

- **Effektivität**

Ebenfalls durch div, Planungshilfen konnten parallele oder doppelte Prüfungen identifiziert werden und so unnötige Prüfungen weitgehend vermieden werden. Durch die einfache zentrale Organisation lässt sich zusätzlich das Monitoring dynamisch an den Produktionsprozess anpassen, wodurch z.B. Flächen die zeitweise nicht genutzt auch nicht geprüft werden.

In zahlreichen internen und externen Audits ist der GMP-Status der Produktion regelmäßig überprüft worden.

Auszug aus der Audit-Historie bis 1998 (nicht vollständig):

Inspizierende Behörde	Inspektionstermine
Internes Audit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ca. 1x pro Jahr</li> </ul>
Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit (LaGeTSi = lokale Überwachungsbehörde)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 11/92</li> <li>• 07/93</li> <li>• 04/95</li> <li>• 02/98</li> <li>• 11/98</li> </ul>
FDA (=Amerikanische Überwachungsbehörde)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10/94</li> <li>• 04/96</li> <li>• 12/96</li> <li>• 02/02</li> </ul>

Zusammenfassend kann man sagen, dass das gelebte Umgebungsmonitoring den hohen FDA-Standards (siehe auch Punkt 2.1) im untersuchten Zeitraum entsprochen hat.

Damit ist die Qualität der Datengrundlage für die folgenden Auswertungen sichergestellt.

## 5 Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Im Rahmen des unter Punkt 4.3 Monitoringprogramms wurde auch eine umfangreiche Keimidentifizierung durchgeführt.

Zur Bewertung von Monitoringergebnissen ist nicht nur wichtig wie viele Keime gefunden werden, sondern auch welche. Aus den Keimidentifizierungen können Rückschlüsse gezogen werden, welche Ursachen eine Keimbelastung haben könnte.

Die Auswertung der Keimidentifizierungen bildet somit eine Grundlage zur Analyse der Einflussfaktoren für die KBE-Belastung.

Nach folgenden Regeln wurde bei jeder KBE entschieden, ob die gefundenen Keime zusätzlich einer Keimidentifizierung unterzogen werden müssen:

Identifiziert wurden:

- Alle Aktionsgrenzüberschreitungen
- Alle Keime, die im WFI-Systems gefunden worden sind
- Alle Keime, die in der Klasse A gefunden worden sind
- Sonderaktionen wie Reinraumqualifizierungen

Im Rahmen der PDA Umfrage wurden US-Firmen gefragt, wie exakt die Keimidentifizierung ausgeführt wird [Seyfarth (2001-1), [Seyfarth (2001-2)]

- Morphologie 3,8% (3)
- Gram-Färbung 3,8 % (8)
- Genus 11,3 % (6)
- Spezies 83,0% (44)

Die meisten Unternehmen führen also die Keimidentifizierung bis zur Spezies aus. Daran ist auch erkennbar, dass die Keimidentifizierung eine teure aber lohnenswerte Investition in Reinraumqualität ist.

### **5.1 Angewendetes System der Keimidentifizierung**

Alle Identifizierungen wurden in einem spezialisierten Labor durchgeführt. Die Differenzierung erfolgt nach einem festgelegten Schema unter der Verwendung von mehreren am Markt verfügbaren Tests. Eingesetzt werden Tests der VITEK- und API Serie der Firma bioMérieux sa ® (Frankreich).

Für beide Tests muss eine Keimsuspension mit verschiedenen Reagenzien in Kontakt gebracht werden (die s.g. bunte Reihe). Eine Farbreaktion zeigt an, dass der Keim zu einer bestimmten enzymatische Stoffwechselaktivität in der Lage ist. Diese unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten sind spezifisch für bestimmte Keim-Spezies und können in einer bestimmten Kombination einen Keim anhand seiner enzymatischen Eigenschaften identifizieren.

Die API-Serie ist eine halbautomatische Identifizierung. Das heißt, dass die Keimsuspension in vorgefertigte Vials pipettiert und bebrütet wird. Die Farbreaktionen werden manuell ausgewertet und mit Hilfe eines Computers wird anhand des Ergebnisses ein Keim identifiziert.

Der VITEK Test ist ein vollautomatisches System. In die jeweilige VITEK Test-Kassette wird per Vakuum die Keimsuspension in die verschiedenen Testkammern gesaugt. Die Kassette wird in das VITEK-Analysegerät eingelegt. Das Gerät übernimmt vollautomatisch die Bebrütung und die Auswertung.

Um eine große Anzahl von Mikroorganismen differenzieren zu können, ist der Einsatz von mehreren unterschiedlichen Testmodellen erforderlich.

Um für jeden Keim den passenden Test auszuwählen wird eine Gramfärbung mit anschließender mikroskopischer Differenzierung durchgeführt. Anhand dieser Untersuchung, evtl. ergänzt um eine Stoffwechselreaktion, kann der optimale Test ausgewählt werden (siehe Tabelle 14):

Tabelle 14 : Schema zur Keimidentifizierung

<b>Merkmal</b>	<b>Vorreaktion</b>	<b>Schwerpunkt des Tests</b>	<b>Zu verwendendes Testmodell</b>
Gram + Kokken	Katalase +	Micrococcaceae	ID32 Staph API ®
Gram + Kokken	Katalase -	Streptococcaceae	VITEK GPI ®
Gram + Stäbchen	Hämolyse, dicke Kolonien	Bacillus, aerobe Sporenbildner	VITEK BAC ® API 50CHB ®
Gram + Stäbchen	Dünner Bakterienrasen	Corynebakterien	API Coryne ®
Gram – Stäbchen	Oxidase +	Non-Enterobacteriaceae (Non-Fermenter)	API 20NE ® VITEK GNI ®
Gram – Stäbchen	Oxidase -	Enterobacteriaceae (Fermenter)	API E ® VITEK GNI ®
Hefen	Mikroskopisches Bild	Hefepilze	VITEK YBC ®
Anaerobier	Bei anaerober Bebrütung der Probe	Anaerobier	VITEK ANI ®
Schimmelpilze	Mikroskopisches Bild	Schimmelpilze	Vergleich des Nativpräparates mit Bilderatlas

Ein Keim gilt als identifiziert, wenn das entsprechende Testmodell eine Identifizierung mit mehr als 80% Wahrscheinlichkeit liefert. Liegt die Wahrscheinlichkeit darunter wird die Testreaktion evtl. mit einem alternativen Modell wiederholt.

In Anhang 4 ist eine Liste aller in der Monitoring-Datenbank verfügbaren Keimspezies aufgeführt.

Durch den Einsatz dieses Keimidentifizierungsverfahrens ist sichergestellt, dass alle Identifizierungen mit präziser und hoher Verlässlichkeit ausgeführt werden. Dies bildet die Grundlage der folgenden Analyse des Keimspektrums.

## **5.2 Typische Keime an verschiedenen Prüforten (Keimlandschaft)**

Um ein individuelles Messergebnis bewerten zu können, muss in Abhängigkeit vom Ort, an dem die Messung erfolgt ist, ein Spektrum von üblicherweise vorkommenden Keimen ermittelt werden. Die damit gebildete Keimlandschaft kann dann für die Bewertung von einzelnen Ergebnissen verwendet werden. In den folgenden Kapiteln werden typische Keime an Personen, der Luft, an Oberflächen sowie in Reinstwasser untersucht.

## 5.2.1 Personen

Da das mikrobiologische Monitoring nur die Überprüfung von Personal in der aseptischen Produktion vorschreibt, werden hier nur Daten aus der Reinheitsklasse B präsentiert. Bereiche der Reinheitsklasse A sollen im Routinebetrieb frei von Personal sein.

Im vorliegenden Monitoring-Programm wurden an 12 verschiedenen Messpunkten verteilt, Proben genommen:

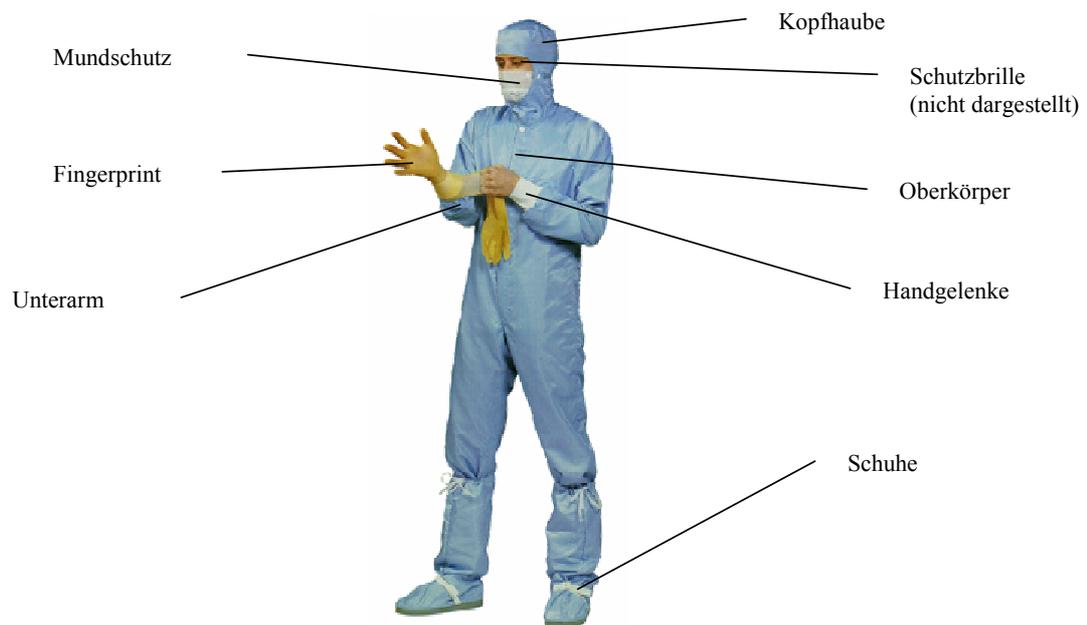


Abbildung 5: Messpunkte bei Reinraumkleidung für Klasse B (ohne Schutzbrille)

Um die typischen Keime, die an Reinraumkleidung identifiziert werden richtig einzuordnen, folgt zuerst eine Auswertung, wie sich die KBE-Belastung über die 12 Messpunkte auf der Reinraumkleidung verteilt.

### **KBE-Belastung von Reinraumkleidung in Klasse B**

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

**SQL-Statement<sup>9</sup>:**

```

SELECT Daten.[Genauer Ort], Sum(Daten.Ergebnis) AS KBE,
Count(Daten.Ergebnis) AS Anz, [KBE]/[Anz] AS KBE_Pro, Avg(Daten.Proz_Spez)
AS [Mittelwert von Proz_Spez]

FROM Daten

WHERE (((Daten.M_Gruppe)="4") AND ((Daten.Ergebnisklasse)=1) AND
((Daten.Stelle)="Person"))

GROUP BY Daten.[Genauer Ort]

```

Es wurden alle KBE-Messungen (Ergebnisklasse 1) aus dem Personalmonitoring (M\_Gruppe 4) selektiert. Für diese Selektion wurde nach Prüforten gruppiert je Gruppe die Summe aller gemessenen KBEs, die Anzahl der durchgeführten Analysen sowie der durchschnittliche Abstand zur oberen Grenze in % berechnet.

**Qualitätssicherung der Datenselektion:**

Zur Überprüfung der Datenselektion wurde die Anzahl der vom SQL-Statement gelieferten Datensätze verwendet. Da 12 Prüforte im Personalmonitoring verwendet werden, müssen genau 12 Datensätze im Ergebnis geliefert werden. Da dies der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektion richtig erfolgt ist.

**Selektionsergebnis in der Übersicht**

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl zugrundeliegenden der Einzelmessungen
KBE Belastung von Reinraumkleidung in Klasse B	12	49.957

**Auswertung der Datenselektion:**

Rang %-Grenzwert	Messpunkt	Summe der KBE	Anz. d. Messungen	KBE Pro Messung	Mittelwert von %-Grenzwert
1	Oberkörper	14717	4012	3,668	18,07%
2	Handgelenk rechts	741	4011	0,185	3,78%
3	Unterarm links	221	302	0,732	3,66%
4	Unterarm rechts	215	302	0,712	3,56%

<sup>9</sup> Zur Nachvollziehbarkeit und Qualitätssicherung der Auswertung ist hier die Suchabfrage wiedergegeben, mit der die Daten für diese Auswertung aus der Datenbank ermittelt wurden.

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Rang %-Grenzwert	Messpunkt	Summe der KBE	Anz. d. Messungen	KBE Pro Messung	Mittelwert von %-Grenzwert
5	Kopfhaube	2444	4012	0,609	3,08%
6	Handgelenk links	556	4010	0,139	2,81%
7	Mundschutz	1724	4011	0,430	2,14%
8	Fingerprint links	791	9646	0,082	1,77%
9	Fingerprint rechts	752	9646	0,078	1,72%
10	Schuhe links	1186	4010	0,296	1,33%
11	Schuhe rechts	1023	4011	0,255	1,27%
12	Reinraumschutzbrille	131	1984	0,066	0,33%

Die höchste Keimbelastung ist im Bereich des Oberkörper zu finden. Im Vergleich zur mittleren Keimbelastung, die bei 3,63% liegt, werden am Oberkörper fast 5x mehr Keime gefunden (Faktor 4,97).

Vermutlich gehen vom Kopf und Gesicht (die ja die unbedeckten Hautflächen darstellen) die größte Keimbelastung aus. Schon der normale Atem enthält Millionen Keime. Aus diesem Grund sind die Prüfpunkte des Monitoring im Bereichs des Oberkörpers konzentriert (siehe Abbildung 5)

Der Grund, warum der Oberkörper in der Keimbelastung noch vor dem Mundschutz und Kopfhaube liegt, ist das Umkleideprozedere.

Reinraumkleidung für Klasse B wird sterilisiert und in „Steribags“<sup>10</sup> verpackt in der Schleuse ausgelegt. Während des Umkleidens muss die Person, die sich umkleidet, den Overall aus der Tüte herausziehen. Dies wird zwar mit Handschuhen durchgeführt, allerdings kann während des Umkleidens keine aseptische Bedingung herrschen. Um den Overall möglichst ohne Bodenberührung anzuziehen muss er am Oberkörper angefasst werden um einzusteigen und zu ihn zu verschließen.

Dadurch werden im Bereich des Oberkörpers während des Umkleidens mehr Keime auf die sterilisierte Kleidung übertragen als an anderen Stellen.

Handgelenke und Arme liegen im Mittelfeld mit rund 3% Keimbelastung.

Die Fingerprints sind mit ca. 1,7% Keimbelastung besser als der Durchschnitt. Regelmäßige Händedesinfektion trägt wohl zu diesem Wert bei.

Nicht überraschend ist die Reinraumbrille. Diese wird ebenfalls sterilisiert verwendet und bietet aufgrund der glatten Oberfläche nur wenig Lebensraum für

<sup>10</sup> Spezielle sterile Verpackung. Die Steribag-Folie ist dampfdurchlässig, so dass der Inhalt in der geschlossenen Tüte sterilisiert werden kann.

Mikroorganismen.

Diese geringen Keimzahlen sind im Vergleich zu der natürlichen Hautkeimflora bemerkenswert. Nach [Seyfarth (2002-4)] liegt sie zwischen  $10^2$  und  $10^6$  KBE pro  $\text{cm}^2$ . Das macht deutlich, warum das Umkleideprozedere regelmäßig geübt und nachgewiesen werden muss.

## Auswertung der identifizierten Mikroorganismen an Reinraumpersonal in Reinheitsklasse B

### Datenselektion

#### SQL-Statement:

```
SELECT      Daten.M_Gruppe,      Keim_ident.[Name      des      Keims],
Count(Keim_ident.id_Ergebnisse) AS Anz, Count(Keim_ident.Anzahl) AS Anzahl,
Sum(Keim_ident.Anzahl) AS Summe, First(Def_Keim.Pathogen) AS [ErsterWert
von Pathogen], First(Def_Keim.Form) AS [ErsterWert von Form],
First(Def_Keim.Sauerstofftoleranz) AS [ErsterWert von Sauerstofftoleranz],
First(Def_Keim.Gramverhalten) AS [ErsterWert von Gramverhalten],
First(Def_Keim.Familie) AS [ErsterWert von Familie], First(Def_Keim.Vorkommen)
AS [ErsterWert von Vorkommen], First(Def_Keim.Leitkeim) AS [ErsterWert von
Leitkeim]

FROM (Daten INNER JOIN Keim_ident ON Daten.ID_Ergebnis =
Keim_ident.id_Ergebnisse) INNER JOIN Def_Keim ON Keim_ident.[Name des
Keims] = Def_Keim.[Name des Keims]

GROUP BY Daten.M_Gruppe, Keim_ident.[Name des Keims]

HAVING (((Daten.M_Gruppe)="4") AND ((Count(Keim_ident.Anzahl))>3))

ORDER BY Count(Keim_ident.Anzahl) DESC;
```

Es wurden alle Identifizierungen aus dem Personalmonitoring (M\_Gruppe 4) selektiert. Diese Selektion wurde nach Namen der Mikroorganismen gruppiert, je Gruppe die Summe und die Häufigkeit aller Identifizierungen errechnet. Keime, die weniger als 3 Mal identifiziert worden sind, sind ausgeschlossen. Zusätzlich werden charakteristische Eigenschaften des Keims angezeigt.

#### Qualitätssicherung der Datenselektion:

Die Qualitätssicherung erfolgte indirekt im Vergleich von verschiedenen Datenselektionen. Immer gleiche Rohdaten wurden unterschiedlich zusammengefasst (gruppiert nach Namen des Keims, Form und Keimfamilie). Jede dieser Datenselektionen erbrachte das 5.528 Identifizierungen durchgeführt worden sind. Da diese Daten exakt übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektionen richtig erfolgt sind.

#### Selektionsergebnis in der Übersicht

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Insgesamt sind 5.528 Identifizierungen von Keimen am Reinraumpersonal durchgeführt worden. Die Differenz von 112 Identifizierungen bezieht sich auf Keime, die weniger als 4 mal im Untersuchungszeitraum identifiziert wurden (also nur sehr selten auftreten und daher nicht als typischer Keim angesehen werden können).

### Quote der Keimidentifizierung

Bei 49.957 KBE-Messungen wurden 5.528 Identifizierungen durchgeführt. Das ist eine Quote von 9%. Aufgrund der Vielzahl der Messungen kann davon ausgegangen werden, dass das Keimspektrum repräsentativ ist.

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen (Identifizierungen)
Liste der Keimidentifizierungen am Reinraumpersonal	85	5416

### Auflistung der am häufigsten identifizierten Mikroorganismen bei Reinraumpersonal

Insgesamt wurden 85 unterschiedliche Keime identifiziert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier nur 20 Ränge aufgelistet.

Tabelle 15: Liste der Keimidentifizierungen an Reinraumpersonal

Rang Anzahl	Rang Häufigkeit	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl	Form	Sauerstofftoleranz	Gramverhalt.	Familie	Vorkommen
1	1	<i>Micrococcus luteus</i>	1368	7479	Tetraden	Obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
3	2	<i>Staphylococcus</i> spp.	835	1573	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
6	3	<i>Corynebacterium</i> spp.	498	857	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
2	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	494	1915	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
4	5	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	256	1067	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
5	6	<i>Staphylococcus hominis</i>	255	879	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
7	7	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	165	736	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
8	8	<i>Staphylococcus capitis</i>	119	517	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
11	9	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	110	351	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram negativ	Neisseriaceae	Boden/Wasser

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Rang Anzahl	Rang Häufigkeit	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl	Form	Sauerstofftoleranz	Gramverhalt.	Familie	Vorkommen
10	10	Staphylococcus warneri	109	365	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
9	11	Corynebacterium macginleyi	92	510	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
14	12	Corynebacterium group G	69	215	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
23	13	Micrococcus spp.	65	94	Tetraden	Obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
24	14	Bacillus pumilus	62	86	Stäbchen	Obligat aerob	Gram positiv	Bacillaceae	Umwelt
25	15	Bacillus sphaericus	53	80	Stäbchen	Obligat aerob	Gram positiv	Bacillaceae	Umwelt
15	16	Corynebacterium propinquum	48	210	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
29	17	Bacillus spp.	43	70	Stäbchen	Obligat aerob	Gram positiv	Bacillaceae	Luft
22	18	Staphylococcus saprophyticus	39	100	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
17	19	Gramnegative Stäbchen	35	140	Stäbchen	Unbekannt	Gram negativ	Unbekannt	Unbekannt
31	20	Moraxella spp.	27	63	Stäbchen	Obligat aerob	Gram negativ	Neisseriaceae	Boden/Wasser

Um die Liste der identifizierten Keime mit anderen Prüforten zu vergleichen werden nur die Ränge berücksichtigt, die 80% der Anzahl der Identifizierungen ausmachen.

Tabelle 16: Liste der Keimidentifizierungen von Reinraumpersonal (häufigsten 80%)

Rang Anzahl	Rang Häufigkeit	% der Identifizierung	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl
1	1	25,26%	Micrococcus luteus	1368	7479
3	2	40,68%	Staphylococcus spp.	835	1573
6	3	49,87%	Corynebacterium spp.	498	857
2	4	58,99%	Staphylococcus epidermidis	494	1915
4	5	63,72%	Staphylococcus haemolyticus	256	1067
5	6	68,43%	Staphylococcus hominis	255	879
7	7	71,47%	Corynebacterium jeikeium	165	736
8	8	73,67%	Staphylococcus capitis	119	517
11	9	75,70%	Acinetobacter lwoffii	110	351

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Rang Anzahl	Rang Häufigkeit	% der Identifizierung	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl
10	10	77,71%	Staphylococcus warneri	109	365
9	11	79,41%	Corynebacterium macginleyi	92	510
14	12	80,69%	Corynebacterium group G	69	215

Diese 12 Spezies überschreiten 80% der häufigsten Identifizierungen an Reinraumpersonal. Bis auf Position 9 (Acinetobacter lwoffii / Boden oder Wasser) kommen alle typischerweise auf Haut oder Schleimhäuten vor. Alle sind im Gramverhalten positiv.

Das gesamte Spektrum der Keimidentifizierungen verteilen sich nach Form und Gramverhalten folgendermaßen:

Tabelle 17: Keimidentifizierungen von Reinraumpersonal in Form und Gramverhalten

Merkmal	Anzahl	Summe	Häufigkeit	Anzahl
Kokke +	3797	14762	68,69%	72,94%
Stäbchen +	1304	3946	23,59%	19,50%
Stäbchen -	390	1452	7,05%	7,17%
Pilz	36	78	0,65%	0,39%
Kokke -	1	1	0,02%	0,00%

Gruppiert nach Familien ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 18: Keimidentifizierungen von Reinraumpersonal gruppiert nach Keimfamilien

Familie	Anzahl	Summe	Häufigkeit in %	Kumuliert
Micrococcaceae	3761	14666	68,04%	68,04%
Corynebacteriaceae	1090	3583	19,72%	87,75%
Bacillaceae	231	437	4,18%	91,93%
Neisseriaceae	174	605	3,15%	95,08%
Pseudomonaceae	136	626	2,46%	97,54%
Unbekannt	77	242	1,39%	98,93%
Pasteurellaceae	22	37	0,40%	99,33%
Streptococcaceae	19	22	0,34%	99,67%

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Familie	Anzahl	Summe	Häufigkeit in %	Kumuliert
Schimmelpilze	7	7	0,13%	99,80%
Enterobacteriaceae	3	5	0,05%	99,86%
Aeromonadaceae	3	4	0,05%	99,91%
Nonfermenter	2	2	0,04%	99,95%
Hefepilze	2	2	0,04%	99,98%
Vibronaceae	1	1	0,02%	100,00%

**Zusammenfassung Keimidentifizierung Personalmonitoring:**

Im Personalmonitoring kommen überwiegend gram positive Keime vor (über 90%). Die Spezies der beiden Familien Micrococcaceae und Corynebacteriaceae bilden über 87% der Identifizierungen. Häufigster Keim mit über 25% ist *Micrococcus luteus*. Pilze sind zu 0,65% bei Personen zu finden.

**5.2.2 Luft**

Für die typischen Luftkeime wurden alle Keimidentifizierungen von KBE-Messungen der Luft ausgewertet.

Zuerst wird (wie bei Personen) die durchschnittliche KBE-Belastung ermittelt:

**KBE-Belastung von Reinraumlufte gruppiert nach Reinraumklassen:****SQL-Statement:**

```
SELECT    Daten.Reinheitsklasse,      Sum(Daten.Ergebnis)      AS    KBE,
Count(Daten.Ergebnis) AS Anz, [KBE]/[Anz] AS KBE_Pro, Avg(Daten.Proz_Spez)
AS [Mittelwert von Proz_Spez]
```

```
FROM Daten
```

```
WHERE (((Daten.Stelle)="Luft") AND ((Daten.Ergebnisklasse)=1))
```

```
GROUP BY Daten.Reinheitsklasse
```

```
HAVING ((Not (Daten.Reinheitsklasse)="LF"));
```

Es wurden alle Luft- (Stelle = Luft) KBE-Messungen (Ergebnisklasse 1) selektiert. Für diese Selektion wurde nach Reinheitsklassen gruppiert, je Gruppe die Summe aller gemessenen KBEs, die Anzahl der durchgeführten Analysen sowie der durchschnittliche Abstand zur oberen Grenze in % berechnet. Die Reinheitsklasse

“LF” wurde ausgenommen<sup>11</sup>.

### Qualitätssicherung der Datenselektion:

Zur Überprüfung der Datenselektion wurde die Anzahl der vom SQL-Statement gelieferten Datensätze verwendet. Da 4 Reinheitsklassen vorhanden sind, müssen genau 4 Datensätze im Ergebnis geliefert werden. Da dies der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektion richtig erfolgt ist.

### Selektionsergebnis in der Übersicht

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen
KBE Belastung von Reinraumluft	4	63.207

### Auswertung der Datenselektion:

Rang % vom Grenzwert	Reinheitsklasse	Summe der KBE	Anzahl der Messungen	KBE pro Messung	% vom Grenzwert
1	B	37121	39012	0,95	9,52%
2	D	101386	5560	18,23	9,06%
3	C	66949	8895	7,53	7,54%
4	A	370	9740	0,04	1,90%

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Grenzwerte (ausgedrückt als % vom Grenzwert), wird in der Reinheitsklasse A im untersuchten Produktionsumfeld mit 1,9% die beste KBE Belastung erreicht.

Die Grenzwerte für KBE-Belastung in Reinheitsklasse B einzuhalten, ist die anspruchsvollste Aufgabe. Hier kommen viele Personalstunden und sehr enge Grenzwerte zusammen. Obwohl in dieser Klasse weniger als 1 Keim pro Messung gemessen wird, entspricht dieser Wert rund 10% vom Grenzwert.

Klasse D hat zwar durchschnittlich die meisten Keime pro Messung (18,23 KBE pro Messung) und damit ca. 19 mal mehr Keime als die Klasse B, aber die Qualität des KBE-Niveaus (gemessen in % von der jeweiligen Aktionsgrenze), ist die Klasse D um einen halben Prozentpunkt besser als die Klasse B.

Die Klasse C liegt ungefähr auf dem Mittelwert (Durchschnitt 7,00%) der KBE-Belastung

<sup>11</sup> Die Reinraumklasse LF wird für LF-Boxen in Klasse C Abfüllräumen verwendet. Diese Klasse entspricht keinem Arzneibuch und stellt einen Sonderfall der Klasse C dar. Da hier die Partikelgrenzen der Klasse A und die KBE-Grenzen der Klasse C gelten, kann diese künstliche Reinheitsklasse nicht den offiziellen Arzneibuchklassen verglichen werden.

## Auswertung der Identifizierten Mikroorganismen von Reinraumluft

### Datenselektion

#### SQL-Statement:

```

SELECT Keim_ident.[Name des Keims], Count(Keim_ident.Anzahl) AS Häufigkeit,
Sum(Keim_ident.Anzahl) AS Anzahl, First(Def_Keim.Form) AS Form,
First(Def_Keim.Sauerstofftoleranz) AS Sauerstofftoleranz,
First(Def_Keim.Gramverhalten) AS Gramverhalten, First(Def_Keim.Familie) AS
Familie, First(Def_Keim.Vorkommen) AS Vorkommen

FROM (Daten INNER JOIN Keim_ident ON Daten.ID_Ergebnis =
Keim_ident.id_Ergebnisse) INNER JOIN Def_Keim ON Keim_ident.[Name des
Keims] = Def_Keim.[Name des Keims]

WHERE (((Daten.Stelle)="luft") AND ((Daten.Ergebnisklasse)=1))

GROUP BY Keim_ident.[Name des Keims]

HAVING (((Count(Keim_ident.Anzahl))>3))

ORDER BY Count(Keim_ident.Anzahl) DESC;

```

Es wurden alle Identifizierungen aus dem Luft Monitoring (Stelle = Luft / Ergebnisklasse = 1) selektiert. Diese Selektion wurde nach Namen der Mikroorganismen gruppiert je Gruppe die Summe und die Häufigkeit aller Identifizierungen errechnet. Keime, die weniger als 3 Mal identifiziert worden sind, sind ausgeschlossen. Zusätzlich werden charakteristische Eigenschaften des Keims angezeigt.

#### Qualitätssicherung der Datenselektion:

Die Qualitätssicherung erfolgte indirekt im Vergleich von verschiedenen Datenselektionen. Immer gleiche Rohdaten wurden unterschiedlich zusammengefasst (Gruppiert nach Namen der Keimsspezies, Form und Keimfamilie). Jede dieser Datenselektionen erbrachte, dass 10.599 Identifizierungen durchgeführt worden sind. Da diese Daten exakt übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektionen richtig erfolgt sind.

#### Selektionsergebnis in der Übersicht

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen (Identifizierungen)
Liste der Keimidentifizierungen am Reinraumpersonal	115	10.599

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Insgesamt sind 10.730 Identifizierungen von Keimen am Reinraumpersonal durchgeführt worden. Die Differenz von 131 Identifizierungen bezieht sich auf Keime, die weniger als 4 Mal im Untersuchungszeitraum identifiziert wurden (also nur sehr selten auftreten und daher nicht als typischer Keim angesehen werden können).

### Quote der Keimidentifizierung

Bei 63.207 KBE-Messungen wurden 10.730 Identifizierungen durchgeführt. Das ist eine Quote von 17%. Aufgrund der Vielzahl der Messungen kann davon ausgegangen werden, dass das Keimspektrum repräsentativ ist.

### Auflistung der aus Reinraumluft identifizierten Mikroorganismen

Die Datenselektion ergibt eine Rangliste von 115 Mikroorganismen, die mehr als 3 Mal identifiziert worden sind. Für eine handlichere Darstellung werden von der 115 Positionen umfassenden Liste die Positionen dargestellt, die zusammen mehr als 80% der Häufigkeit ausmachen.

Tabelle 19: Liste der am häufigsten identifizierten Mikroorganismen aus Reinraumluft

Rang Anzahl	Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl	Form	Sauerstofftoleranz	Gramverhalten	Familie	Vorkommen
1	1	34,41 %	<i>Micrococcus luteus</i>	3647	52773	Tetraden	Obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
3	2	48,25 %	<i>Staphylococcus</i> spp.	1467	2257	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
7	3	53,25 %	<i>Corynebacterium</i> spp.	530	984	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
6	4	58,11 %	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	515	1631	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
5	5	62,85 %	<i>Staphylococcus hominis</i>	502	1662	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
4	6	67,09 %	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	450	1910	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
2	7	70,66 %	Pilz nicht klassifiziert	378	2351	unbekannt	Obligat aerob	Ohne (Pilz)	unbekannt	Umwelt
9	8	73,30 %	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	280	852	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram negativ	Neisseriaceae	Boden/Wasser
10	9	75,32 %	<i>Micrococcus</i> spp.	214	790	Tetraden	Obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
13	10	76,91 %	<i>Staphylococcus warneri</i>	169	535	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
22	11	78,21 %	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	137	289	Stäbchen	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
8	12	79,39 %	<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i>	126	960	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
23	13	80,32 %	<i>Staphylococcus capitis</i>	98	254	Kokken	Fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Die restlichen 102 Ränge machen weniger als 20% der Häufigkeit der Identifizierung aus. Die dargestellten 13 Positionen zeigen die am häufigsten vorkommenden Keime in Reinraumluft (<80%).

Im gesamten Spektrum der Keimidentifizierungen verteilen sich nach Form und Gramverhalten folgendermaßen:

Tabelle 20: Keimidentifizierungen von Reinraumluft in Form und Gramverhalten

Merkmal	Anzahl	Summe	Häufigkeit	Anzahl
Kokke +	7757	66852	72,29%	85,85%
Stächen +	1285	3430	11,98%	4,40%
Stäbchen -	1027	3563	9,57%	4,58%
Pilz	658	4024	6,13%	5,17%
Kokke -	3	3	0,03%	0,00%

Gruppiert nach Familien ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 21: Keimidentifizierungen von Reinraumluft gruppiert nach Keimfamilien

Familie	Häufigkeit	Anzahl	Häufigkeit in %	kumuliert
Micrococcaceae	7663	66615	71,42%	71,42%
Corynebacteriaceae	1122	2716	10,46%	81,87%
unbekannt	649	3868	6,05%	87,92%
Pseudomonaceae	417	1648	3,89%	91,81%
Neisseriaceae	407	1262	3,79%	95,60%
Bacillaceae	229	864	2,13%	97,74%
Schimmelpilze	146	679	1,36%	99,10%
Pasteurellaceae	34	71	0,32%	99,41%
Streptococcaceae	24	83	0,22%	99,64%
Hefepilze	13	21	0,12%	99,76%
Vibronaceae	10	14	0,09%	99,85%
Nonfermenter	6	17	0,06%	99,91%
Enterobacteriaceae	5	7	0,05%	99,95%
Aeromonadaceae	5	7	0,05%	100,00%

## Zusammenfassung Keimidentifizierung Luft

Im Reinraumlufthmonitoring kommen überwiegend gram positive Keime vor (über 80%). Die Spezies der beiden Familien Micrococcaceae und Corynebacteriaceae bilden über 80% der Identifizierungen. Häufigster Keim mit über 34% ist *Micrococcus luteus*. Pilze sind mit 6 % Häufigkeit fast 10x häufiger als bei Personen zu finden. Der Anteil der gramnegativen Organismen (überwiegend Stäbchen) ist mit 10,60 % ebenfalls gegenüber dem Personenmonitoring (7,07 %) erhöht.

### 5.2.3 Oberflächen

Für die typischen Mikroorganismen auf Oberflächen wurden alle Keimidentifizierungen von KBE-Messungen an Wänden, Boden oder Maschinenoberflächen ausgewertet.

Zuerst erfolgt die Darstellung der KBE-Belastung von Reinraumoberflächen

#### **KBE-Belastung von Reinraumoberflächen gruppiert nach Reinraumklassen:**

##### **SQL-Statement:**

```
SELECT    Daten.Reinheitsklasse,      Sum(Daten.Ergebnis)      AS    KBE,
Count(Daten.Ergebnis) AS Anz, [KBE]/[Anz] AS KBE_Pro, Avg(Daten.Proz_Spez)
AS [Mittelwert von Proz_Spez]

FROM Daten

WHERE (((Daten.Ergebnisklasse)=1) AND ((Daten.M_Gruppe)="2"))

GROUP BY Daten.Reinheitsklasse

HAVING (((Daten.Reinheitsklasse)<>"LF"));
```

Es wurden alle KBE-Messungen (Ergebnisklasse 1) außer der Luftmessungen (Stelle = Luft) des Umgebungsmonitorings (M\_Gruppe =2) selektiert. Für diese Selektion wurde nach Reinheitsklassen gruppiert, je Gruppe die Summe aller gemessenen KBEs, die Anzahl der durchgeführten Analysen sowie der durchschnittliche Abstand zur oberen Grenze in % berechnet. Die Reinheitsklasse "LF" wurde ausgenommen<sup>12</sup>.

#### **Qualitätssicherung der Datenselektion:**

Zur Überprüfung der Datenselektion wurde die Anzahl der vom SQL-Statement gelieferten Datensätze verwendet. Da 4 Reinheitsklassen vorhanden sind, müssen genau 4 Datensätze im Ergebnis geliefert werden. Da dies der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektion richtig erfolgt ist

<sup>12</sup> Die Reinraumklasse LF wird für LF-Boxen in Klasse C in Abfüllräumen verwendet. Diese Klasse entspricht keinem Arzneibuch und stellt einen Sonderfall der Klasse C dar. Da hier die Partikelgrenzen der Klasse A und die KBE-Grenzen der Klasse C gelten, kann diese künstliche Reinheitsklasse nicht mit den offiziellen Arzneibuchklassen verglichen werden.

**Selektionsergebnis in der Übersicht**

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen
KBE Belastung von Reinraumluft	4	69.341

**Auswertung der Datenselektion:**

Rang % vom Grenzwert	Reinheitsklasse	Summe der KBE	Anzahl der Messungen	KBE pro Messung	% vom Grenzwert
4	A	327	5868	0,06	1,84%
3	B	13323	52653	0,25	3,48%
2	C	13623	6498	2,10	8,61%
1	D	24885	4322	5,76	9,48%

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Grenzwerte (ausgedrückt als % vom Grenzwert), wird in der Reinheitsklasse A im untersuchten Produktionsumfeld mit 1,84% die beste KBE Belastung erreicht.

Anders als z.B. bei Luftkeimen steigt mit der Reinraumklasse auch in selber Richtung die Qualität der KBE-Belastung.

Sowohl absolut (in KBE pro Messung) als auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Grenzen bleibt die Reihenfolge A, B, C, D erhalten.

## Auswertung der Identifizierten Mikroorganismen von Reinraumoberflächen

### Datenselektion

#### SQL-Statement:

```
SELECT Keim_ident.[Name des Keims], Count(Keim_ident.Anzahl) AS Häufigkeit,
Sum(Keim_ident.Anzahl) AS Anzahl, First(Def_Keim.Form) AS Form,
First(Def_Keim.Sauerstofftoleranz) AS Sauerstofftoleranz,
First(Def_Keim.Gramverhalten) AS Gramverhalten, First(Def_Keim.Familie) AS
Familie, First(Def_Keim.Vorkommen) AS Vorkommen

FROM (Daten INNER JOIN Keim_ident ON Daten.ID_Ergebnis =
Keim_ident.id_Ergebnisse) INNER JOIN Def_Keim ON Keim_ident.[Name des
Keims] = Def_Keim.[Name des Keims]

WHERE (((Daten.Ergebnisklasse)=1) AND ((Daten.M_Gruppe)="2") AND (Not
(Daten.Stelle)="luft"))

GROUP BY Keim_ident.[Name des Keims]

HAVING (((Count(Keim_ident.Anzahl))>3))

ORDER BY Count(Keim_ident.Anzahl) DESC;
```

Es wurden alle KBE-Messungen (Ergebnisklasse 1) außer der Luftmessungen (Stelle = Luft) des Umgebungsmonitorings (M\_Gruppe =2) selektiert.

Diese Selektion wurde nach Namen der Mikroorganismen gruppiert, je Gruppe die Summe und die Häufigkeit aller Identifizierungen errechnet. Keime, die weniger als 3 Mal identifiziert worden sind, sind ausgeschlossen. Zusätzlich werden charakteristische Eigenschaften des Keims angezeigt.

#### Qualitätssicherung der Datenselektion:

Die Qualitätssicherung erfolgte indirekt im Vergleich von verschiedenen Datenselektionen. Immer gleiche Rohdaten wurden unterschiedlich zusammengefasst (gruppiert nach Namen der Keimspezies, Form und Keimfamilie). Jede dieser Datenselektionen erbrachte dass 10.599 Identifizierungen durchgeführt worden sind. Da diese Daten exakt übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektionen richtig erfolgt sind.

#### Selektionsergebnis in der Übersicht

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen (Identifizierungen)
Liste der Keimidentifizierungen an Reinraumpersonal	88	6.065

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Insgesamt sind 6196 Identifizierungen von Keimen an Reinraumbooberflächen durchgeführt worden. Die Differenz von 131 Identifizierungen bezieht sich auf Keime, die weniger als 4 Mal über im Untersuchungszeitraum identifiziert wurden (also nur sehr selten auftreten und daher nicht als typischer Keim angesehen werden können).

### Quote der Keimidentifizierung

Bei 69.341 KBE-Messungen wurden 6.196 Identifizierungen durchgeführt. Das ist eine Quote von 8,94%. Aufgrund der Vielzahl der Messungen kann davon ausgegangen werden, dass das Keimsppektrum repräsentativ ist.

### Auflistung der von Reinraumbooberflächen identifizierten Mikroorganismen

Die Datenselektion ergibt eine Rangliste von 88 Mikroorganismen, die mehr als 3 Mal identifiziert worden sind. Für eine handlichere Darstellung werden von der 88 Positionen umfassenden Liste die Positionen dargestellt, die zusammen mehr als 80% der Häufigkeit ausmachen.

Tabelle 22: Liste der am häufigsten identifizieren Mikroorganismen von Reinraumbooberflächen

Rang Anzahl	Rang Häufig- keit	% der Häufig- keit	Name des Keims	Häu- figket	Anzahl	Form	Sauer- stofftole- reanz	Gram- verhal- ten	Familie	Vorkommen
1	1	23,03%	<i>Micrococcus luteus</i>	1397	4831	Tetraden	obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
3	2	41,27%	<i>Staphylococcus</i> spp.	1106	1660	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
4	3	52,15%	<i>Corynebacte- rium</i> spp.	660	1605	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteria- ceae	Haut/ Schleimhaut
2	4	58,83%	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	405	2260	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
6	5	64,34%	<i>Staphylococcus</i> <i>hominis</i>	334	1298	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
7	6	68,92%	<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i>	278	1284	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
12	7	72,65%	<i>Corynebacte- rium jeikeium</i>	226	674	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteria- ceae	Haut/ Schleimhaut
8	8	75,09%	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i>	148	1180	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
15	9	76,49%	<i>Staphylococcus</i> <i>capitis</i>	85	526	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
24	10	77,82%	<i>Micrococcus</i> spp.	81	229	Tetraden	obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
21	11	79,11%	<i>Bacillus</i> spp.	78	306	Stäbchen	obligat aerob	Gram positiv	Bacillaceae	Luft
18	12	80,38%	<i>Corynebacte- rium macginleyi</i>	77	380	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteria- ceae	Haut/ Schleimhaut

Die restlichen 76 Ränge machen weniger als 20% der Häufigkeit der

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Identifizierung aus. Die dargestellten 12 Positionen zeigen die am häufigsten vorkommenden Keime in Reinraumluft (<80%).

Im gesamten Spektrum der Keimidentifizierungen verteilen sich nach Form und Gramverhalten folgendermaßen:

Tabelle 23: Keimidentifizierungen von Reinraumboberflächen in Form und Gramverhalten

Merkmal	Anzahl	Summe	Häufigkeit	Anzahl
K+	4176	14389	67,40%	51,27%
S+	1608	8824	25,95%	31,44%
S-	318	4389	5,13%	15,64%
P	92	452	1,48%	1,61%
K-	1	8	0,02%	0,03%
Fehlmessung <sup>13</sup>	1	1	0,02%	0,00%

Gruppiert nach Familien ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 24: Keimidentifizierungen von Reinraumluft gruppiert nach Keimfamilien

Familie	Häufigkeit	Anzahl	Häufigkeit in %	kumuliert
Micrococcaceae	4147	14289	66,93%	66,93%
Corynebacteriaceae	1316	5689	21,24%	88,17%
Bacillaceae	305	3172	4,92%	93,09%
Pseudomonaceae	123	2263	1,99%	95,08%
Unbekannt	119	856	1,92%	97,00%
Neisseriaceae	106	1519	1,71%	98,71%
Schimmelpilze	30	123	0,48%	99,19%
Streptococcaceae	14	54	0,23%	99,42%
Pasteurellaceae	11	10	0,18%	99,60%
Hefepilze	11	61	0,18%	99,77%
Vibronaceae	6	17	0,10%	99,87%
Enterobacteriaceae	3	3	0,05%	99,92%
Nonfermenter	2	4	0,03%	99,95%

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Familie	Häufigkeit	Anzahl	Häufigkeit in %	kumuliert
Aeromonadaceae	2	2	0,03%	99,98%
Fehlmessung <sup>13</sup>	1	1	0,02%	100,00%

### Zusammenfassung Keimidentifizierung Luft

Auch im Monitoring von Reinraumoberflächen kommen überwiegend gram positive Keime vor (über 82%). Die Spezies der beiden Familien Micrococcaceae und Corynebacteriaceae bilden über 88% der Identifizierungen. Häufigster Keim mit über 23% ist *Micrococcus luteus*.

#### 5.2.4 Wasser (WFI, GE-Wasser)

Für die typischen Mikroorganismen in den beiden Wasserqualitäten WFI und GE-Wasser wurden alle Keimidentifizierungen von KBE-Messungen dieser Medien ausgewertet.

Da diese Medien (besonders WFI) eine besonders hohe mikrobiologische Reinheit haben, werden nur sehr wenige Keime im Rahmen des mikrobiologischen Monitorings gefunden.

#### KBE-Belastung von WFI und GE-Wasser:

##### SQL-Statement:

```
SELECT Daten.Stelle, Sum(Daten.Ergebnis) AS KBE, Count(Daten.Ergebnis) AS
Anz, [KBE]/[Anz] AS KBE_Pro, Avg(Daten.Proz_Spez) AS [% vom Grenzwert]
FROM Daten
WHERE (((Daten.Ergebnisklasse)=1) AND ((Daten.M_Gruppe)="1"))
GROUP BY Daten.Stelle
HAVING (((Daten.Stelle)="WFI" Or (Daten.Stelle)="GE-Wasser"))
ORDER BY Daten.Stelle;
```

Es wurden alle KBE-Messungen (Ergebnisklasse 1) der Stellen "WFI" oder "GE-Wasser" des Medienmonitorings (M\_Gruppe =1) selektiert. Für diese Selektion wurde nach Reinheitsklasse gruppiert, je Gruppe die Summe aller gemessenen KBEs, die Anzahl der durchgeführten Analysen sowie der durchschnittliche

<sup>13</sup> In diesem einen Fall stellte sich heraus, dass es sich nicht um eine Kolonie (KBE) sondern um einen Fremdkörper auf der Agarschale handelte. Um eine vollständige Übereinstimmung mit den Rohdaten zu gewährleisten, ist dieser Messwert nicht gelöscht worden.

Abstand zur oberen Grenze in % berechnet.

### Qualitätssicherung der Datenselektion:

Zur Überprüfung der Datenselektion wurde die Anzahl der vom SQL-Statement gelieferten Datensätze verwendet. Da 2 Stellen selektiert sind (GE-Wasser und WFI), müssen genau 2 Datensätze im Ergebnis geliefert werden. Da dies der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektion richtig erfolgt ist.

### Selektionsergebnis in der Übersicht

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen
KBE Belastung von GE-Wasser und WFI	2	13.068

### Auswertung der Datenselektion:

Rang	Medium	Summe der KBE	Anzahl der Messungen	KBE pro Messung	% vom Grenzwert
1	GE-Wasser	4224	1214	3,48	3,51%
2	WFI	1748	11854	0,15 <sup>14</sup>	1,47%

Es ist deutlich zu erkennen, dass WFI mit der konsequenten Heißlagerung und -entnahme trotz enger Grenzen eine bessere mikrobiologische Qualität als gereinigtes Wasser aufweist.

GE-Wasser wird in 2 Qualitäten verwendet:

Stelle	Methode	Summe der KBE	Anzahl der Messungen	KBE pro Messung	% vom Grenzwert
GE-Wasser	MBF 10/100ml	3 <sup>15</sup>	696	0,00	0,04%
GE-Wasser	MBF 100/ml	4221	518	8,15	8,15%

Die erste Qualität wird wie WFI heiß gelagert und unterliegt den gleichen Spezifikationen und Grenzen wie WFI.

<sup>14</sup> Die KBE-Messung aus WFI wird aus 100ml durchgeführt. Um einen Wert pro 1ml zu erhalten, muss das Ergebnis durch 100 geteilt werden.

<sup>15</sup> Von diesen 3 KBE liegt keine Keimidentifizierung vor. Somit stammen alle Keimidentifizierungen aus GE-Wasser, das bei Raumtemperatur verwendet wird.

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Die 2. Qualität ist kalt gelagert (Raumtemperatur) und wird für die Keimbelastung nach Trinkwasserspezifikation und für die chemische Qualität (z.B. Leitfähigkeit, TOC, pH-Wert) nach WFI-Qualität geprüft.

Beide Medien werden in Ring-Systemen gespeichert, in denen das Medium in einem geschlossenem System ständig im Kreis gepumpt wird. Für beide Qualitäten sind vergleichbar viele Messungen durchgeführt worden.

Das heiße GE-Wasser ist in chemischer und mikrobiologischer Qualität mit dem WFI vergleichbar. Das zeigt sich auch im USP, nach dem die Herstellung durch Umkehrosiose und Heißlagerung als Herstellungsmethode für WFI zulässig ist [USP 28 <1231> „Water for pharmaceutical Purposes“]. Genau dies ist nach Pharm. Eur. verboten [EP 2005 <Water for injection>]. Hier ist eine Destillation zwingend für die Herstellung von WFI

Obwohl sich kaltes GE-Wasser und heißes WFI in ihrer chemischen Qualität (Reinheit) kaum unterscheiden, ist die Keimbelastung im kalt gelagerten Medium deutlich höher. (8,5KBE pro ml bei RT / 0,0015 KBE pro ml bei Heißlagerung) .

*GE-Wasser und WFI im Vergleich:*

	GE-Wasser				WFI		
	Wert	Einheit	Anzahl	% vom Grenzwert	Wert	Anzahl	% vom Grenzwert
<b>Leitfähigkeit<sup>16</sup></b>	36,65	% vom Grenzwert	709	36,65%	31,77	10444	31,77%
<b>Partikel größer 10µm</b>	0,82	P/ml	167	1,63%	0,68	532	2,71%
<b>Partikel größer 25µm</b>	0,02	P/ml	167	0,38%	0,02	532	0,61%
<b>TOC</b>	75,50	ppb	595	15,08%	72,53	10353	14,51%
<b>pH-Wert</b>	6,08	pH	71		6,11	118	

Im Vergleich ist WFI etwas „sauber“, was an den niedrigeren Werten für TOC und der Leitfähigkeit abzulesen ist. Beide erfüllen die strengen Spezifikationen für WFI (was den chemischen Teil angeht). Aufgrund der hohen Reinheit der beiden Medien mit leicht saueren pH-Wert finden aber Mikroorganismen in GE-Wasser und WFI durchaus vergleichbare Lebensbedingungen.

<sup>16</sup> Die Leitfähigkeit wird nach USP gemessen. Da dieses Verfahren mehre Stufen mit unterschiedlichen Grenzen vorschreibt können die Messwerte nicht direkt verglichen werden (da jeder Messwert in einer anderen Stufe erfasst sein könnte). Deshalb werden alle Messergebnisse als %-vom Grenzwert angegeben. Dadurch lassen sich alle Messungen miteinander vergleichen. Der Grenzwert von 36% entspricht etwa einer gemessenen Leitfähigkeit von 0,7µS/cm (ohne Temperaturkorrektur)

Beim Wasser wird die mikrobiologische Qualität vor allem von den Umgebungsbedingungen der Lagerung und dem Design der Ringleitung bestimmt.

Die chemische Qualität wird eher durch die Herstellungsverfahren bestimmt.

Keimidentifizierungen aus kaltem GE-Wasser bilden also ein Modell für Keime, wie sie in WFI-Systemen bei falscher Lagerung (z.B. Temperaturabfall im System) auftreten können. Die kalte Lagerung des GE-Wasser stellt den Worst-Case Fall der heißen WFI-Lagerung dar.

### **Auswertung der identifizierten Mikroorganismen aus Reinstwasser (GE-Wasser und WFI)**

#### **Datenselektion**

##### **SQL-Statement:**

```
SELECT Daten.Stelle, Keim_ident.[Name des Keims], Count(Keim_ident.Anzahl)
AS Häufigkeit, Sum(Keim_ident.Anzahl) AS Anzahl, First(Def_Keim.Form) AS
Form, First(Def_Keim.Sauerstofftoleranz) AS Sauerstofftoleranz,
First(Def_Keim.Gramverhalten) AS Gramverhalten, First(Def_Keim.Familie) AS
Familie, First(Def_Keim.Vorkommen) AS Vorkommen

FROM (Daten INNER JOIN Keim_ident ON Daten.ID_Ergebnis =
Keim_ident.id_Ergebnisse) INNER JOIN Def_Keim ON Keim_ident.[Name des
Keims] = Def_Keim.[Name des Keims]

WHERE (((Daten.Ergebnisklasse)=1) AND ((Daten.M_Gruppe)="1"))

GROUP BY Daten.Stelle, Keim_ident.[Name des Keims]

HAVING (((Daten.Stelle)="WFI" Or (Daten.Stelle)="GE-Wasser"))

ORDER BY Daten.Stelle, Count(Keim_ident.Anzahl) DESC,
Sum(Keim_ident.Anzahl) DESC;
```

Es wurden alle KBE-Messungen (Ergebnisklasse 1) des Medienmonitorings (M\_Gruppe =1) der Stellen WFI oder GE-Wasser selektiert. Diese Selektion wurde nach Namen der Mikroorganismen gruppiert, je Gruppe die Summe und die Häufigkeit aller Identifizierungen errechnet. Da in WFI generell nur sehr wenige Keime gefunden werden, wurden alle Identifizierten (auch die, die weniger als 3 Mal vorkamen) berücksichtigt. Zusätzlich werden charakteristische Eigenschaften des Keims angezeigt.

#### **Qualitätssicherung der Datenselektion:**

Die Qualitätssicherung erfolgte indirekt im Vergleich von verschiedenen Datenselektionen. Immer gleiche Rohdaten wurden unterschiedlich zusammengefasst (gruppiert nach Namen der Keimspezies, Form und Keimfamilie). Jede dieser Datenselektionen zeigte dass für GE-Wasser 101 Identifizierungen durchgeführt worden sind. Da diese Daten exakt übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektionen richtig erfolgt sind.

### Selektionsergebnis in der Übersicht

Thema	Anzahl der Datensätze (unterschiedliche Spezies)	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen (Identifizierungen)
Liste der Keimidentifizierungen aus WFI	12	27
Liste der Keimidentifizierungen aus GE-Wasser	22	101

### Quote der Keimidentifizierung

Die Identifizierungsquote ist bei beiden Medien sehr unterschiedlich. WFI wurde 11.854 Mal auf Keime getestet und nur 27 Mal wurden Keime identifiziert. Dies ist eine Quote von 0,23 %. Es werden durchschnittlich 0,15 KBE pro Messung gefunden. Das heißt bei jeder 6. Messung müssten im Durchschnitt Keime gefunden werden. Allerdings sind die gefundenen Keime nicht gleichmäßig verteilt. Insgesamt wurden bei 20 von 11.854 Messungen Keime gefunden (also nur bei jeder 592,7 ten Messung). Bei einigen Messungen wurden mehrere unterschiedliche Mikroorganismen in einer Probe gefunden, so dass mehr Keime identifiziert wurden als positive KBE-Messungen vorliegen. Das heißt bei nur sehr wenigen Messungen werden sehr viele Keime gefunden. Diese extrem ungleichmäßige Verteilung weist auf potentielle Fehlmessungen hin. (siehe dazu auch Punkt 5.4.1)

Bei GE-Wasser ist die Situation anders. Hier wurden bei 518 KBE-Messungen von bei RT-gelagerten GE-Wasser, 101 Identifizierungen angefertigt. Dies entspricht einer Quote von 20,5%.

Damit kann das Spektrum der Identifizierungen des GE-Wasser als gut abgesichert gelten, während die des WFI aufgrund der wenigen Identifizierungen und extrem ungleichmäßig verteilten Keimbelastung weniger Aussagekraft besitzt.

### Auflistung der aus WFI Identifizierten Mikroorganismen

Die Datenselektion ergibt eine Rangliste von 12 verschiedenen Mikroorganismen. Da diese Liste im Gegensatz zu den anderen Keimspektren sehr kurz ist, werden 100% der Identifizierungen dargestellt (Tabelle 25).

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Tabelle 25: Liste der am häufigsten identifizierten Mikroorganismen aus WFI

Rang Anzahl	Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl	Form	Sauerstofftoleranz	Gramverhalten	Familie	Vorkommen
1	1	25,93%	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	7	731	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Boden/Wasser
2	2	44,44%	Gramnegative Stäbchen	5	356	Stäbchen	unbekannt	Gram negativ	Unbekannt	unbekannt
4	3	59,26%	<i>Micrococcus luteus</i>	4	70	Tetraden	obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	<b>Haut/Schleimhaut</b>
5	4	70,37%	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	12	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram negativ	Neisseriaceae	Boden/Wasser
3	5	74,07%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	105	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Umwelt
6	5	77,78%	<i>Bacillus sphaericus</i>	1	4	Stäbchen	obligat aerob	Gram positiv	Bacillaceae	Umwelt
7	5	81,48%	<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	3	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Vibrionaceae	Boden/Wasser
8	5	85,19%	<i>Kocuria varians</i>	1	2	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	<b>Haut/Schleimhaut</b>
8	5	88,89%	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	2	Kokken	fakultativ anaerob	Gram positiv	Micrococcaceae	<b>Haut/Schleimhaut</b>
8	5	92,59%	<i>Oligella urethralis</i>	1	2	Stäbchen	obligat anaerob	Gram negativ	Neisseriaceae	Fäkalien
12	5	96,30%	<i>Ralstonia pickettii</i>	1	1	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Wasser
12	5	<b>100,00%</b>	Nicht fermentierende, gramnegative Stäbchen	1	1	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Unbekannt	Boden/Wasser

Auffällig ist, dass viele Hautkeime aus WFI identifiziert worden sind.

Tabelle 26: Liste der am häufigsten identifizierten Mikroorganismen aus GE-Wasser

Rang Anzahl	Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl	Form	Sauerstofftoleranz	Gramverhalten	Familie	Vorkommen
2	1	25,74%	Gramnegative Stäbchen	26	599	Stäbchen	Unbekannt	Gram negativ	unbekannt	Unbekannt
1	2	43,56%	<i>Burkholderia pickettii</i>	18	744	Stäbchen	Obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Wasser
6	3	54,46%	<i>Ralstonia pickettii</i>	11	90	Stäbchen	Obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Wasser
4	4	63,37%	Nicht	9	299	unbekannt	Unbe-	Unbe-	unbekannt	Unbekannt

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Rang	Anzahl	Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	Name des Keims	Häufigkeit	Anzahl	Form	Sauerstofftoleranz	Gramverhalten	Familie	Vorkommen
				subkultivierbar				kannt	kannt		
8	5	69,31%		Burkholderia cepacia	6	28	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Umwelt
3	6	74,26%		Nichtfermentierende, gramnegative Stäbchen	5	355	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	unbekannt	Boden/Wasser
5	7	78,22%		Corynebacterium spp.	4	138	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
7	8	81,19%		Acinetobacter lwoffii	3	32	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram negativ	Neisseriaceae	Boden/Wasser
10	9	83,17%		Corynebacterium jeikeium	2	10	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
11	9	85,15%		Corynebacterium propinquum	2	8	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
15	9	87,13%		Penicillium spp.	2	2	unbekannt	obligat aerob	Ohne (Pilz)	Schimmelpilze	Umwelt
15	9	89,11%		Rhodococcus spp.	2	2	Keulen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
15	9	91,09%		Schimmelpilz spp.	2	2	unbekannt	obligat aerob	Ohne (Pilz)	unbekannt	Luft
9	14	92,08%		Brevundimonas vesicularis	1	26	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Boden/Wasser
12	14	93,07%		Bacillus spp.	1	6	Stäbchen	obligat aerob	Gram positiv	Bacillaceae	Luft
13	14	94,06%		Micrococcus luteus	1	3	Tetraden	obligat aerob	Gram positiv	Micrococcaceae	Haut/Schleimhaut
13	14	95,05%		Corynebacterium afermentans	1	3	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
15	14	96,04%		Corynebacterium gr. ANF	1	2	Stäbchen	fakultativ anaerob	Gram positiv	Corynebacteriaceae	Haut/Schleimhaut
19	14	97,03%		Comamonas acidovorans	1	1	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Boden/Wasser
19	14	98,02%		Zygomycet	1	1	unbekannt	obligat aerob	Ohne (Pilz)	Schimmelpilze	Luft
19	14	99,01%		Flavimonas oryzihabitans	1	1	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Boden/Wasser
19	14	100,00%		Pseudomonas aeruginosa	1	1	Stäbchen	obligat aerob	Gram negativ	Pseudomonaceae	Umwelt

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Tabelle 27: Keimidentifizierungen aus GE-Wasser in Form und Gramverhalten

Merkmal	Anzahl	Summe	Häufigkeit	Anzahl
S-	73	1876	72,28%	79,76%
Unbekannt bzw. Pilz	14	304	13,86%	12,93%
S+	11	167	10,89%	7,10%
K+	3	5	2,97%	0,21%

Gruppiert nach Familien ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 28: Keimidentifizierungen aus GE-Wasser gruppiert nach Keimfamilien

Familie	Häufigkeit	Anzahl	Häufigkeit in %	Kumuliert
Unbekannt <sup>17</sup>	42	1255	41,58%	41,58%
Pseudomonaceae	39	890	38,61%	80,20%
Corynebacteriaceae	12	163	11,88%	92,08%
Schimmelpilze	3	3	2,97%	95,05%
Neisseriaceae	3	32	2,97%	98,02%
Micrococcaceae	1	3	0,99%	99,01%
Bacillaceae	1	6	0,99%	100,00%

### Zusammenfassung Keimidentifizierung WFI und GE-Wasser

Das Spektrum der Keime aus Reinstwasser unterscheidet sich deutlich von dem der sonstigen Produktionsumgebung. Hier überwiegen gramnegative Stäbchen (80%). Häufigste Familie sind die Pseudomonaceae. Da Reinstwasser ein relativ aggressives Medium für Keime darstellt sind auch viele gefundenen Keime geschädigt, so dass Sie sich nicht weiter differenzieren lassen.

### 5.3 Einfluss der Jahreszeiten auf das Keimspektrum

Um eine Auswertung der Keimlandschaft für die Interpretation von Monitoring Ergebnissen gewährleisten zu können, muss sichergestellt sein, dass die Keimlandschaft stabil ist. Wenn sich ein jahreszeitlicher Einfluss nachweisen lässt, müsste dieser in den Auswertungsmodellen berücksichtigt werden. Unter Punkt

<sup>17</sup> Diese Identifizierung wird benannt, wenn der Keim während der Identifizierung sich nicht weiter kultivieren lässt, so dass eine Differenzierung aufgrund von Stoffwechseleigenschaften nicht möglich ist. Daher ist hier nur eine Unterscheidung nur aufgrund der Gramfärbung und mikroskopischer Untersuchung möglich.

6.4 kann gezeigt werden dass die Keimzahl kaum durch Jahreszeiten beeinflusst wird.

Um die Stabilität der Keimlandschaft über die Jahreszeiten nachzuweisen wurde je ein Keimspektrum für Sommermonate (Jun / Jul / Aug) und die Wintermonate (Dez / Jan / Feb) angefertigt und miteinander verglichen. Diese beiden Jahreszeiten stellen den größten Gegensatz zueinander dar und wurden deshalb als Modell verwendet.

Da in der Datenbank in den Jahren 1998 und 2003 keine vollen Jahre erfasst wurden (vergleiche Punkt 4) wurden für die Auswertung nur die Jahre 1999 bis einschließlich 2002 erfasst. Damit ist sichergestellt, dass jeweils nur ganze Jahre in die Auswertung eingeschlossen sind.

### Datenselektion

#### SQL-Statement:

```
SELECT Keim_ident.[Name des Keims], Count(Keim_ident.Anzahl) AS Häufigkeit,
First(Def_Keim.Familie) AS Familie, First(Def_Keim.Merkmal) AS Merkmal
FROM (Daten INNER JOIN Keim_ident ON Daten.ID_Ergebnis =
Keim_ident.id_Ergebnisse) INNER JOIN Def_Keim ON Keim_ident.[Name des
Keims] = Def_Keim.[Name des Keims]
WHERE (((Month([Datum_Ist])=1 Or (Month([Datum_Ist])=2 Or
(Month([Datum_Ist])=12) AND ((Daten.Datum_Ist) Between #1/1/1999# And
#12/31/2002#))
GROUP BY Keim_ident.[Name des Keims]
ORDER BY Count(Keim_ident.Anzahl) DESC;
```

Es wurden alle Keimidentifizierungen zwischen 01.01.1999 und 31.12.2002 selektiert. Diese Daten wurden weiter eingeschränkt auf die, die in den Monaten 1, 2 oder 12 (Jan / Feb / Dez) gefunden wurden. Dieses Beispiel liefert also die Daten für die Wintermonate. Für die Sommermonate wurde nach den Monaten 6, 7 und 8 (Jun / Jul / Aug). Diese Selektion wird nach der Keimspezies gruppiert. Für jede Gruppe (=Datensatz) wird die Anzahl der Identifizierung (=Häufigkeit) sowie Eigenschaften des Keims dargestellt.

### Qualitätssicherung der Datenselektion:

Die Qualitätssicherung erfolgte indirekt im Vergleich von verschiedenen Datenselektionen. Immer gleiche Rohdaten wurden unterschiedlich zusammengefasst (gruppiert nach Namen der Keimspezies, Form und Keimfamilie). Jede dieser Datenselektionen zeigte dass für Sommermonate 4531 und für Wintermonate 4283 Identifizierungen durchgeführt worden sind. Da diese Daten exakt übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass die Datenselektionen richtig erfolgt sind.

### Selektionsergebnis in der Übersicht

Thema	Anzahl der Datensätze	Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen (Identifizierungen)
Liste der Keimidentifizierungen im Sommer	145	4531
Liste der Keimidentifizierungen im Winter	149	4283

In beiden Perioden wurden ungefähr die gleich Anzahl von Identifizierungen durchgeführt und auch eine vergleichbare Anzahl an unterschiedlichen Keimen identifiziert. Die beiden Gruppen sind für einen Vergleich ausreichend homogen.

### Auflistung der häufigsten Keimidentifizierungen nach Jahreszeiten getrennt

Die Datenselektion ergibt eine Rangliste von 145 verschiedenen Mikroorganismen im Sommer und 149 im Winter. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur die Keime aufgelistet, die zusammen mehr als 80% aller Identifizierungen ausmachen.

Tabelle 29: Liste der am häufigsten Identifizieren im Sommer

Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	% der Häufigkeit Summe	Name des Keims	Häufigkeit	Familie	Form <sup>18</sup>
1	29,68%	29,68%	<i>Micrococcus luteus</i>	1345	Micrococcaceae	K+
2	17,77%	47,45%	<i>Staphylococcus</i> spp.	805	Micrococcaceae	K+
3	8,32%	55,77%	<i>Corynebacterium</i> spp.	377	Corynebacteriaceae	S+
4	5,27%	61,05%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	239	Micrococcaceae	K+
5	4,15%	65,20%	<i>Staphylococcus hominis</i>	188	Micrococcaceae	K+
6	2,52%	67,71%	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	114	Micrococcaceae	K+
7	2,27%	69,98%	<i>Micrococcus</i> spp.	103	Micrococcaceae	K+
8	2,10%	72,08%	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	95	Neisseriaceae	S-
9	1,96%	74,05%	Pilz nicht klassifiziert	89	unbekannt	P

<sup>18</sup> K = Kokke / S= Stäbchen / P= Pilz / + = Gram positiv / - = Gram negativ

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	% der Häufigkeit Summe	Name des Keims	Häufigkeit	Familie	Form <sup>18</sup>
10	1,74%	75,79%	Corynebacterium jeikeium	79	Corynebacteriaceae	S+
11	1,48%	77,27%	Staphylococcus warneri	67	Micrococcaceae	K+
12	1,43%	78,70%	Gramnegative Stäbchen	65	unbekannt	S-
13	0,90%	79,61%	Bacillus pumilus	41	Bacillaceae	S+
14	0,88%	80,49%	Bacillus spp.	40	Bacillaceae	S+
15	0,84%	81,33%	Staphylococcus saprophyticus	38	Micrococcaceae	K+

Die nächsten 130 Ränge machen weniger als 20% der Identifizierungen aus. Für den Vergleich werden nur die häufigsten Keime miteinander verglichen.

Tabelle 30: Liste der am häufigsten identifizierten im Winter

Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	% der Häufigkeit Summe	Name des Keims	Häufigkeit	Familie	Form
1	27,92%	27,92%	Micrococcus luteus	1196	Micrococcaceae	K+
2	15,92%	43,85%	Staphylococcus spp.	682	Micrococcaceae	K+
3	7,05%	50,90%	Corynebacterium spp.	302	Corynebacteriaceae	S+
4	6,21%	57,11%	Staphylococcus epidermidis	266	Micrococcaceae	K+
5	5,09%	62,20%	Staphylococcus hominis	218	Micrococcaceae	K+
6	4,30%	66,50%	Staphylococcus haemolyticus	184	Micrococcaceae	K+
7	3,22%	69,72%	Corynebacterium jeikeium	138	Corynebacteriaceae	S+
8	2,24%	71,96%	Acinetobacter lwoffii	96	Neisseriaceae	S-
9	1,84%	73,80%	Pilz nicht klassifiziert	79	unbekannt	P
10	1,59%	75,39%	Staphylococcus capitis	68	Micrococcaceae	K+
11	1,45%	76,84%	Staphylococcus warneri	62	Micrococcaceae	K+
12	1,28%	78,12%	Micrococcus spp.	55	Micrococcaceae	K+
13	1,24%	79,36%	Staphylococcus cohnii cohnii	53	Micrococcaceae	K+

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Rang Häufigkeit	% der Häufigkeit	% der Häufigkeit Summe	Name des Keims	Häufigkeit	Familie	Form
14	1,03%	80,39%	Staphylococcus saprophyticus	44	Micrococcaceae	K+

Die nächsten 135 Ränge machen weniger als 20% der Identifizierungen aus.

Im Vergleich ist zu erkennen, dass sich beide Keimspektren sehr ähnlich sind. Ein signifikanter Unterschied kann nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 31 Vergleich der Identifizierungsränge zwischen Sommer- und Wintermonaten

Name des Keims	Rang in Winter	Rang im Sommer
Micrococcus luteus	1	1
Staphylococcus spp.	2	2
Corynebacterium spp.	3	3
Staphylococcus epidermidis	4	4
Staphylococcus hominis	5	5
Staphylococcus haemolyticus	6	6
<b>Corynebacterium jeikeium</b>	<b>7</b>	<b>10</b>
Acinetobacter Iwoffii	8	8
Pilz nicht klassifiziert	9	9
<b>Staphylococcus capitis</b>	<b>10</b>	<b>18</b>
Micrococcus spp.	12	7

Von den ersten 10 Rängen sind 8 vollständig identisch. Lediglich die Positionen 7 und 10 (Rang Winter) unterscheidet sich.

### Ergebnis des Vergleichs der Keimidentifizierung zwischen Sommer und Winter

Wie aus Tabelle 31 zu erkennen ist werden im Sommer wie im Winter nahezu gleiche Keime im mikrobiologischen Monitoring identifiziert.

Da zwischen beiden extremen Jahreszeiten (Sommer und Winter) kein Unterschied festgestellt werden konnte, kann man davon ausgehen, dass auch die übrigen Jahreszeiten keinen Einfluss auf das Keimspektrum haben.

Man kann also sagen dass die gefundenen Keime vor allem durch den Prüfort und weniger durch den Zeitpunkt der Probenziehung abhängen.

### 5.3.1 Vergleich der typischen Keime an verschiedenen Prüforten

Im Vergleich der unterschiedlichen Orte, an denen Keimproben identifiziert werden, kann man sagen dass sich die Bereiche Luft-Keime, Oberflächen (Wand, Boden oder Maschinenoberflächen) und Personalabklatsch kaum unterscheiden.

Dem gegenüber werden in wässrigen Medien davon abweichende Keime gefunden.

Die Tabelle 32 zeigt die Ränge der unterschiedlichen Keime im Vergleich.

Tabelle 32 : Vergleich der Ränge von Keimidentifizierungen der unterschiedlichen Bereiche

Name der Keimspezies	Rang Luft	Rang Oberfläche	Rang Person	Rang GE-Wasser
Micrococcus luteus	1	1	1	14
Staphylococcus spp.	2	2	2	Nicht vorhanden
Corynebacterium spp.	3	3	3	7
Staphylococcus epidermidis	4	4	4	Nicht vorhanden
Staphylococcus haemolyticus	6	6	5	Nicht vorhanden
Staphylococcus hominis	5	5	6	Nicht vorhanden
Corynebacterium jeikeium	11	7	7	9
Staphylococcus capitis	13	9	8	Nicht vorhanden
Acinetobacter lwoffii	8	14	9	8
Staphylococcus warneri	10	8	10	Nicht vorhanden
Corynebacterium macginleyi	<b>84</b>	12	11	Nicht vorhanden
Corynebacterium group G	18	13	12	Nicht vorhanden
Micrococcus spp.	9	10	13	Nicht vorhanden
Bacillus spp.	23	11	17	14

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Name der Keimspezies	Rang Luft	Rang Oberfläche	Rang Person	Rang GE-Wasser
Pilz nicht klassifiziert	7	27	60	Nicht vorhanden

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist das Keimspektrum zwischen Luft, Oberflächen und Personen sehr ähnlich. Die ersten 4 Ränge sind völlig identisch.

Unterschiede finden sich nur im Detail. So werden in Luft mehr Pilze identifiziert als auf Personen oder Oberflächen.

Aus Wasser werden dagegen deutlich andere Keime identifiziert.

### Vergleich mit anderen Keimlandschaften

Im Vergleich hier die Hauskeime des Betriebs 325 (Novartis Pharma AG, Basel) nach [Riniker] 1998 den Hauskeimen des untersuchten Betriebs der Schering AG gegenübergestellt (Werte als Summe der Identifizierungen; In einer KBE-Untersuchung kann ein Keim mehrfach gefunden werden):

Identifizierter Keim	Betrieb 325, Novartis [Riniker] n=891	Endf. Charlottenburg, Schering AG n=81.246
Staphylococcus epidermidis	Rang 1 / 274 (31%)	Rang 2 / 5861 (7%)
Staphylococcus hominis	Rang 2 / 164 (18%)	Rang 5 / 3855 (4%)
Corynebacterium jeikeium	Rang 3 / 152 (17%)	Rang 13 / 1711 (2%)
Micrococcus luteus	Rang 4 / 110 (12%)	Rang 1 / 1 65312 (80 %)
Staphylococcus capitis	Rang 5 / 73 (8%)	Rang 15 / 1303 (1%)
Staphylococcus warneri	Rang 6 / 64 (7%)	Rang 11 / 2091 (3%)
Micorococcus ssp.	Rang 7 / 54 (6%)	Rang 17 / 1113 (1%)

Der Vergleich zeigt, dass an unterschiedlichen Orten sich auch unterschiedliche Keimspektren zeigen. Auch innerhalb einer Produktionsstätte gibt es je Raum eine spezifische Keimlandschaft.

## 5.4 Anwendung in der Bewertung von Ergebnissen

Da in der Datenbank der Prüfort und der Name des Keims in einer Beziehung zueinander stehen, kann diese Information ausgewertet werden. Dadurch kann man (automatisiert) eine Art Fingerprint jedes Keims erzeugen und damit die historischen Daten als eine Art Keimatlas verwenden.

Diese Art von Auswertung kann zur Interpretation von Grenzwertüberschreitungen

und zur Steigerung der Aussagekraft von Sterilitätsprüfungen verwendet werden.

#### 5.4.1 Interpretation von Grenzwertüberschreitungen

Bei der Grenzwertüberschreitung soll die Keimidentifizierung genutzt werden, um eine mögliche Verursachungsquelle zu finden. Wenn der identifizierte Keim schon oft in der Vergangenheit an diesem Prüfort gefunden wurde, ist es wahrscheinlich, dass er von dort stammt.

Wird z.B. ein typischer Hautkeim im WFI gefunden, der nur sehr selten in WFI vorkommt, kann man mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass es sich um eine Sekundärkontamination der Probe handelt.

Es wird also der in der Überschreitung identifizierte Keim in den Mittelpunkt gestellt und geprüft, wo dieser Keim üblicherweise gefunden wird.

Daraus können Rückschlüsse gezogen werden, ob eine Sekundärkontamination wahrscheinlich ist, oder was eine mögliche Quelle für die KBE-Belastung sein könnte.

Für den Keimfingerprint werden historische Daten herangezogen. Aus der Datenbank werden alle Identifizierungen in Bezug zum gesuchtem Keim dargestellt. Dieses Profil ergibt sich dynamisch aus allen Daten und wird mit jeder neuen Identifizierung erweitert.

Folgende Vorgehensweise hat sich in der Praxis bewährt:

#### **Profil eines identifizierten Keimes:**

In 3 Stufen wird aus den historischen Daten ein Profil ermittelt, wo dieser Keim üblicherweise gefunden wird. In diesen 3 Stufen werden Key Performance Indicators (KPI) ermittelt, die anhand von einfachen Zahlen ausdrücken, wo und wie häufig der Keim gefunden wurde.

Diese 3 Stufen sind:

- Anteil an Gesamtidentifizierungen
- Anteil an Identifizierungen nach Stellen
- Anteil an Identifizierungen nach Räumen

#### *Anteil an Gesamtidentifizierungen (Platz)*

Ermittelt wird der prozentuale Anteil an allen Identifizierungen und welchen Rang diese Spezies über alle Identifizierungen einnimmt. Diese Zahl gibt Auskunft darüber, wie häufig dieser Keim absolut ist.

Beispiel:

Insgesamt sind 22.749 Identifizierungen in der Datenbank erfasst

- *Micrococcus luteus*: 28,3% (Rang 1) → mit 28,3% Anteil der häufigste Keim

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

- *Staphylococcus aureus*: 0,4 % (Rang 25) → mit 0,4% eher selten

*Anteil der Identifizierungen nach Stellen*

Ermittelt wird der prozentuale Anteil des gesuchten Keims an den gesamten Identifizierungen je Stelle. Die Stelle gibt in diesem Datenmodell einen Aufschluss darüber, aus welchem Medium die Probe erfolgt ist.

Beispiel:

- *Micrococcus luteus*:

Stelle	Anzahl	Gesamt	%
Luft	3647	10730	33,99%
Person	1368	5528	24,75%
Fußboden	908	4108	22,10%
sonstige Oberflächen	219	1033	21,20%
Gerät	160	665	24,06%
Wand	110	388	28,35%
Desinfektionsmittel	21	75	28,00%
WFI	4	27	14,81%
Wasser für Vorreinigung	2	20	10,00%
GE-Wasser	1	101	0,99%

*Micrococcus luteus* wird durchschnittlich in 28,3% aller Identifizierungen gefunden. In Luft etwas häufiger (34%) und in Wasser deutlich seltener (WFI 14,81%, GE-Wasser 0,99%!).

- *Staphylococcus aureus*:

Stelle	Anzahl	Gesamt	%
Luft	46	10730	0,43%
Person	26	5528	0,47%
Fußboden	13	4108	0,32%
sonstige Oberflächen	10	1033	0,97%
Gerät	5	665	0,75%
Wand	1	388	0,26%
Desinfektionsmittel	1	75	1,33%

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Staphylococcus aureus wird durchschnittlich zu 0,5% identifiziert. Dieser Wert wird ungefähr auch in an den verschiedenen Stellen erreicht. Die Daten, die nur auf eine Identifizierung zurückgehen (Wand und Desinfektionsmittel), sind nicht aussagefähig, da zu wenig Daten vorliegen (wurde nur 1x identifiziert).

*Anteil nach Räumen*

Ähnlich wie die Aufteilung nach Stellen, kann das Profil nach Räumen aufgestellt werden. Hier wird der Anteil der Identifizierungen des gesuchten Keims in einem Raum von der gesamten Identifizierung dargestellt. Dieses Modell geht davon aus, dass jeder Raum sein spezifisches Keimspektrum aufweist.

Da die gesamte Liste über 100 Räume umfassen würde sind hier nur die ersten 10 dargestellt (größte Anzahl der Identifizierungen).

- Micrococcus luteus

Raum	Raumbeschreibung	Anzahl	Gesamt	%
Person C4	Personenmonitoring <sup>19</sup>	810	3612	22,43%
55-2.B-L10	Raum B (Abfüllung Linie 10)	792	2292	34,55%
55-2.L9/10HS_H	Linie 9/10 Hauptschleuse Herren	467	1228	38,03%
55-2.L9/10HS_D	Linie 9/10 Hauptschleuse Damen	459	1363	33,68%
Person C2	Personenmonitoring	266	972	27,37%
55A-3.36	Herren-Schleuse, für 2. und 3. OG	227	982	23,12%
Person C3	Personenmonitoring	204	620	32,90%
55A-2.32	Modul B, Schleuse bei Bedarf	200	725	27,59%
54/55-Technik	Technikräume divers.	197	561	35,12%
55A-2.00C	Flur im Modul B, zwischen Linie 1+2	176	600	29,33%
.....	....	...	...	...
54-1.L2	Abfüllung Linie 2	14	69	26,09%

Auffällig ist, dass in der Top 10 Liste der Räume besonders Räume mit einer hohen Personalwechselzahl (Schleusen, Flure, Personalmonitoring) vorkommen. Der Anteil der Identifizierungen liegt dabei bei dem typischen Wert um 28% (+-6%-Punkte) für Micrococcus luteus.

<sup>19</sup> Personenmonitoring ist ein fiktiver Raum, der verwendet wird, wenn das Umkleideprozedere regelmäßig überprüft wird. Hier wird der Prozess des Umkleideprozedere überprüft und nicht die Produktionsumgebung. Um diese Prozessüberprüfung vom sonstigen Umgebungsmonitoring zu trennen, wurde in den Stammdaten der fiktive Raum „Personenmonitoring“ eingeführt.

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

- Staphylococcus aureus

Raum	Raumbeschreibung	Anzahl	Gesamt	%
Person C4	Personenmonitoring	18	3612	0,50%
55-2.L9/10HS_D	Linie 9/10 Hauptschleuse Damen	10	1363	0,73%
55A-3.36	Schleuse – Herren, Für 2. und 3. OG	7	982	0,71%
55-2.B-L10	Raum B (Abfüllung Linie 10)	6	2292	0,26%
54/55-Technik	Technikräume Divers	5	561	0,89%
55A-2.00C	Flur im Modul B, zwischen Linie 1+2	5	600	0,83%
Person C2	Personenmonitoring	4	972	0,41%
55A-3.34	Schleuse – Damen, Für 2. und 3. OG	4	629	0,64%
55A-3.29	Linie 2 Mikronisierung	3	107	2,80%
55A-3.24C	Linie 1 Ansatz – Personenschleuse	3	48	6,25%

Auch Staphylococcus aureus wird häufig in Räumen identifiziert, in denen eine hohe Personalwechselrate herrscht.

### Anwendung bei Grenzwertüberschreitungen

Mit der o.g. beschriebenen Methode wurde für jeden Keim ein Identifizierungsprofil aufgestellt. Anhand dieser Daten können nun Grenzwertüberschreitungen ausgewertet werden. Diese Bewertungsmethode lässt sich für jede Grenzwertüberschreitung anwenden. Als Beispiel wird hier eine Grenzwertüberschreitungen aus dem WFI-Monitoring betrachtet:

#### WFI

Von 11.854 KBE Untersuchungen in WFI sind 9 Aktionsgrenzüberschreitungen (mehr als 10 KBE pro 100ml gemessen) aufgetreten (0,076%). WFI wird bei einer Temperatur > 85°C in einem Kreislaufsystem gelagert. Aufgrund dieser physikalischen Bedingungen ist es sehr unwahrscheinlich, dass hier Keime in größerer Konzentration vorkommen können. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesen 9 Ergebnissen um Fehlmessungen handeln könnte.

Als Beispiel wird die o.g. Methode für eine reale Grenzwertüberschreitung durchgeführt

Daten der Messung:

Prüfungsnummer: WFI-00030A  
 Datum: 18.07.2002  
 Raum: 54.1.L2 (Abfüllung Linie 2)  
 Stelle: WFI  
 Methode: MBF Aktionsgrenze: 10 KBE pro 100 ml  
 Ergebnis: 71 KBE pro 100ml

Identifizierte Keime: 65x micrococcus luteus, 4x Bacillus sphaericus; 2x Kocuria varians

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Profil in der Keimlandschaft:

<b>Merkmal</b>	<b>Micrococcus luteus</b>	<b>Bacillus sphaericus</b>	<b>Kocuria varians</b>
Häufigkeit insgesamt	28,3 % (Rang 1)	0,85% (Rang 16)	0,08% (Rang 76)
Anteil in WFI	4 von 27 (14,81%)	1 von 27 (0,04%)	1 von 27 (0,04%)
Anteil im Raum (54.1.L2)	18 von 69 (26,09%)	2 von 69 (0,03%)	1 von 69 (0,01%)

Daten der Keime:

Rang	Name des Keims	Merkmal	Sauerstofftoleranz	Familie	Vorkommen
1	Micrococcus luteus	K+	Obligat aerob	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut
16	Bacillus sphaericus	S+	Obligat aerob	Bacillaceae	Haut/ Schleimhaut
76	Kocuria varians	K+	Fakultatis anaerob	Micrococcaceae	Haut/ Schleimhaut

#### *Bewertung der WFI Grenzwertüberschreitung::*

Alle Keime sind typische Hautkeime. Sie werden im Raum, in dem die WFI-Probe genommen wurde häufiger gefunden als in WFI (6 von 27 in WFI (22%) und 21 von 69 (30%) für den Raum). Außerdem wurden die Keime Bacillus sphaericus und Kocuria varians insgesamt nur 1x im WFI identifiziert. Sowohl Daten des Keims (typischer Hautkeim) als auch die Daten der Keimlandschaft deuten darauf hin, dass die identifizierten Keime nicht aus WFI stammen, sondern eine Sekundärkontamination bzw. Fehlmessung darstellen.

Mit Hilfe der differenzierten Keimidentifizierung in Verbindung mit einer Keimlandschaft aus historischen Daten kann also eine Fehlmessung erkannt und entsprechend bewertet werden.

In diesem Fall besteht trotz der Grenzwertüberschreitung keine Gefahr für die pharmazeutische Produktion. Als Maßnahme sollte Unterweisung der Probenehmer erfolgen.

#### 5.4.2 Anwendung bei der Sterilitätsprüfung

Für die Anwendung der Keimlandschaft zur Unterstützung der Sterilitätsprüfung wird die gleiche Keimlandschaft herangezogen allerdings werden die Daten anders dargestellt.

Für die Interpretation der Grenzwertüberschreitung wird der Keim in den Mittelpunkt gerückt und untersucht, wo dieser Keim üblicherweise vorkommt, um zu unterscheiden, ob eine Fehlmessung vorliegen könnte oder wo eine mögliche Quelle für die Keimbelastung sein könnte.

Für die Anwendung bei der Unterstützung der Sterilitätsprüfung wird der Ort des

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Sterilprüflabors in den Mittelpunkt gestellt. Es wird anhand von historischen Daten die Keimlandschaft des Sterilprüfbereichs mit dem der Herstellung des Produkts verglichen.

Es wird also ein Raum in den Mittelpunkt gestellt und davon ausgehend das raumspezifische Keimspektrum ermittelt.

*Fingerprint Beispiel Sterilprüflabors*

Tabelle 33 : Keimlandschaft des Sterilprüflabors Raum 306

Rang	Name des Keims	Anzahl	Familie	Merkmal	Vorkommen	%
1	<i>Micrococcus luteus</i>	333	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	33,10%
2	<i>Serratia marcescens</i>	78	Enterobacteriaceae	S-	Boden/Wasser	7,75%
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	77	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	7,65%
4	<i>Staphylococcus hominis</i>	73	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	7,26%
5	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	49	Neisseriaceae	S-	Boden/Wasser	4,87%
6	<i>Bacillus pumilus</i>	40	Bacillaceae	S+	Umwelt	3,98%
7	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	31	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	3,08%
8	<i>Staphylococcus capitis</i>	28	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	2,78%
9	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	27	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	2,68%
10	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	18	Corynebacteriaceae	S+	Haut/Schleimhaut	1,79%
11	<i>Staphylococcus warneri</i>	16	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	1,59%
11	<i>Bacillus sphaericus</i>	16	Bacillaceae	S+	Umwelt	1,59%
13	<i>Corynebacterium afermentans</i>	14	Corynebacteriaceae	S+	Haut/Schleimhaut	1,39%
14	Nicht subkultivierbar	13	Unbekannt	P	unbekannt	1,29%
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	1,09%
15	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	11	Pseudomonaceae	S-	Umwelt	1,09%
17	<i>Corynebacterium striatum</i>	10	Corynebacteriaceae	S+	Haut/Schleimhaut	0,99%
18	<i>Burkholderia cepacia</i>	9	Pseudomonaceae	S-	Umwelt	0,89%
19	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	8	Pseudomonaceae	S-	Boden/Wasser	0,80%
19	<i>Yarrowia lipolytica</i>	8	Hefepilze	P	Umwelt	0,80%
21	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	7	Pseudomonaceae	S-	Boden/Wasser	0,70%
21	<i>Corynebacterium group G</i>	7	Corynebacteriaceae	S+	Haut/Schleimhaut	0,70%
21	<i>Staphylococcus xylosus</i>	7	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	0,70%

In Tabelle 33 werden die ersten 20 Ränge der Keimlandschaft des Sterilprüfbereichs dargestellt. Insgesamt wurden in diesem Raum 1006 Identifizierungen erfasst. In all diesen Identifizierungen wurden insgesamt 77 verschiedene Mikroorganismen identifiziert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in dieser Tabelle nur die Ränge 1 bis 20 mit insgesamt 23<sup>20</sup> verschiedenen

<sup>20</sup> Da die Ränge 15, 19 und 21 mehrfach besetzt sind, umfassen die ersten 20 Ränge 23 unterschiedliche Spezies.

## Teil 1: Keimlandschaft in pharmazeutischer Produktion

Spezies aufgeführt.

### *Fingerprint Beispiel Produktionsbereichs*

Tabelle 34: Keimlandschaft der Abfüllung Linie 2 Raum 54-1.L2

Rang	Name des Keims	Anzahl	Familie	Merkmal	Vorkommen	%
1	Micrococcus luteus	18	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	26,09%
2	CDC group EO-2	5	unbekannt	S-	Boden/Wasser	7,25%
2	Pilz nicht klassifiziert	5	unbekannt	P	Umwelt	7,25%
4	Nicht subkultivierbar	4	unbekannt	P	unbekannt	5,80%
5	Staphylococcus haemolyticus	3	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	4,35%
5	Staphylococcus epidermidis	3	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	4,35%
5	Ochrobactrum anthropi	3	Pseudomonaceae	S-	Wasser	4,35%
8	Bacillus sphaericus	2	Bacillaceae	S+	Umwelt	2,90%
8	Brevibacterium sp.	2	Corynebacteriaceae	S+	Haut/Schleimhaut	2,90%
8	Corynebacterium propinquum	2	Corynebacteriaceae	S+	Haut/Schleimhaut	2,90%
8	Acinetobacter lwoffii	2	Neisseriaceae	S-	Boden/Wasser	2,90%
8	Moraxella spp.	2	Neisseriaceae	S-	Boden/Wasser	2,90%
8	Pseudomas fluorescens	2	Pseudomonaceae	S-	Umwelt	2,90%
8	Staphylococcus hominis	2	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	2,90%
15	Corynebacterium striatum	1	Corynebacteriaceae	S+	Haut/Schleimhaut	1,45%
15	Aspergillus spp.	1	Schimmelpilze	P	Umwelt	1,45%
15	Bacillus cereus	1	Bacillaceae	S+	Umwelt	1,45%
15	Staphylococcus schleiferi	1	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	1,45%
15	Staphylococcus kloosii	1	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	1,45%
15	Methylo. Mesophilicum	1	Pseudomonaceae	S-	Boden/Wasser	1,45%
15	Staphylococcus cohnii cohnii	1	Micrococcaceae	K+	Haut/Schleimhaut	1,45%

In Tabelle 34 werden die ersten 20 Ränge der Keimlandschaft des Sterilprüfbereichs dargestellt. Insgesamt wurden in diesem Raum 69 Identifizierungen erfasst. In all diesen Identifizierungen wurden insgesamt 28 verschiedene Mikroorganismen identifiziert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in dieser Tabelle nur die ersten 20 Spezies.

### *Bewertung von Keimfunden während der Sterilitätsprüfung*

Anhand des Vergleichs der Keimlandschaft der beiden Räume kann eine mögliche Verursachungsquelle eingegrenzt, bzw. eine Sekundärkontamination erkannt werden.

Wird z.B. in einer Sterilitätsmessung eines Produkts das in der Abfüll-Linie 2 (Raum 54-1-L2) gefertigt wurde „Serratia mercenscens“ (siehe Tabelle 33)

identifiziert, kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine Sekundärkontamination angenommen werden. In der Bewertung des Sterilitätstests kann eine Fehlmessung angenommen werden. *Serratia mercescens* kommt in diesem Beispiel zwar im Sterilprüflabor vor (Rang 2 der häufigsten Keime), wurde aber noch nie in der Abfüll-Linie 2 identifiziert.

Mit dieser Datenlage ist ein ausreichender Grund für die Wiederholung des Sterilitätstests gegeben. Ohne einen ausreichenden Grund könnte unter GMP-Gesichtspunkten „Testing into compliance“ vorgeworfen werden (also einen Test solange wiederholen, bis das gewünschte Ergebnis vorliegt).

### **5.5 Kosten / Nutzen Relation der Keimlandschaft**

Die Keimidentifizierung ist ein wichtiger Schlüssel bei der Bewertung des mikrobiologischen Monitorings. Dabei kann besonders der Aufwand der Keimidentifizierung den Nutzen des gesamten mikrobiologischen Monitorings erhöhen.

Wenn man annimmt, dass eine Monitoring-Messung im Durchschnitt 50€ Kosten verursacht (Kosten für Probenziehung, Verbrauchsmaterialien, Aufbereitung der Probe, Auswertung und Dokumentation), wurden im untersuchten Betrieb pro Jahr ca. 3 Mio. € (bei 60.000 Messungen pro Jahr) für das mikrobiologische Monitoring ausgegeben. Hinzu kommen ca. 0,4 Mio. € für die Keimidentifizierung (ca. 5.000 Identifizierungen a 80€ pro Jahr).

Da die Aufbereitung von mikrobiologischen Proben eine aufwendige Handarbeit darstellt, kann man annehmen, dass 1 von 100 Messungen durch eine Sekundärkontamination zu viele Keime anzeigt. Die meisten Fehler der Messkette führen zu falschen überhöhten Keimzahlen.

Anders als bei anderen Analysemethoden lässt sich die Testsicherheit nicht durch die Analyse von mehreren Mustern aus einer Stichprobe erhöhen. Eine Monitoring-Untersuchung ist in der Regel eine einzelne Messung (z.B. eine Luftkeimmessung). Dabei ist es nicht möglich bei einer Unsicherheit einfach eine neue Probe zu ziehen und die Messung zu wiederholen (normalerweise liegen zwischen Probeziehung und Auswertung 3-5 Tage).

Bei 60.000<sup>21</sup> Messungen pro Jahr können es 600 im Jahr oder 2,4 Fehlmessungen pro Arbeitstag (bei 250 Arbeitstagen im Jahr) sein.

Erst zusammen mit der Keimidentifizierung können die richtigen Schlüsse gezogen werden, indem man wie in Teil 1 beschrieben die Keimlandschaft des untersuchten Bereichs einbezieht.

Ohne die Unterstützung der Keimidentifizierung würde man vermutlich bei einigen der 2,4 Fehlmessungen pro Tag falsche Schlüsse ziehen und z.B. eine unbelastete Produktionscharge unnötigerweise sperren.

Je weniger Erfahrung in einer Produktionsumgebung und der Keimlandschaft vorhanden ist, je mehr sollte in die Keimidentifizierung investiert werden. Im eingeschwungenen Zustand zeigt die Erfahrung dass die Identifizierung aller

---

<sup>21</sup> Entspricht dem Durchschnitt des untersuchten pharmazeutischen Produktionsbetrieb.

Überschreitungen, aller Keime aus Reinheitsklasse A und B sowie dem WFI-System ausreichend ist.

Liegt keine Erfahrung vor, sollten in einer Anfangszeit (z.B. bei der Reinraumqualifizierung) alle Keime identifiziert werden, um die notwendige Datenbasis aufzubauen.

Wer ohne ausreichende Datenbasis an der Keimidentifizierung spart, muss eventuell bei der Vernichtung zu unrecht gesperrter Chargen teuer draufzahlen.

## **6 Teil 2: Untersuchung der Einflüsse auf die Keimbelastung**

### **6.1 Einleitung**

Im Teil 2 werden verschiedene Einflüsse auf die gemessene Keimzahl im Umgebungsmonitoring untersucht. Jede mikrobiologische Prüfung der Umgebung (z.B. Luftkeimsammlung) ist eine Momentaufnahme und lässt sich nicht ein zweites Mal analysieren (anders als bei einer Wasserprobe, aus der Wiederholungsmessungen gemacht werden können). Die Methoden zur Ermittlung der Keimzahlen sind zwar vergleichsweise simpel, verlangen aber einen sorgfältigen Umgang mit den Proben, um Sekundärkontaminationen zu vermeiden.

Auf der anderen Seite gilt der Grundsatz „Bugs don't lie“ [Agoloco, Akers 1998]. Was soviel bedeutet, wie: „Jede Messung zählt und muss ernst genommen werden“. Es ist gemäß den current GMP-Regeln nicht zugelassen in der Bewertung der gemessenen Keimzahlen Ausreißer herauszunehmen:

„If no laboratory or statistical errors are identified, there is no scientific basis for invalidation initial OOS results in favor of passing retest result. ... „Outliner tests have no applicability in cases where the variability of a product is being assessed“ [FDA Draft Guidance for Industry OoS]

Da bei sehr sauberen Bedingungen, wie sie in RK A oder bei heißgelagerten WFI herrschen, ohnehin nur sehr wenige Keime vorhanden sind, kann es in der Praxis passieren, dass mehr Keime durch Fehlmessungen gefunden werden, als tatsächlich vorhanden sind.

#### **Hier ein Beispiel:**

Bei der Luftkeimsammlung in Reinheitsklasse A wird nur in jeder 25. Probe ein Keim im Mittel gefunden (Datengrundlage: 9065 Werte; Mittelwert aller Messungen ist: 0,0408; Standardabweichung: 0,757). In dieser Messreihe sind 8943 Messwerte 0 (keine Keime gefunden). Das heißt, dass nur in 122 Proben von 9065 (1,35%) Keime gefunden wurden. Das zeigt auch die hohe Standardabweichung in Vergleich zum Mittelwert (Standardabweichung ist ca. 18-Mal so groß wie der Mittelwert). In wenigen Fällen werden also viele Keime gefunden (siehe Diagramm 1)

Bei der Annahme, dass bei 1% der KBE-Untersuchungen Sekundärkontaminationen auftreten (angenommener Methodenfehler) bedeutet