderlichen Produktionsumgebung auch ein hohes Ausbildungs- und Schulungsniveau der eingesetzten Mitarbeiter mit entsprechenden Überwachungsmechanismen. Die Schulung von Bedienungs- und Wartungspersonal hinsichtlich der Auswirkungen von Substanzfreisetzungen auf benachbarte, nicht selbst verantwortete Prozesse sowie die Schulung präventiver Maßnahmen zur Verhinderung der Freisetzung tragen maßgeblich zur Betriebssicherheit einer hygienischen Fertigungsumgebung bei. Besonders das mikrobiologische Umgebungsmonitoring erfordert ein sorgsames Vorgehen, sodass der Vorgang der einzelnen Probenahmen nicht zusätzlich Mikroorganismen in die Produktionsumgebung einschleppt.

Personalschulungen sollten die Grundlagen für die Sterilproduktion und Mikrobiologie, Reinigung und Desinfektion, Medienauswahl und –Vorbereitung, Sterilisierung und den Einfluss von entsprechenden Handhabungsschritten auf die potentielle Freisetzung von Mikroorganismen als wichtige Punkte beinhalten. Ein weiterer integraler Bestandteil sind die Forderungen und Vorgaben der GMP. Ein entsprechender Gesundheitsnachweis des Personals sichert den Betreiber ab. Nur gesunde Personen dürfen in den hygienekritischen Reinraumumgebungen arbeiten. Die Personalhygiene beim Eintreten in kontrollierte hygienekritische Fertigungsumgebungen ist einer der wichtigsten Faktoren, welcher entsprechend geschult und überwacht werden muss. Nach dem Ankleiden der Mitarbeiter mit entsprechend geeigneter Reinraumkleidung, Mundschutz und Handschuhen, muss der Mitarbeiter ständig seinen Bekleidungsstatus

überwachen, damit kein zufälliger Missstand in der Bekleidung zu unerwünschten mikrobiologischen Kontaminationen führen kann.

Selbst ein engmaschiges Umgebungsüberwachungsprogramm kann nicht alle plötzliche und unvorhergesehen auftretende Risiken feststellen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der entsprechenden Personalschulungen.

8 Zusammenfassung

Bei der Reinraumplanung für eine hygienische Produktionsumgebung sind unter anderem folgende Gesichtspunkte zu beachten: Standortwahl, notwendige Reinheitsklasse mit der entsprechenden Filtertechnik, die Materialauswahl der Wände, Decken und Fußböden mit besonderem Fokus Reinigbarkeit und Sterilisierbarkeit, das hygienegerechte Design der Maschinen und Anlagen mit der entsprechenden Materialauswahl, Verwendung von Isolatoren oder anderen abgrenzenden Techniken mit entsprechenden Schleusenkonzepten.

Während des Betriebs einer hygienekritischen Fertigung müssen die entsprechenden Reinheitsparameter wie Biokontamination und Partikel in der Luft und auf Oberflächen, Aufrechterhaltung von Zonenkonzepten, Keimeintrag durch Rohstoffe und Personal, Überwachung der Temperatur und Feuchte ausreichend engmaschig kontrolliert werden, um eine Abweichung im besten Fall schon während ihres Entstehens durch das Überschreiten einer Alarmgrenze festzustellen. Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen gilt es zu validieren und kontrollieren.

Aufgrund der Tatsache, dass der Faktor Mensch in der hygienekritischen Produktion das größte Gefahrenpotential darstellt, muss durch ausreichende und regelmäßige Qualifizierungs- und Schulungsmaßnahmen ein sicheres Arbeiten bezüglich der einzelnen hygienischen Gesichtspunkten gewährleistet werden.

9 Literaturverzeichnis

1. EU-GMP Guide to Good Manufacturing Practice, Annex 1. *Manufacture of sterile medicinal products*. Brussels : European Commission, 2003.
2. VDI 2083 Blatt 18 - Entwurf. *Biokontaminationskontrolle*. Berlin : Beuth Verlag, 2010.
3. DIN EN ISO 14644-1. *Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche - Teil 1: Klassifizierung der Luftreinheit*. Berlin : Beuth Verlag, 1999.
4. USP 30 <1116>. *The United States Pharmacopeia*. Rockville MD : United States Pharmacopeial Convention, 2003.
5. VDI 6022. *Raumluftechnik, Raumlufqualität - Hygieneanforderungen an Raumluftechnische Anlagen und Geräte*. Berlin : Beuth Verlag, 2011.
6. VDI 2167 Blatt 1. *Technische Gebäudeausrüstung von Krankenhäusern - Heizungs- und Raumluftechnik*. Berlin : Beuth Verlag, 2007.
7. Wie rein muss es sein? *Lebensmittel Technologie*. 06 2007.
8. **Ulrich Pflugmacher, John Emerson, Lothar Gail, and Petra Esswein.** Environmental Monitoring. [Buchverf.] Kevin I. Williams. *Microbial Contamination Control in Parenteral Manufacturing*. s.l. : Informa Healthcare, 2004, S. 609-624.
9. BioStoffV. *Verordnung zur Umsetzung der EG-Richtlinien über den Schutz der Beschäftigten gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe; Artikel 1 Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen*. Berlin : Bundesministerium der Justiz, 1999.
10. Richtlinie 2000/54/EG. *Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit*. Strasbourg : Europäischen Parlament und des Rat, 2000.
11. GenTG. *Gentechnikgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBl. I S. 2066), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist*. Berlin : Bundesministerium der Justiz, 2010.
12. DIN 51130. *Prüfung von Bodenbelägen - Bestimmung der rutschhemmenden Eigenschaft - Arbeitsräume und Arbeitsbereiche mit*

Rutschgefahr, Begehungsverfahren - Schiefe Ebene. Berlin : Beuth Verlag, 2010.

13. BGR 181. *Fußböden in Arbeitsräumen und Arbeitsbereichen mit Rutschgefahr.* Berlin : Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, 2010.

14. VDI 2083 Blatt 9.1. *Reinraumtechnik - Reinheitstauglichkeit und Oberflächenreinheit.* Berlin : Beuth Verlag, 2006.

15. DIN EN 12469. *Biotechnik - Leistungskriterien für mikrobiologische Sicherheitswerkbänke.* Berlin : Beuth Verlag, 2000.

16. **Bürger, Frank und Schweizer, Marion.** Design von Equipment im reinen und hygienischen Bereich. [Buchverf.] Lothar Gail, Udo Gommel und Horst Weißsieker. *Projektplanung Reinraumtechnik.* Heidelberg : Hüthig Verlag, 2009, S. 84-85.

17. Code of Federal Regulations. *CFR Title 21.* Washington : s.n.

18. DIN EN ISO 846. *Einwirkung von Mikroorganismen auf Kunststoffe Bedarfsgegenstände.* Berlin : Beuth Verlag, 1997.

19. DIN EN 15457. *Beschichtungsstoffe – Laborverfahren für die Prüfung der Wirksamkeit von Filmkonservierungsmitteln in einer Beschichtung gegen Pilze.* Berlin : Beuth Verlag, 2007.

20. JIS Z 2801. *Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy.* Tokyo : JSA, 2000.

21. ISO 22196. *Kunststoffe - Messung von antibakterieller Aktivität auf Kunststoffoberflächen.* Berlin : Beuth Verlag, 2007.

22. EHEDG Doc 8. *Gestaltungskriterien für Hygienegerechte Maschinen, Apparate und Komponenten.* Frankfurt : European Hygienic Engineering and Design Group, 2004.

23. ISPE Baseline Volume 1, second edition. *Active Pharmaceutical Ingredients.* Tampa : International Society for Pharmaceutical Engineering, 2007.

24. DIN EN 1672-2. *Nahrungsmittelmaschinen - Allgemeine Gestaltungsleitsätze - Teil 2: Hygieneanforderungen.* Berlin : Beuth Verlag, 2009.

25. DIN EN ISO 14159. *Sicherheit von Maschinen - Hygieneanforderungen an die Gestaltung von Maschinen.* Berlin : Beuth Verlag, 2002.

26. DIN EN ISO 2812-1. *Beschichtungsstoffe - Bestimmung der Beständigkeit gegen Flüssigkeiten - Eintauchen in Flüssigkeiten außer Wasser*. Berlin : Beuth Verlag, 2007.
27. DIN EN ISO 2812-4. *Beschichtungsstoffe - Bestimmung der Beständigkeit gegen Flüssigkeiten - Teil 4: Tropf-/Fleckverfahren*. Berlin : Beuth Verlag, 2007.
28. DIN EN ISO 4628-1 bis -5. *Beschichtungsstoffe - Beurteilung von Beschichtungsschäden - Bewertung der Menge und der Größe von Schäden und der Intensität von gleichmäßigen Veränderungen im Aussehen*. Berlin : Beuth Verlag, 2004.
29. DIN 53233. *Beschichtungsstoffe - Bestimmung des Abriebverhaltens von dekontaminierbaren Beschichtungen - Fallrohr-Verfahren*. Berlin : Beuth Verlag, 2003.
30. DIN EN ISO 20566. *Beschichtungsstoffe - Prüfung der Kratzfestigkeit von Beschichtungen mit einer Laborwaschanlage*. Berlin : Beuth Verlag, 2007.
31. DIN EN ISO 11998. *Beschichtungsstoffe - Bestimmung der Nassabriebbeständigkeit und der Reinigungsfähigkeit von Beschichtungen*. Berlin : Beuth Verlag, 2006.
32. ASTM D 968. *Standard Test Method for Resistance of Transparent Plastics to Surface Abrasion*. West Conshohocken : American Society for Testing and Materials, 2008.
33. ASTM D1044. *Standard Test Method for Resistance of Transparent Plastics to Surface Abrasion*. West Conshohocken : American Society for Testing and Materials, 2008.
34. **Bobbe, U.** *Die Reinigbarkeit technischer Oberflächen im immersiellen System*. Technische Universität München : Lehrstuhl für Maschinen- und Apperatekunde; Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, 2008.
35. **Gommel, U.** *Verfahren zur Bestimmung der Reinraumtauglichkeit von Werkstoffpaarungen*. Universität Stuttgart : Fakultät Maschinenbau, Fraunhofer IPA, 2006.
36. **Grimme R., Ernst C., Vohrer U. & Leupolt B.** Sauberkeitsprüfung und Oberflächenanalytik in der Reinigungstechnik. *MO - Beschichten von Kunststoff und Metall*. 2005, 59/12.
37. **Schmauz G., Grimme R.** Online-Qualitätsüberwachung mit Streiflicht. *Jurnal für Oberflächentechnik*. 2005, 50/3.

38. ISO/FDIS 14644-9. *Cleanrooms and associated controlled environments - Part 9. Classification of surface cleanliness by particle concentration*. Berlin : Beuth Verlag, 2010.
39. VDI 2083 Blatt 17 Entwurf. *Reinraumtechnik, Reinheitstauglichkeit von Werkstoffen*. Berlin : Beuth Verlag, 2011.
40. DIN EN 1081. *Elastische Bodenbeläge, Bestimmung des elektrischen Widerstands*. Berlin : Beuth Verlag, 1998.
41. DIN EN 61340-2-3. *Prüfverfahren zur Bestimmung des Widerstandes und des spezifischen Widerstandes von festen planen Werkstoffen, die zur Vermeidung elektrostatischer Aufladung verwendet werden*. Berlin : Beuth Verlag, 2000.
42. DIN EN 61340-4-1. *Elektrischer Widerstand von Bodenbelägen und verlegten Fußböden*. Berlin : Beuth Verlag, 2004.
43. DIN EN 61340-4-5: . *Standardprüfverfahren für spezielle Anwendungen - Verfahren zur Charakterisierung der elektrostatischen Schutzwirkung von Schuhwerk und Boden in Kombination mit einer Person*. Berlin : Beuth Verlag, 2005.
44. DIN EN 61340-5-1. *Schutz von elektronischen Bauelementen gegen elektrostatische Phänomene - Allgemeine Anforderungen*. Berlin : Beuth Verlag, 2001.
45. ISO 13408-1 bis -6. *Aseptische Herstellung von Produkten für die Gesundheitsfürsorge*. Berlin : Beuth Verlag, 2011.
46. DIN 8592. *Fertigungsverfahren Reinigen - Einordnung, Unterteilung, Begriffe*. Berlin : Beuth Verlag, 2003.
47. EN 14885. *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*. Berlin : Beuth Verlag, 2006.
48. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2003, Bd. 57, 1.
49. VDI 4252 Blatt 2. *Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft - Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten*. Berlin : Beuth Verlag, 2008.
50. VDI 4253 Blatt 3. *Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft - Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten*. Berlin : Beuth Verlag, 2008.

51. **Bourneuf, Gregg Bogosian and Edward V.** A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep.* 2001, Bd. 2(9), S. 770-774.
52. **Steck, Brian Grey and Todd R.** Concentrations of Copper Thought To Be Toxic to Escherichia coli Can Induce the Viable but Nonculturable Condition. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001, Bd. 67, 11, S. 5325-5327.
53. **Sardesai, Yogita N.** Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health. *Current Science.* 2005, Bd. 89, 10, S. 1650.
54. DIN 10113-3. *Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich Teil 3: Semiquantitatives Verfahren mit Nährbodenbeschichteten Entnahmevorrichtungen (Abklatschverfahren).* Berlin : Beuth Verlag, 1997.
55. **Keller, Markus und Waldner, Alina.** Reduktion von Bacillus pumilus auf Kupferoberflächen. *Der Lebensmittelbrief.* 2010, Bd. 21, 08/09, S. 16-17.
56. DIN 10113-1. *Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich Teil 1: Quantitatives Tupferverfahren.* Berlin : Beuth Verlag, 1997.
57. Ph. Eur. *European Pharmacopeia, 7th edition.* Strasbourg : European Directorate for the quality of Medicines and Health Care, 2010.
58. JP. *Japanese Pharmacopeia, 15th edition.* Tokyo : Yakuji Nippo, 2007.
59. VDI 2083 Blatt 9.1. *Reinraumtechnik, Reinheitstauglichkeit und Oberflächenreinheit.* Berlin : Beuth Verlag, 2006.