



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Analyse des mikrobiologischen Kontaminationsrisikos in einer multi-purpose genutzten Pilotanlage“

verfasst von / submitted by

Christoph Aner, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree
of

Master of Science (MSc)

Wien, 2016 / Vienna 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 834

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Molekulare Biologie

Betreut von / Supervisor:

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn.

Karola Vorauer-Uhl

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Karola Vorauer-Uhl für die hervorragende Betreuung meiner Masterarbeit danken. Dies ermöglichte es mir diese Arbeit mit großem Lernerfolg zu meistern.

Außerdem gebührt dem Leiter der Pilotanlage Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Markus Luchner großer Dank für die außerordentliche Unterstützung bei der Ausführung meiner Masterarbeit. Ohne sein Vermittlungsgeschick mit den zuständigen Personen der Haustechnik und der Reinigungsfirma ISS Facility Services GmbH wären die vorgeschlagenen Maßnahmen dieser Masterarbeit in diesem Umfang nicht umsetzbar gewesen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Jutta Mattanovich für die großartige Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Umgebungsuntersuchungen in der Pilotanlage bedanken.

Ferner möchte ich Clemens Keinprecht BSc und Sabine Necina als Mitglieder des geformten Expertenteams für ihr eingebrachtes Wissen sowie ihre tatkräftige Mithilfe einen großen Dank aussprechen.

Ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie für die Ermöglichung des Studiums sowie der tatkräftigen Unterstützung während des Studiums aussprechen.

Gliederung:

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	7
2	AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	10
2.1	Einsatz des Risikomanagements.....	10
2.2	Bewertung von Risiken.....	10
2.3	Qualitätssichernder Maßnahmenkatalog.....	11
2.4	Raummonitoringkonzept erstellen.....	11
3	EINLEITUNG.....	12
3.1	Was ist GMP? Was sind Anforderungen bei industrieller Herstellung?.....	12
3.1.1	Prozesscharakteristika.....	15
3.1.2	Personal.....	15
3.1.3	Reinigung und Wartung.....	15
3.1.4	Schulung.....	17
3.2	Was ist eine Pilotanlage?.....	18
3.3	Was bedeutet Mehrzweck-Anlage (multi-purpose)?.....	18
4	METHODEN UND MATERIALIEN.....	19
4.1	Methode des Risikomanagements.....	19
4.1.1	Einteilung der Kriterien.....	19
4.1.2	Regeln für die Bewertung der Akzeptanz.....	20
4.2	Raumplan und Nutzung.....	21
4.3	Monitoring.....	25
4.3.1	Durchführung Umgebungsmonitoring.....	25
4.3.1.1	Nährmedien.....	27
4.3.1.2	Wahl der Probenahmeorte.....	28
4.3.1.3	Umgebungsmonitoring im Ruhezustand.....	29
4.3.1.4	Kultivierung.....	29
4.3.2	Einordnung häufigster Kolonien.....	30
4.3.2.1	Gram-Färbung.....	30
4.3.2.2	CytochromC–Oxidase–Test.....	31
4.3.2.3	Katalase-Test.....	31
4.3.2.4	Sporenfärbung.....	32
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	33
5.1	Fehlermöglichkeits- und -einflussanalyse (FMEA).....	33

5.2	Monitoring	41
5.2.1	Probenahmedesign	41
5.2.2	Allgemeine Durchführung Monitoring	46
5.2.3	Besondere Hinweise zu einzelnen Monitorings	47
5.2.3.1	Voruntersuchung für Monitoring	47
5.2.3.2	Monitoring 1.....	48
5.2.3.3	Sofortmaßnahmen zwischen Monitoring 1 und 2.....	48
5.2.3.4	Monitoring 2.....	49
5.2.3.5	Monitoring 3.....	49
5.2.3.6	Monitoring 4.....	49
5.2.3.7	Monitoring 5.....	49
5.2.4	Vergleich der Untersuchungen vor Raumluftfilterwechsel in Ruhezustand	50
5.2.5	Vergleich der Untersuchungen vor und nach Raumluftfilterwechsel in Ruhezustand	55
5.2.6	Vergleich der Untersuchungen nach Raumluftfilterwechsel in Betriebs- und Ruhezustand	57
5.2.7	Interpretation der Gesamtkeimzahl der Oberflächenkeimsammlung.....	60
5.2.8	Monitoring mit dem Fokus auf das Pilzwachstum	61
5.3	Abgeleiteter Maßnahmenkatalog	63
5.4	Ausblick	75
6	LITERATUR	77

1 Zusammenfassung

In der Pilotanlage des Departments für Biotechnologie (DBT) an der Universität für Bodenkultur Wien ist es möglich biotechnologische Prozesse im industriellen Maßstab durchzuführen. Diese Anlage wurde bis vor einigen Jahren industriell genutzt. Mittlerweile wird die technische Anlage hierin ausschließlich zur forschungsgetriebenen Lehre genutzt. Aus dieser Nutzung resultiert, dass es kein Konzept mehr gibt, wie Kontaminationen der Pilotanlage vermieden werden können.

Zuerst habe ich deshalb eine qualitative Risikobewertung mittels dreiteiliger Skala anhand einer Fehlermöglichkeits- und -einflussanalyse (FMEA) durchgeführt. Dabei wurden mögliche Risiken einer biotechnologischen Anlage anhand der in Europa geltenden Richtlinien für die Gute Herstellungspraxis (GMP) mit dem entsprechenden Fachpersonal erörtert und bewertet.

Anschließend habe ich mikrobiologische Umgebungsuntersuchungen der Luft sowie speziell definierter Oberflächen durchgeführt um einen Status Quo der Kontaminationsgefahr durch die unmittelbare Umgebung feststellen zu können.

Fehlverhalten des Personals aufgrund fehlender Schulung oder durch einen Bedienfehler kristallisierten sich als häufigster Grund für ein Risiko zur Kontamination der Anlage heraus. Aber auch das technische Versagen aufgrund fehlerhafter Ventile und poröser Dichtringe war ein häufig genannter Grund. Mit den genannten Maßnahmen sind nicht alle Risiken akzeptierbar geworden. Mit den Umgebungsuntersuchungen konnten stärker kontaminierte Bereiche aufgedeckt werden und durch deren Reinigung und Desinfektion, sowie auch durch die Schulung der betreffenden Personen auf diese Bereiche (Personal- und Materialschleuse, Downstreamhalle, Waschküche) aufmerksam gemacht werden. Es benötigt weitergehende Monitorings um sagen zu können, wie sich die mikrobiologische Belastung in den einzelnen Räumen entwickelt und welche Auswirkungen das auf den Upstream- oder auch Downstreambereich haben kann.

Ziel dieser Masterarbeit ist es ein Grundkonzept zu erstellen, wie Qualitätsmanagement in dieser Pilotanlage durchgeführt werden kann. Da die

erzeugten Proteine nicht vertrieben werden, müssen die strengen Regeln der pharmazeutischen Industrie zur Herstellung von Arzneimitteln nicht zwingend beachtet werden. Es ist aber im Sinne des Departments, dass mit dieser Anlage eine Brücke geschaffen wird zwischen universitären Laborergebnissen und pharmazeutischer Herstellung im Industriemaßstab. Meine Masterarbeit legt hierzu den Grundstein, indem sie kritische Prozessschritte bei der Fermentation aufdeckt, sowie auch mit dem Monitoringprogramm ein Werkzeug zur Verfügung stellt um Trends zu erkennen, die zu einer Kontamination führen können.

Abstract

In the Pilot Plant of the Department of Biotechnology at the University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, it is possible to perform biotechnological processes in industrial scale. Until a few years ago, this plant was used industrially. Meanwhile, all the bioprocess engineering within the pilot plant is undertaken for teaching purposes that is driven by research. This use results therein, that there is no concept at hand how to avoid contaminations at the pilot plant.

At first, I conducted a qualitative, tripartite risk evaluation according to a Failure Mode and Effects Analysis (FMEA). Possible risks of the biotechnological facility were evaluated according to the European guidelines for Good Manufacturing Practice (GMP) and these risks were discussed with the expert staff.

Subsequently, I undertook microbial monitoring of the air and on predefined surfaces to determine the status quo of contaminations that are derived by its direct environment.

Incorrect operations caused by missing training or by operator error was most often a reason for a risk of contaminating the facility. As well as technical failure of erroneous valves or porous seal rings were often a reason. By the suggested means, not all identified risks could be accepted. The environmental monitoring could show more contaminated areas within the plant and by cleaning and disinfection of these areas, as well as by training of concerned persons, a focus could be set on those areas (personal and material lock, downstream hall, wash

kitchen). Further monitoring need to be done to verify the determined trend of the bioburden within each room and to show which effects the bioburden has on the upstream and downstream area.

The goal of this master thesis is to develop a basic concept how quality management can be performed in this pilot plant. The strict rules of the pharmaceutical industry for the manufacturing of drugs for human use do not need to be applied because the produced proteins will be produced only for research purposes. However, it is the aim of the department to establish a bridge between laboratory results at a university and pharmaceutical manufacturing at an industrial scale. Hence, my master thesis is providing the fundamental basis by analyzing critical process steps at the fermentation and with the environmental monitoring it provides a tool to detect trends that can lead to a contamination.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Pilotanlage des Departments für Biotechnologie (DBT) an der Universität für Bodenkultur Wien ist darauf ausgerichtet biotechnologische Prozesse in einem industriellen Maßstab durchführen zu können. Eine besondere Herausforderung stellt die Nutzung als Mehrzweckanlage dar, da unterschiedliche Organismen (Bakterien, Hefen, Pilze, tierische Zellen usw.) verwendet werden. Die Pilotanlage ist für die forschungsgetriebene Lehre ausgelegt, was bedeutet, dass in diesen Räumlichkeiten Kurse für Studierende sowie Praktika durchgeführt werden, aber auch Forschungsprojekte ihre Anwendung finden. Ziel ist es diese Anlage in Bezug auf die Qualität in einen industriellen Kontext zu setzen, was durch die Anwendung der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, kurz: GMP) in der pharmazeutischen Industrie erzielt wird. Meine Arbeit soll hierzu die Grundlagen schaffen, indem die Kontaminationsmöglichkeiten biologischer Herkunft im Rahmen eines umfassenden Raummonitoringkonzeptes identifiziert und bewertet werden, sowie mögliche Wege zur Reduzierung solcher Gefahren aufgezeigt werden. Um den industriellen Zusammenhang herzustellen sollen hierzu Herangehensweisen genutzt werden, die in der pharmazeutischen Arzneimittelherstellung ihre Anwendung finden.

2.1 Einsatz des Risikomanagements

Mittels Fehlermöglichkeits- und -einflussanalyse (FMEA) habe ich die komplexen Prozesse in der Pilotanlage in kleine Prozessschritte geteilt und die Risiken ermittelt, denen diese Schritte ausgesetzt sind.

2.2 Bewertung von Risiken

Die Risiken werden von mir identifiziert und dann in einer Expertenrunde mittels einer dreiteiligen Skala qualitativ bewertet. Eingeteilt werden diese Risiken in akzeptierbare und nicht akzeptierbare Risiken. Zu den nicht akzeptierbaren Risiken habe ich Maßnahmen durchdacht, die dieses Risiko verringern um die

Akzeptanz des Risikos zu steigern. Anschließend wurde in der Expertenrunde eine Zweitbewertung der Risikofaktoren durchgeführt.

2.3 Qualitätssichernder Maßnahmenkatalog

Dieser Katalog setzt sich aus Maßnahmen zur Schulung, zur Systemüberwachung sowie aus einführbaren Innovationen zusammen, die teilweise auch überschneidend sind. (z.B. Implementierung einer Standardarbeitsanweisung zur Selbstinspektion). In den *Abbildung 32 -Abbildung 37* wird dieser Katalog dargestellt.

2.4 Raummonitoringkonzept erstellen

Um die Gefahrenpotenziale im gesamten Technikum besser einschätzen zu können, habe ich Umgebungsuntersuchungen auf mikrobielle Belastung durchgeführt um herauszufinden, welche Bereiche des Technikums ein erhöhtes Kontaminationsrisiko aufweisen. Hierbei ist es wichtig die Anzahl und die genauen Orte sorgsam zu wählen, damit das Monitoring im Ruhe- sowie im Betriebszustand durchgeführt werden kann. Die Status-Quo-Bestimmung in Ruhe hat einen umfassenderen Charakter als die Durchführung während des Betriebes. Das Raummonitoring im Ruhezustand wird in jedem Raum der Pilotanlage durchgeführt, wohingegen sich das Monitoring im Betriebszustand auf Punkte fokussiert, die sich während der Risikoanalyse als kritisch erwiesen haben oder im Monitoring im Ruhezustand hohe Gesamtkeimzahlwerte erzielt haben.

3 Einleitung

3.1 Was ist GMP? Was sind Anforderungen bei industrieller Herstellung?

Die Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, kurz: GMP) ist ein System zur Sicherstellung, dass Produkte konsistent und kontrolliert nach diesen Qualitätsstandards hergestellt werden. Es ist angelegt die Risiken zu minimieren, die eine pharmazeutische Produktion mit sich bringt, die nicht durch Untersuchungen des Endproduktes ausgeschaltet werden können. Die größten Risiken hierbei sind: unerwartete Kontamination der Produkte, [...], falsche Beschriftung der Verpackung [...] sowie zu wenig oder zu viel aktive Substanz [...]. GMP betrifft alle Aspekte der Produktion, vom Startmaterial, Räumlichkeiten und Geräten bis hin zur Schulung und Hygiene des Personals. Detaillierte, niedergeschriebene Prozeduren sind wichtig für jeden Prozess, der die Qualität des Endproduktes beeinträchtigen könnte. Es müssen Systeme vorhanden sein, die dokumentiert beweisen können, dass jeder Prozessschritt im Herstellungsvorgang nach korrekten Prozeduren abgelaufen ist. (Def. GMP, WHO)

In der Direktive 2003/94/EC¹ werden die Prinzipien der Guten Herstellungspraxis für medizinische Produkte für Humananwendung sowie in der Direktive 91/412/EEC² für den veterinärmedizinischen Gebrauch erläutert.

Detaillierte Richtlinien sind in der EU im EUDRALEX Vol.4 zu finden. Diese dienen als Anleitung für die Interpretation der oben genannten Direktiven.³

Die „International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“ (ICH) ist eine Organisation, deren Ziel es ist bestehende internationale Richtlinien zu harmonisieren. Sie geben Richtlinien zu Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit von Arzneimitteln heraus. Einen wichtigen Teil der Qualitätsrichtlinien stellt die Richtlinie Q9⁴ dar, in der es um Qualitätsrisikomanagement geht, aber auch andere Qualitätsrichtlinien wie Q5A,C-E „Quality of biotechnological products“⁵⁻⁸, Q6A und Q6B „Specifications“^{9,10} und die Q7 „Good Manufacturing Practice“¹¹ sind für die Pilotanlage als Anhaltspunkte wichtig.

Generell gilt in der Guten Herstellungspraxis, dass alles, was nicht dokumentiert ist, nicht gemacht ist. In der pharmazeutischen Industrie entwickelt sich deshalb ein großes Schriftaufkommen. Die Erstellung und Pflege dieser Dokumentation erfordert viel Zeit, die in diesem akademischen Kontext nicht vollständig umsetzbar ist, zumal eine entsprechend notwendige Organisation nicht gegeben ist.

Die breite Palette der medizinischen Produkte kann grob in biotechnologische sowie chemische Produkte unterteilt werden. Biotechnologische Produkte werden aus lebenden Organismen gewonnen, isoliert oder mit Hilfe von Organismen hergestellt. Chemische Produkte werden durch chemische Synthese- und anschließende Reinigungsschritte hergestellt. Da in der Pilotanlage am Department für Biotechnologie (DBT) der Universität für Bodenkultur Wien mittels pro- oder eukaryotischen Zellen Proteine hergestellt werden, fällt diese Pilotanlage eindeutig in das Feld der Biotechnologie.¹²

In der Biotechnologie unterscheidet man zwei Prozesse in der Wirkstoffherstellung. Die Fermentation bezeichnet eine Form der enzymatischen Umwandlung organischer Stoffe und wird in der pharmazeutischen Industrie als „Upstream processing“ sowie die anschließende Aufarbeitung und Reinigung als „Downstream processing“ bezeichnet.¹²

Die Fermentation ist in klassische und biotechnologische Fermentation einteilbar. Biotechnologische Fermentationen werden so genannt, sobald die verwendeten Organismen durch rekombinante DNA verändert sind. Klassische Fermentationsprozesse benutzen Mikroorganismen, die in der Natur vorkommen oder durch konventionelle Methoden (z.B. Bestrahlung) verändert werden. Der Grad an Kontrolle ist bei biotechnologischen Fermentationen größer als bei klassischen Fermentationen.¹³

Ein pharmazeutisches Qualitätsmanagement-System soll definiert und dokumentiert sein. Dies gilt für pharmazeutisch herstellende Betriebe. Für die Pilotanlage soll ein strukturiertes Dokumentationssystem eingeführt werden, das sich an den Vorgangsweisen der Guten Herstellungspraxis orientiert.¹⁴

Das Ausmaß des Aufwandes und der Dokumentationsumfang des Qualitätsrisikomanagementprozesses ist verhältnismäßig zu dem potentiellen Risiko zu wählen.¹³

Angemessene Kontrollen sollen auf allen Ebenen der Herstellung eingeführt sein um die Qualität des Produktes zu sichern. Angemessene Ausrüstung soll vorhanden und Umgebungskontrollen durchgeführt werden. Die Akzeptanzkriterien der Qualität der Umgebung und die Häufigkeit der Monitorings sollten an den Produktionsschritt und an die Produktionsbedingungen angepasst sein (offene oder geschlossene Prozesse).¹³

Angemessene Prozeduren sollen vorhanden sein um Kontaminationen zu entdecken und die einzuleitenden Maßnahmen beschreiben. Das beinhaltet Prozeduren, die die Auswirkung der Kontaminationen auf das Produkt beschreiben, sowie die Prozeduren, die die Ausrüstung dekontaminieren und in einen Zustand versetzen in dem diese wieder für weitere Chargen eingesetzt werden können.¹³

Teil des Qualitätsmanagement-Systems ist es ein effektives System zu installieren das die aktive Mitarbeit von Management und Fachkräften erfordert.¹³

In Kapitel 4 Teil 1 des EUDRALEX GMP VOL 4 ist die Dokumentation verschiedener Prozesse u.a. auch des Umgebungsmonitorings als wichtiger Bestandteil des Qualitätsmanagement-Systems festgehalten.¹⁵

Schon aufgrund der Nutzung der Anlage (Übungsbetrieb mit Studierenden aber auch Forschungsbetrieb) kann diese den hohen Anforderungen der in der Industrie geforderten Guten Herstellungspraxis nicht gerecht werden. Zielführend ist hier also ein System einzuführen, dass sich an der Guten Herstellungspraxis orientiert und damit GMP-nah ist.

3.1.1 Prozesscharakteristika

- a) Alle Prozessschritte zur Herstellung eines GMP-relevanten Produktes sollen in Räumlichkeiten und mit Geräten durchgeführt werden, die dafür geeignet sind. Des Weiteren ist die Arbeitsweise so zu wählen, dass das Kontaminationsrisiko minimiert ist.¹³
- b) Wenn offene Systeme verwendet werden, soll die Aufreinigung unter Umgebungsbedingungen stattfinden, die angemessen für eine Erhaltung der Produktqualität sind.¹³

3.1.2 Personal

- c) Je nach den Erfordernissen können unterschiedliche Hygieneprogramme des Personals in einer Firma zur Anwendung kommen. Jede Person, die sich in einem Bereich aufhält, hat dasjenige Hygieneprogramm zu kennen und strengstens Folge zu leisten. Diese Hygieneprogramme sollen durch das Management getragen und über Schulungen vermittelt werden.²⁴
- d) In der Guten Herstellungspraxis werden medizinische Untersuchung des Personals bei deren Einstellung durchgeführt.²⁴

3.1.3 Reinigung und Wartung

- e) Ausrüstung und Utensilien sollen zu geeigneten Zeitintervallen gereinigt, gewartet und desinfiziert werden um eine Fehlfunktion oder Kontamination zu vermeiden, die die Sicherheit, Identität, Stärke, Qualität oder Reinheit des Arzneiproduktes über die offiziellen oder anderer festgelegter Anforderungen hinaus verändert.²⁵ Mehrfache aufeinanderfolgende Chargen ohne Reinigung können durchgeführt werden, wenn die Produktqualität nicht kompromittiert wird.¹³
- f) Räumlichkeiten sollen vorsichtig gewartet werden, sodass sichergestellt werden kann, dass Wartungs- und Reparaturarbeiten kein Risiko für die Produktqualität darstellen. Räumlichkeiten sollen nach schriftlichen Vorgaben gereinigt und, wenn möglich, desinfiziert werden.²⁶
- g) Wenn Behältnisse wiederverwendet werden, sollen diese in Einklang mit den schriftlichen Anleitungen gereinigt sein und alle vorherigen Beschriftungen entfernt oder unleserlich gemacht werden.¹³

- h) Akzeptanzkriterien für Rückstände sowie die Reinigungsprozedur und Wahl der Reinigungsmittel sollen festgelegt und gerechtfertigt werden.¹³
- i) Lagerräume sollen für alle Arten von Substanzen unter geeigneten Bedingungen (sauber, trocken, in akzeptablem Temperaturbereichen²⁶) verfügbar sein. Wenn Bedingungen kritisch für Produkte sind, sollen diese notiert werden.¹³ Überflüssige Primärverpackung soll vernichtet werden.²⁷ Waschbereiche von Geräten sollen von den Trocken- und Lagerbereichen räumlich getrennt sein.²⁷
- j) Schriftliche Vorgänge sollen etabliert sein, die jemandem die Verantwortung für die Reinigung übertragen und auch den Reinigungsplan, das zu reinigende Material und die Reinigungsmittel beschreibt.¹³
- k) Es sollen schriftliche Vorgänge gemacht werden, wie Nagetierbekämpfungsmittel, Insektizide, Fungizide, Begasungsmittel sowie Reinigungs- und Desinfektionsmittel eingesetzt werden. Nagetierbekämpfungsmittel, Insektizide und Fungizide sollen nur eingesetzt werden, insofern diese registriert sind und im Einklang mit dem „Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act“ der FDA sind.²⁵
- i) Eine schriftliche Aufzeichnung über die Reinigung von großen Geräten, die Wartung (ausgenommen Routinewartungen wie Schmierfetten) und die Benutzung sollen in gerätespezifischen Logbüchern gemacht werden. Darin soll Datum, Zeit, Produkt und Lotnummer jeder Charge festgehalten werden. Die Personen, die Reinigung oder Wartung durchführen oder diese gegenprüfen, sollen im Originalprotokoll unterschreiben und das Datum angeben oder zumindest mit einem Kürzel angeben, dass die Arbeit durchgeführt wurde. Einträge im Protokoll sollen in chronologischer Reihenfolge erfolgen.²⁵

3.1.4 Schulung

- l) Schulungen und Trainings sollen regelmäßig durch eine qualifizierte, autorisierte Person durchgeführt werden und sollten zumindest die Tätigkeiten abdecken, die der Mitarbeiter durchführt. Aufzeichnungen über Trainings sollen aufbewahrt werden. Trainings sollen periodisch wiederholt werden.¹³

- m) Technische Maßnahmen
 - Einwegmaterial verwenden
 - Gewidmete Geräte (dedicated equipment)
 - Kontrollierte Staubentfernung
 - Einfach zu säubernde Geräte
 - Nutzen von Cleaning-in-Place (CIP)
 - Risikominimierung der Kontamination durch rezirkulierende Luft
 - Waschbereiche von Geräten von Trocken- und Lagerbereichen trennen²⁷

- n) Organisatorische Maßnahmen
 - Bestimmte Schutzkleidung in Räumlichkeiten lassen, die hohes Kontaminationsrisiko haben
 - Reinigungsverifizierung nach jeder Produktkampagne stellt Funktionieren des Qualitätsrisikomanagements sicher
 - Reinigungsverifizierung der Oberflächen und der Luft zwischen Produktionsbereich und umliegenden Räumen
 - Spezielle Vorgangsweisen für Abfall, verschmutztes Wasser und verschmutzte Kleidung
 - Notieren von Leckagen, Beinaheunfällen, Produktabweichungen
 - Gestalten des Reinigungsprozesses, ohne dass dieser das Kontaminationsrisiko erhöht
 - Detaillierte Aufzeichnung der Reinigung und Markierung der gereinigten Geräte
 - Aufsicht der Mitarbeiter zur Einhaltung der Regeln und Schulungen²⁷

3.2 Was ist eine Pilotanlage?

Laut Duden¹⁶ bezeichnet eine Pilotanlage eine Versuchsanlage, die als Zwischenstufe zwischen Labor und Großproduktion genutzt wird. Im vorliegenden Fall wird diese Pilotanlage als biotechnologisch ausgerichtete Anlage für die industrielle Ausbildung und zur Abwicklung von Forschungsprojekten genutzt. Bezüglich der Ausbildung soll auf höchstem Niveau die praktische Umsetzung der Bioverfahrenstechnik und die Grundzüge des GMP-Konzeptes vermittelt werden. Durch die eingebetteten Forschungsprojekte in der Anlage sollen für unsere Forschungspartner und Studierenden industrierelevante Verfahren und Vorgangsweise entwickelt werden. Dies kann nicht im Labor durchgeführt werden, sondern kann nur in einer Pilotanlage erfolgen.

3.3 Was bedeutet Mehrzweck-Anlage (multi-purpose)?

Kontamination beschreibt die Verunreinigung des Produkts oder der Einrichtungen aufgrund externer Ursachen, wie z.B. Staub oder Schmutz aus der Umgebung.¹⁷

Risiko für Bestimmung der Reinraumklassifizierung wird durch Geschlossenheit des Prozesses, die Nutzung der Anlage sowie die Art der verwendeten Organismen bestimmt. „Ein Prozess ist dann geschlossen, wenn durch die Art der Apparate und die Prozessführung ausgeschlossen werden kann, dass der Produktstrom mit der Umgebung in Berührung kommen kann.“ (Zitat¹²)

4 Methoden und Materialien

4.1 Methode des Risikomanagements

Um Risikomanagement betreiben zu können, ist es wichtig bestimmte Werkzeuge festzulegen und anzuwenden nach denen man einen Prozess oder ein Verfahren analysieren kann.

Im Anhang der Richtlinie Q9 der ICH sind verschiedene Methoden beschrieben wie bei einem pharmazeutischen Hersteller dieses Qualitätsrisikomanagement durchzuführen sein kann.⁴

Für die vorliegende Fragestellung habe ich mich für die Fehlermöglichkeits- und -einflussanalyse (FMEA) entschieden. Dabei werden komplette Prozesse in kleinen Teilprozessen aufgeteilt und die Risiken der einzelnen Teilprozesse in Bezug auf die Kontamination der gesamten biotechnologischen Anlage gesetzt. Die Risiken werden dann in drei Kategorien (Auftrittswahrscheinlichkeit, Detektionswahrscheinlichkeit und der Schwere des Fehlers) eingeteilt und mit Zahlen bewertet. Diese Zahlen werden miteinander multipliziert und daraus ergibt sich die Risikoprioritätszahl. Diese eignet sich dazu eine Rangordnung der wichtigsten und größten Risiken für den Prozess zu erstellen. Ist die Risikoprioritätszahl größer als ein bestimmter Wert, wird dieses Risiko als nicht akzeptierbar eingestuft und es ist erforderlich Maßnahmen für die Reduzierung dieser Risiken einzuführen. Anschließend wird eine weitere Risikobewertung der Kriterien durchgeführt.

4.1.1 Einteilung der Kriterien

Die Bewertungskriterien werden wie folgt eingeteilt:

Tabelle 1, Bewertungskriterien

	Grün	Orange	Rot
Auftreten	Selten	mittel	häufig
Detektion	wahrscheinlich	mittel	schwierig
Bedeutung	niedrig	mittel	hoch

Seltenes Auftreten, wahrscheinliche Detektion und eine niedrige Bedeutung für die gesamte Anlage habe ich also die Farbe Grün zugewiesen. Orange waren mittlere Wahrscheinlichkeiten zu Auftreten und Detektion sowie einer mittleren Bedeutung. Alarmfarbe Rot bekommen die Einstufungen häufiges Auftreten, schwierige Detektion und eine hohe Bedeutung der Anlagenkontamination.

4.1.2 Regeln für die Bewertung der Akzeptanz

Die Kriterien wurden in akzeptierbare und nicht akzeptierbare Risiken unterteilt. Grundlage dieser Einteilung sind folgende Regeln:

Sind alle Kriterien im grünen Bereich, wird das Risiko akzeptiert.

Sind zwei Kriterien im grünen Bereich und eines im orangenen, wird das Risiko akzeptiert.

Ist ein Kriterium im roten Bereich und beide anderen Kriterien grün, wird das Risiko akzeptiert.

Ist ein Kriterium rot und mindestens ein anderes orange, wird das Risiko nicht akzeptiert.

Sind zwei Kriterien rot, wird das Risiko nicht akzeptiert.

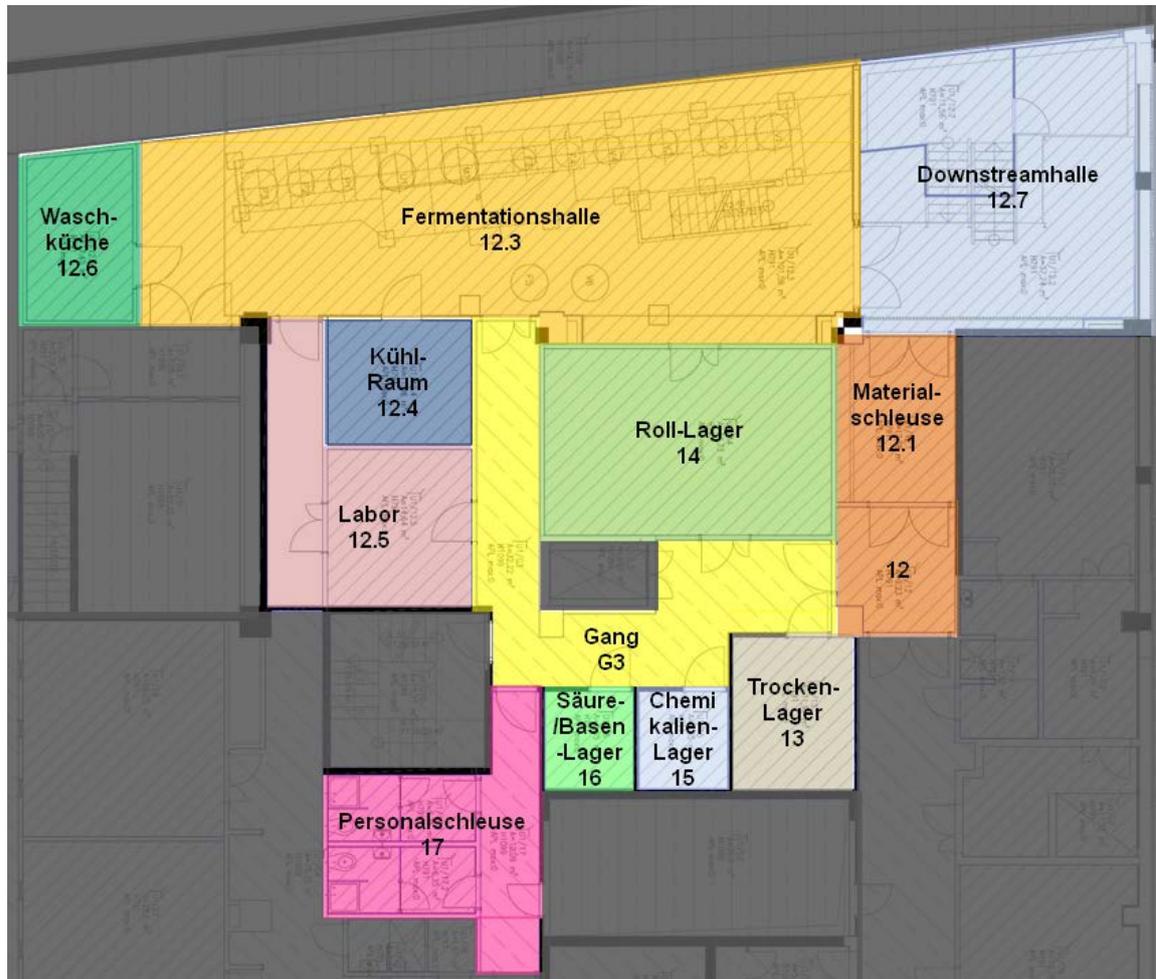
Tabelle 2, Akzeptanzkriterien

Akzeptiert	Nicht akzeptiert
3xgrün	3xrot
2xgrün + 1xorange	1xorange + 2xrot
2xgrün + 1xrot	1xgrün+ 2xrot
	1xgrün +1xorange + 1xrot
	1xgrün + 2xorange

Unterscheidet sich die Bedeutung des Fehlers im Studenten- von dem im Forschungsbetrieb, wird die höhere Bedeutung für die Akzeptanz-Einstufung angewendet (Rot vor Orange, Orange vor Grün).

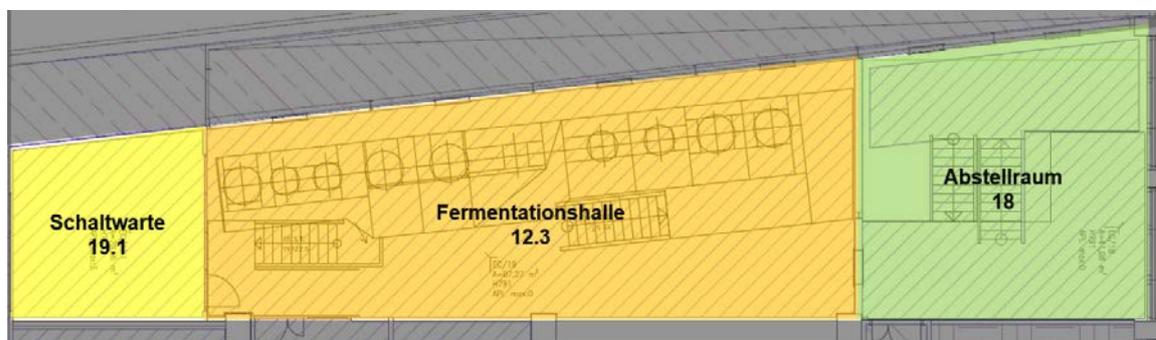
4.2 Raumplan und Nutzung

Abbildung 1



Raumplan Pilotanlage Untergeschoss

Abbildung 2



Raumplan Erdgeschoss

Abbildung 4



Tellerseparator in Fermentationshalle

Abbildung 3



Homogenisator in Fermentationshalle

In der Fermentationshalle (UG/12.3 sowie EG/19) befindet sich die

biotechnologische Anlage zur Fermentation verschiedener Organismen. Das benötigte Nährmedium für die Kultivierung wird im selben Raum eingewogen und in einen offenen Behälter eingefüllt, aufgelöst und anschließend sterilfiltriert und über ein festinstalliertes Rohrsystem in einen weiteren Kessel gepumpt. Die Fermentation findet dann in einem geschlossenen System statt welches alle erforderlichen

Abbildung 5



Arbeitsbereich Downstreamhalle

Zuleitungen besitzt für Flüssigkeiten, Gase, sowie für das Inokulum. Nachdem die Fermentation abgeschlossen ist, kommt es zur sogenannten Ernte. Im ersten Aufarbeitungsschritt wird das Gemisch aus Medium und Organismen separiert und das Produkt gewonnen. Die entsprechenden Volumina werden entweder über einen Tellerseparator und/oder Homogenisator in der Fermentationshalle prozessiert.

In der Downstreamhalle (UG/12.7) finden die weiteren Aufreinigungsschritte, der Substanzen statt, die durch die Fermentation gewonnen wurden. Hier befinden sich Separatoren, Zentrifugen, ein Homogenisator und mehrere chromatographische Geräte (HPLC, FPLC).

Abbildung 6



Waschküche

Im Kühlraum (UG/12.4) lagern Substanzen, die eine Umgebungstemperatur von 4-8°C benötigen. Hier können auch Kulturüberstände zwischengelagert werden.

Das Roll-Lager(UG/14) sowie das Trockenlager(UG/13) sind für die Lagerung von Geräten und Utensilien bestimmt.

Abbildung 7



Erdgeschoss Fermentationshalle, Blick Richtung Abstellraum

Im Säure-/ Basen-Lager (UG/16) werden stark basische und saure Chemikalien sowie Ethanol gelagert.

Das Chemikalienlager (UG/15) beinhaltet alle weiteren Chemikalien.

In der Waschküche(UG/12.6) befinden sich ein Autoklav, ein Trockenschrank, eine Spülmaschine sowie eine große Spüle.

Die Materialschleuse(UG/12 und UG/12.1) dient als Vorraum. Hier werden Materialien angeliefert und können von innen entgegen genommen werden.

Zutritt zum Technikum erhalten Personen nur über die Personalschleuse (UG/17). Hier befinden sich Toiletten sowie eine Garderobe.

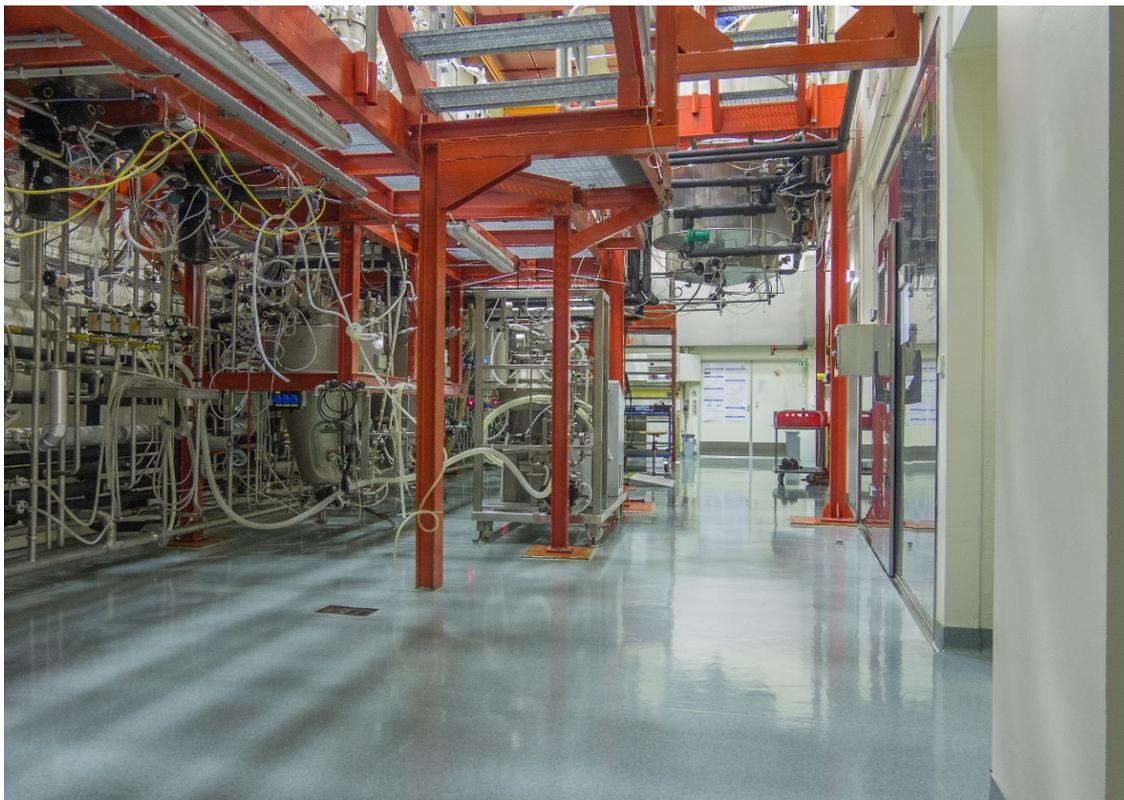
Das Labor (UG/12.5) beinhaltet eine Sterilwerkbank, eine Waage und eine Arbeitsplatte.

Im Erdgeschoss befindet sich die Schaltwarte (EG/19.1), in der einige Computer und Schränke stehen.

Im Abstellraum (EG/18) stehen momentan einige Gefriergeräte. Dieser Raum kann nicht von anderen Räumen des Technikums aus betreten werden, besitzt aber eine Luftverbindung zu der darunterliegenden Downstreamhalle.

In der Fermentationshalle (UG/12.3 sowie EG/19) ist es möglich über eine Treppe zur Schaltwarte zu gelangen.

Abbildung 8



Untergeschoss Fermentationshalle, Blick Richtung Downstreamhalle

4.3 Monitoring

Tabelle 3, Materialien

Bezeichnung:	Firma
CASO-Abklatsch-Agar	Merck Heipha
CASO-Agar mit LTH	Merck Heipha
Hycon Biotest LKS-Streifen	Merck Heipha
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,4-phenylendiamin	Biomérieux
RCS Luftkeimsammler	Merck Heipha
Sabouraud-Dextrose-Agar	Merck Heipha

Alle nicht genannten Materialien wurden an der Universität hergestellt und waren verfügbar (Safraninlösung z.B.).

4.3.1 Durchführung Umgebungsmonitoring

Bevor die Messung gestartet wird, wird die Raumtemperatur bestimmt. Zusätzlich wird dokumentiert, wie viele Personen sich über die Zeit der Probenahme im Technikum befinden. Ob die Türen offen stehen oder geschlossen sind, wird für das Monitoring beibehalten.

Die Sedimentationsplatten werden mit geschlossenem Deckel an ihre ausgesuchten Plätze gelegt und dann in einem Durchgang alle Platten geöffnet. Die Sedimentationsplatten werden für 4 Stunden geöffnet. Dazu werden diese auf dem Boden mit der Medienseite nach oben zeigend ausgelegt. Anschließend wird der Deckel wieder geschlossen und die Platte mit Parafilm umwickelt. Das Mindesthaltbarkeitsdatum der Sedimentationsplatten datiert auf den 18.01.2016.

Abbildung 9



Luftkeimsammler an Stativ in einem Meter Höhe befestigt, links unten Sedimentationsplatte

Der Luftkeimsammler wird vertikal zum Boden auf einem Stativ mit der Rotoröffnung in 1 m Höhe nach oben zeigend aufgestellt. Vor jedem Benutzen des Luftkeimsammlers wird dieser mit 70% Ethanol (v/v) abgesprüht und für 30 Sekunden der Rotor eingeschaltet, ohne dass sich ein Luftkeimsammelstreifen im Zentrifugalsammler befindet. Die Luftkeimsammelstreifen werden mit der Medienseite zum Rotor hin außen um den Rotor eingeführt. Die Luftkeimsammlung wird an jedem Ort für 8 Minuten bei einem Luftdurchsatz von 40 L/min durchgeführt. Nach Ablauf der aktiven Luftkeimsammlung wird der Streifen wieder entnommen und in die durchsichtige Verpackung zurückgeführt. Hierbei ist es wichtig, darauf zu achten, dass das Medium in Richtung der Luftkammer in der Verpackung zeigt. Die Luftkeimsammelstreifen haben ein Mindesthaltbarkeitsdatum, das auf den 27.01.2016 datiert ist.

Abklatschplatten besitzen ein leicht hervorstehendes Medium und mit 60 mm einen kleineren Durchmesser (60mm) als die Sedimentationsplatten (90mm), wodurch es einfach ist dieses Medium mit der gewünschten Oberfläche in Kontakt zu bringen.¹⁸ Für die Probenahme mit einer

Abbildung 10



Abklatschplatte auf Bedienfeld des Tellerseparators (CP15)

Abklatschplatte wurde das Medium mit dem Beprobungsort möglichst vollständig in Kontakt gebracht.

Nach dem Abklatsch wird der Deckel wieder auf die Schale gesetzt und mit Parafilm umwickelt. Die Abklatschplatten haben ein Mindesthaltbarkeitsdatum, das am 26.06.2016 abläuft.

Für die Voruntersuchung wurden nur die Räume untersucht, die eine direkte Verbindung zur Fermentationshalle haben. Das betrifft den Kühlraum (UG/12.4), das Rolllager (UG/14), die Waschküche (UG/12.6), die Downstreamhalle (UG/12.7) und den Gang (UG/G3). Die Luftkeimsammlung wurde einen Meter hinter der Türschwelle im angrenzenden Raum durchgeführt. Es wurde vermieden, dass der Luftstrom (durch Eintreten der Messperson) diese Ergebnisse verfälscht. Hierzu wird nach Betreten des Raumes eine Zeit von einer

Minute abgewartet und erst dann mit der Messung begonnen. Beim Monitoring in Ruhe- und Betriebszustand wird jede Stelle einer Sedimentationsplatte auch mit einer aktiven Luftkeimsammlung überprüft.

Für das Monitoring 1 und 2 (im Ruhezustand, das bedeutet keine Personal- und Prozessaktivität) wurde in jedem Raum in der Pilotanlage gemessen. Für das Monitoring 3 und 4 (im Betriebszustand, also bei Personal- und Prozessaktivität) sowie das Monitoring 5 (im Ruhezustand) ist eine verringerte Anzahl an Probenahmen gewählt. Siehe dazu *Tabelle 4* sowie *Abbildung 17* und *Abbildung 18*.

Neben dem obligatorischen zweiteiligen Schutzanzug sowie geeigneten Schuhen und einer Schutzbrille, habe ich zusätzlich zur Messung ein Haarnetz und eine Gesichtsmaske getragen.

4.3.1.1 Nährmedien

In der Voruntersuchung wurden je Beprobungsstelle eine Müller-Hinton-Platte ausgelegt. Zusätzlich wurden im kritischen Bereich der Fermentationshalle pro Beprobungsstelle jeweils eine Platte des Baird-Parker-Agars, eine Platte des XLD-Agars und eine Platte des Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agars ausgelegt. Für Monitoring in Ruhe- und Betriebszustand wurden dann als Nährmedien nur noch Casein-Soja-Pepton-Agar (TSA) und Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA) verwendet.

Das Nährmedium der Luftkeimsammelstreifen besteht auch aus Casein-Soja-Pepton-Agar.

Als Abklatschplatten werden ebenfalls Casein-Soja-Pepton-Platten verwendet.

4.3.1.2 Wahl der Probenahmeorte

Die genaue Platzierung des Luftkeimsammlers sowie der Abklatsch- und Sedimentationsplatten werden in *Abbildung 17* und *Abbildung 18* beschrieben und vor Ort mit grünem Klebeband eindeutig markiert.

Tabelle 4, Anzahl der Probenahmen

Raum	Größe in m ² (gerundet)	Voruntersuchung	In Ruhe	Im Betrieb
Fermentationshalle	100	10	10	4
Abstellraum EG	41	0	3	0
Downstreamhalle	37	3	4	2
Rolllager	35	2	3	1
Gang	32	1	4	1
Labor	25	3	3	0
Materialschleuse	22	2	2	2
Schaltwarte	21	1	2	0
Trockenlager	12	0	1	0
Kühlraum	12	1	1	0
Waschküche	11	1	1	1
Personalschleuse	10	2	1	1
Chemikalienlager	6	0	1	0
Säure-/Basenlager	6	0	1	0

Für die Voruntersuchung wurde an jedem direkt in die Fermentationshalle angrenzenden Raum 1 Meter hinter der Türschwelle ein Probenahmepunkt mit aktiver und passiver Luftkeimsammlung gesetzt.

Als Probenahmeorte für Abklatschplatten werden vorrangig glatte Oberflächen ausgewählt (Tisch, Geländer, Türgriff), da diese möglichst vollständig mit der Medienoberfläche in Kontakt zu bringen sind. Um zu zeigen wie stark die mikrobielle Belastung an bedienten Computern ist, wird die Computermaus mit einer Abklatschplatte überprüft.

4.3.1.3 Umgebungsmonitoring im Ruhezustand

Eine Boden-Grundreinigung der Firma ISS Facility Services GmbH fand in der Woche statt, bevor das erste Monitoring im Ruhezustand durchgeführt wurde. Dabei wird der Boden nicht nur aufgewischt, sondern die Oberfläche zusätzlich versiegelt, sodass Partikel nicht am Boden anhaften und dort akkumulieren können. Die Grundreinigung konnte erst 48 Stunden vor Beginn des Monitorings abgeschlossen werden.

Am Tag vor der Durchführung des ersten Monitorings im Ruhezustand wurde die Pilotanlage noch bis mittags um 12 Uhr betreten.

Sowohl beim ersten wie auch beim zweiten Monitoring im Ruhezustand habe ich in der Downstreamhalle, der Materialschleuse, dem Trockenlager, der Säure-/Basenlager, dem Chemikalienlager, der Personalschleuse, dem Gang, dem Labor, sowie dem Kühlraum und der Waschküche die Luftkeimsammlung durchgeführt, während die Sedimentationsplatten geöffnet aufgestellt waren.

Die Luftkeimsammlung in Fermentationshalle, Rolllager, Schaltwarte und Abstellraum im Erdgeschoss wurden daher durchgeführt als die Sedimentationsplatten schon geschlossen und in Parafilm eingewickelt waren.

Vor dem Monitoring 2 (im Ruhezustand) wurde die Pilotanlage für 36 Stunden nicht betreten.

Monitoring 5 wurde durchgeführt 15 Minuten nachdem alle Personen die Anlage verlassen hatten.

4.3.1.4 Kultivierung

Die Nährmedien der Luftkeimsammlung, Sedimentations- sowie Abklatschplatten werden dann für fünf Tage bei 20-25°C und anschließend für weitere drei Tage auf 30-35°C inkubiert, also insgesamt für acht volle Tage. Jeden Tag (außer an den Tagen 3 und 4 der Inkubation) wird die Gesamtkeimzahl sowie die Anzahl der Pilzkolonien ausgezählt und protokolliert.

4.3.2 Einordnung häufigster Kolonien

Es werden einzelne Kolonien der kultivierten Nährmedien aus der Voruntersuchung aseptisch entnommen und eine Reinkultur daraus angelegt, indem diese mit der Impföse auf eine frische Platte mit Müller-Hinton-Agar im Drei-Ösen-Ausstrich ausgestrichen werden. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wird wiederum eine einzelne Kolonie dieses Ausstrichs entnommen, mittels Drei-Ösen-Ausstrichs auf eine neue Müller-Hinton-Platte ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Mit einer Kolonie dieser Platte können nun folgende biochemische Tests gemacht werden:

4.3.2.1 Gram-Färbung

Objektträger werden mit einer Pinzette in eine Alkoholwanne getaucht und anschließend über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Wassertropfen werden mittig auf den Objektträger aufgebracht, ohne dass diese sich vermengen. Von der Reinkultur wird mit der abgeflammten Impföse eine Kolonie entnommen und mit einem Wassertropfen auf Objektträger vermengt. Die Impföse wird danach wieder abgeflammt und kann weiterverwendet werden. Damit werden nun als Kontrolle in den anderen Wassertropfen ein grampositiver und ein gramnegativer Mikroorganismus aufgebracht. In meinem Fall ist das *Staphylococcus capitis* und *Escherichia coli*. Danach wird mit dem Rand eines weiteren Objektträgers jeder Wassertropfen zur Breitseite des Objektträgers hin ausgestrichen und anschließend an der Luft trocknen gelassen. Danach werden die Mikroorganismen auf dem Objektträger hitzefixiert. Der Objektträger wird dazu dreimal durch die Flamme des Bunsenbrenners horizontal gezogen, sodass die „saubere“ Seite nach unten zeigt. Für den Färbeprozess wird anschließend der Objektträger 1 Minute in Kristallviolett behandelt. Alle Bakterien nehmen das Kristallviolett auf. Der Objektträger wird nun mit RO-Wasser abgespült und dann für 1 Minute in Lugolscher Lösung behandelt. Dabei bilden sich in allen Mikroorganismen große, blaue Farbkomplexe.

Der Objektträger wird ein weiteres Mal mit RO-Wasser abgespült und dann für 30 Sekunden in 96% Ethanol getaucht. Dieses Alkoholbad bewirkt bei gramnegativen Bakterien eine Entfärbung, bei grampositiven geschieht dies

aufgrund der deutlich dickeren Mureinschicht allerdings nicht. Als Gegenfärbung wird nun der Objektträger für 10 Sekunden in ein alkoholisches Safraninbad gelegt. Die gramnegativen Bakterien können diesen Farbstoff aufnehmen und erscheinen deshalb als rosa unter dem Lichtmikroskop. Die grampositiven Bakterien nehmen diesen Farbstoff nicht mehr auf und haben unter dem Lichtmikroskop ein dunkelblaues Erscheinungsbild.

4.3.2.2 CytochromC–Oxidase–Test

Ein Filterpapier wird auf den Objektträger aufgelegt und mit zwei Tropfen RO-Wasser befeuchtet. Mit einer Impföse wird eine Reinkulturkolonie aseptisch entnommen, die zwischen 24-48h alt ist. Diese wird nun mit einigem Druck auf dem Filterpapier verrieben. 2 Tropfen Oxidase-Nachweisreagenz (*N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin) werden auf das Filterpapier aufgebracht. Färbt sich das Filterpapier innerhalb von 10-30 Sekunden blau, so ist der Test positiv. Ist kein Farbumschlag erkennbar, ist die Reaktion negativ.

4.3.2.3 Katalase-Test

Auf einem Objektträger wird ein Tropfen 3% H₂O₂-Lösung aufgebracht. Eine Reinkulturkolonie wird aseptisch entnommen und mit dem Tropfen Wasserstoffperoxid verrieben. Zur besseren Blasendetektion wird ein Deckglas auf das Gemisch aufgelegt und dieses kann dann unter dem Mikroskop betrachtet werden. Bilden sich nach einer Minute Gasblasen, ist der Katalase-Test positiv.

4.3.2.4 Sporenfärbung

Die Objektträger werden mit einer Pinzette in die Alkoholwanne getaucht und anschließend über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Ein Wassertropfen wird auf den Objektträger aufgebracht. Eine Reinkulturkolonie wird aseptisch entnommen und mit dem Wassertropfen vermengt, mit einem Objektträger ausgestrichen und an der Luft trocknen gelassen. Es folgt eine Hitzefixierung (wie bei der Gramfärbung beschrieben). Der Objektträger wird für 10 Minuten in Malachitgrün behandelt. Anschließend mit RO-Wasser gespült und für 10 Sekunden in wässrige Safraninlösung gestellt, woraufhin wieder ein Spülschritt mit RO-Wasser folgt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Fehlermöglichkeits- und -einflussanalyse (FMEA)

Diese Methodik wurde in den 1960er- Jahren von der Luft- und Raumfahrtindustrie entwickelt.¹⁹ Mit der Fehlermöglichkeits- und -einflussanalyse ist es möglich bekannte, aber auch potenzielle Fehler zu beschreiben, diese zu bewerten und daraus eine Rangordnung der Fehler zu machen um diese dann zu verhindern oder zumindest abschwächen zu können. Aufgrund seiner logischen Herangehensweise der Fehleranalyse bringt eine FMEA nützliche Informationen zutage, die weiterhelfen das Risiko von Qualitätseinbußen zu verringern. Für jeden Fehler wird hierbei der Effekt auf das komplette System bewertet.²⁰

In meinem Fall wurde diese Methode im Hinblick auf eine Kontamination der Umgebung und potentiell des Prozesses sowie der prozessierten Organismen angewendet. Die Bewertungskriterien hierbei sind die Bedeutung des Fehlers, dessen Auftretswahrscheinlichkeit sowie die Wahrscheinlichkeit diesen Fehler zu detektieren.

Für den Start einer Fehlermöglichkeits- und –einflussanalyse muss sich ein multidisziplinäres Team bilden, welches Expertise in dem betreffenden Bereich besitzt. Eine FMEA soll niemals von lediglich einer Person durchgeführt werden. Eine einzelne Person kann immer eine gewisse Befangenheit haben und / oder keine umfassende Expertise haben und damit ist das Ergebnis der FMEA von der individuellen Perspektive zu stark beeinflusst.²⁰ Teil des Teams waren aus diesem Grund die stellvertretende Leiterin des Departments für Biotechnologie (DBT), Dr. Karola Vorauer-Uhl, der Leiter der Pilotanlage, Dr. Markus Luchner, Biologin und Monitoring-Expertin, Dr. Jutta Mattanovich, sowie die beiden wissenschaftlichen Mitarbeiter mit Expertise in der Pilotanlage, Sabine Necina und Clemens Keinprecht.

In *Abbildung 11 - Abbildung 13* sind die von mir identifizierten Risiken aufgelistet.

Abbildung 11

Ref.	Prozess	Risiko	Grund	
1.1	Allgemeines	Bekleidung/Schuhe	fehlende Schulung des Personals	
1.2		Hände	fehlende Schulung des Personals	
1.3.1		Raumluftechnische Anlage nicht intakt	Filter verblockt	
1.3.2			Filter gerissen/fehlend	
1.3.3			Anlage ausgefallen	
1.4		unklare Verantwortlichkeiten	fehlende Schulung des Personals	
1.5.1		Reinigung	Reinigungspersonal	
1.5.2			Forschungspersonal	
1.6		Mitarbeiter mit Infektionskrankheit	Mitarbeiter kommt krank zur Arbeit	
1.8		Ungeziefer	Loch in Wand	
1.9	Kanal/Abflüsse	Austrocknen von Siphons		
1.10	ungeregelter Zugang	Besuch unkontrolliert in Technikum		
3.1	Transport	Transporthilfen	fehlende Schulung des Personals	
3.2.1		Unfall	fehlende Schulung des Personals	
3.2.2			Transporthilfe fehlend/falsch	
4.1.1	Lagerung		Fehlverhalten des Personals	
4.1.2			Beschriftung ungenügend	
4.1.3			falsche Temperatur	
4.1.4		Lagerung nicht korrekt (außer Haus Waren)	falsche Feuchtigkeit	
4.1.5			falsches Behältnis	
4.1.6			Zeitlimitierung	
4.1.7			Aliquotierung	
4.2.1			Fehlverhalten des Personals	
4.2.2			Beschriftung ungenügend	
4.2.3			falsche Temperatur	
4.2.4	Lagerung nicht korrekt (in-house Waren)	falsche Feuchtigkeit		
4.2.5		falsches Behältnis		
4.2.6		Zeitlimitierung		
4.2.7		Aliquotierung		
4.3	Teilentnahme		ungeeignete Entnahme	

Risikoidentifizierung (Teil 1/3), eingeteilt nach Prozessen, das Risiko dieses Prozesses und der mögliche Grund für das Risiko

Abbildung 12

Ref.	Prozess	Risiko	Grund
5.1.1	Sterilwerkbank		Reinigung nicht ausreichend
5.1.2			Funktionalität
5.1.3			Fehlverhalten des Personals
5.2	Inokulum	Master-/Arbeitszellbank	kontaminiert
5.2.1			Reinigung nicht ausreichend
5.2.2			nach Autoklavieren Transport/Lagerung unverschlossen
5.3	Kreuzkontamination		gleichzeitiges Arbeiten mit anderen Zellen/MO's
6.1	Medieneinwaage	Kontamination über Partikel	Luftturbulenzen
8.1	Medien-/ Puffer- ansatzbehälter V1	Reinigung	Reinigung nicht ausreichend
8.2		Sekundärkontamination durch Leitung	Bedienfehler
8.3.1		Grundreinigung	Konzentration der Natronlauge zu gering
8.3.2			Dauer der Behandlung zu kurz
9.1		Reinigung	Reinigung nicht ausreichend
9.2	Transfer in Sterilfiltration SF	Sekundärkontamination durch Leitung	Bedienfehler
9.3.1		Grundreinigung	Konzentration der Natronlauge zu gering
9.3.2			Dauer der Behandlung zu kurz
10.1.1	Sterilfiltration	Medium nach SF nicht steril	Filter falsch
10.1.2			Filter defekt
10.2		Sekundärkontamination durch Leitung	Bedienfehler
10.3.2		Kontamination	Ventil fehlerhaft/Ventilmembran
11.3.2	Vorbehandlung Medienlagerbehälter V3	Sterilisation	Sterilisationstemperatur zu kurz gehalten
11.3.3			Sterilisationstemperatur nicht erreicht
12.1	Transfer in Medienlagerbehälter V3	Sekundärkontamination durch Leitung	Bedienfehler
13.1.2	Medienlagerbehälter V3	Kontamination	Ventil fehlerhaft/Ventilmembran
13.1.3			Dichtring porös
13.2.1		Riss des Schlauchs	unsachgemäße Behandlung
13.2.2			Materialermüdung
13.3		Probenahme	

Risikoidentifizierung (Teil 2/3). eingeteilt nach Prozessen. das Risiko dieses Prozesses und der mögliche Grund für das Risiko

Abbildung 13

Ref.	Prozess	Risiko	Grund	
14.1.1	Vorbehandlung Mikrobiologie fermenter F3	Grundreinigung	Konzentration der Natronlauge zu gering	
14.1.2			Dauer der Behandlung zu kurz	
14.1.3			Sprüschatten in Kessel	
14.3.2			Sterilisation	Sterilisationstemperatur zu kurz gehalten
14.3.3			Sterilisation	Sterilisationstemperatur nicht erreicht
15.1	Transfer in	Sekundärkontamination durch Leitung	Bedienfehler	
15.2.1	Mikrobiologieförderer F3	unsterile Materialien(Pumpenschläuche)	Reinigung nicht ausreichend	
15.2.2			nach Autoklavieren bei Transport/Lagerung/Anschließen unsteril geworden	
16.1	Mikrobiologieförderer F3	Sekundärkontamination durch Leitung	Bedienfehler	
16.2.2		Kontamination	Ventil fehlerhaft/Ventilmembran	
16.2.3		Gase kontaminiert	Dichtring porös	
16.3		Flüssigkeiten kontaminiert	Filter nicht intakt	
16.4		Feed kontaminiert	unsteril	
16.5		Batch kontaminiert	unsteril	
16.6		Septum	unsteril	
16.7.1		Riss des Schlauchs	ungenügendes Abflammen vor Anstechen des Septums	
16.7.2		Riss des Schlauchs	Anstechnadel nach Durchstechen des Septums wieder herausgezogen	
16.8.1		Riss des Schlauchs	unsachgemäße Behandlung	
16.8.2		Probenahme	Materialermüdung	
16.9				fehlende Schulung des Personals

Risikoidentifizierung (Teil 3/3), eingeteilt nach Prozessen, das Risiko dieses Prozesses und der mögliche Grund für das Risiko

Die Bewertung der Risiken habe ich nicht mittels Risikoprioritätszahl beschrieben, sondern den Risiken qualitative Bewertungen mittels „fuzzy“ linguistischen Termini²¹ wie selten, schwierig und mittel zugeordnet. Die Menschen benutzen im Allgemeinen linguistischen Termini um einen Sachverhalt zu bewerten.²² Diese Begriffe nennt man in der Mathematik „fuzzy“. Das bedeutet sie sind von ihrer Natur her schwammig, können und werden aber auch zur Entscheidungsfindung herangezogen.²¹

Das Bewertungskriterium Bedeutung (Schwere des Fehlers) habe ich in zwei mögliche Szenarien unterschieden. Zum einen wird die Bedeutung im Studentenbetrieb ermittelt und zum anderen die Bedeutung im Forschungsbetrieb. Jeweils betrifft die Bedeutung immer die Kontamination der gesamten Anlage.

Die Schwere des Fehlers im Studentenbetrieb bezieht sich auf potentielle Risiken, die aufgrund der Übungen im Technikum auftreten und sich dadurch auf die gesamte Pilotanlage auswirken. Die Schwere des Fehlers im Forschungsbetrieb bezieht sich auf mögliche Risiken, die im Zuge der Forschungsarbeit verursacht werden.

Die genaue Bewertung erfolgte dann in der Expertenrunde.

Den Begriffen habe ich dann entsprechend der *Tabelle 1* die Farben Rot, Orange und Grün zugeordnet. Die Risikoprioritätszahl, die üblicherweise in der FMEA angewendet wird, habe ich absichtlich vermieden um auf der einen Seite nicht vorzutäuschen eine quantitative Bewertung durchgeführt zu haben. Auf der anderen Seite ist die Risikoprioritätszahl auch in der Literatur umstritten, da diese für eine Ordnung der Fehler-Prioritäten nicht aussagekräftig und robust genug ist.²³

Wie in Kapitel „4.1.2 Regeln für die Bewertung der Akzeptanz“ beschrieben, wurden die Risiken anhand der Einstufung der Kriterien in akzeptierbare und nicht akzeptierbare Risiken eingestuft.

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen den kompletten Prozess der Fehlermöglichkeits- und -einflussanalyse mit den identifizierten Risiken, die als nicht akzeptierbare Risiken eingestuft wurden. Anhand des Maßnahmenkatalogs

werden diese Risiken reduziert, wobei nicht alle Risiken durch die Maßnahmen als akzeptierbar eingestuft werden können.

Was immer wieder an der FMEA kritisiert wird, ist ihr Fehlen an der Unterscheidung der einzelnen Bewertungskriterien (Auftrittswahrscheinlichkeit, Bedeutung des Fehlers, Entdeckungswahrscheinlichkeit). Verschiedene Kombinationen der Kriterien führen zu derselben Risikoprioritätszahl.²³

Abbildung 14

Risikobeschreibung		Maßnahmen zur Risikoreduktion						Bewertung nach				
Referenz	Grund	Bewertung vor			Bewertung nach							
		A	D	B (S)	B (S)	D	B (S)	B (F)				
1.1	fehlende Schulung des Personals				A.1	B.1	E.4	E.2				
1.2					A.1	B.1	G.1	E.2				
1.4					B.2	A.2	C.1	F.5				
13.3					F.1	B.1	B.11					
3.1					B.3	J.2						
10.2		Bedienfehler				B.1	J.5					
16.1						B.1	J.5					
5.1.1		Reinigung nicht ausreichend				B.7						
8.1						B.9	C.8	F.4				
15.2.1						J.7	B.13	C.11				
16.4					E.29	E.22	E.25	E.26				
16.5					B.16	C.14	E.22					
16.6	unsteril				B.17	C.15	E.22					
10.3.2					E.19	J.6	E.2					
16.2.2	Ventil/Ventilmembran fehlerhaft				F.2	J.6	E.2					
4.1.7	Aliquotierung				B.1	E.10					n.r.	
4.2.7					B.1	E.10					n.r.	
13.1.3	Dichtring porös				E.19	J.6	E.2					
16.2.3					E.1	J.6	E.2					
13.2.2	Materialermüdung				J.6	J.7	J.8					
16.8.2					J.6	J.7						

Fehlermöglichkeits- und einflussanalyse nicht-akzeptierter Risiken (FMEA, Teil 1/2), Referenz bezieht sich hier auf die in Abbildung 11-Abbildung 12/Abbildung 13 identifizierten Risiken, Kürzel für Maßnahmen zur Risikoreduktion sind in Abb. 32-36 erläutert, Bewertung erfolgt mittels "fuzzy" linguistischen Termini, diese wurden Farben zugeordnet (4.1.1 Einteilung der Kriterien), A= Auftreten, D = Detektion, B(S) = Bedeutung im Studienbetrieb, B(F) = Bedeutung im Forschungsbetrieb, n.r. = nicht relevant

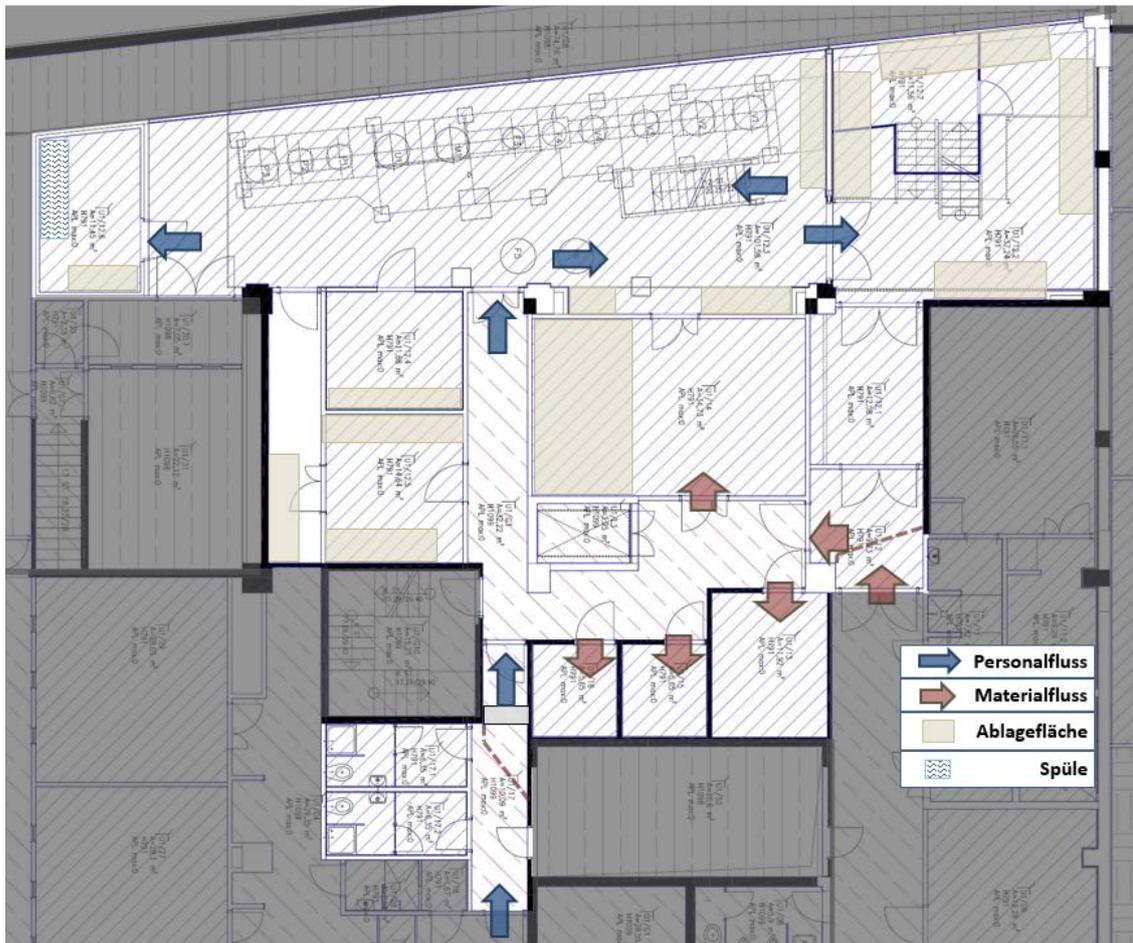
Abbildung 15

Risikobeschreibung		Bewertung vor				Maßnahmen zur Risikoreduktion				Bewertung nach			
Referenz	Grund	A	D	B (S)	B (F)	A	D	B (S)	B (F)	A	D	B (S)	B (F)
11.3.2	Sterilisationstemperatur zu kurz gehalten												
14.3.2													
4.1.4	falsche Feuchtigkeit												
4.1.3	falsche Temperatur												
11.3.3	Sterilisationstemp. nicht erreicht												
14.3.3													
4.2.5	falsches Behältnis												
1.9	Austrocknen von Siphons												
14.1.2	Dauer der Behandlung zu kurz												
1.5.1	Reinigungspersonal												
5.1.3	Fehlverhalten des Personals												
10.1.2	Filter defekt												
10.1.1	Filter falsch												
1.3.2	Filter gerissen/fehlend												
16.3	Filter nicht intakt												
5.1.2	Funktionalität												
14.1.1	Konz. Natronlauge zu gering												
6.1	Luftbullenzen												
1.6	Mitarbeiter kommt krank zur Arbeit												
15.2.2	nach Autoklavieren unsteril geworden												
14.1.3	Sprühschatten in Kessel												
4.3	ungeeignete Entnahme												
16.7.1	ungenügendes Abflammen vor Anstechen des Septums												

Fehlermöglichkeits- und einflussanalyse nicht-akzeptierter Risiken (FMEA, Teil 2/2), Referenz bezieht sich hier auf die in Abbildung 11-Abbildung 12/Abbildung 13 identifizierten Risiken, Kürzel für Maßnahmen zur Risikoreduktion sind in Abb. 32-36 erläutert, Bewertung erfolgt mittels "fuzzy" linguistischen Termini, diese wurden Farben zugeordnet (4.1.1 Einteilung der Kriterien), A= Auftreten, D = Detektion, B(S) = Bedeutung im Studienbetrieb, B(F) = Bedeutung im Forschungsbetrieb, n.r. = nicht relevant

5.2 Monitoring

Abbildung 16



Raumplan Untergeschoss für Personal- und Materialfluss

5.2.1 Probenahmedesign

„Der Grad an Umgebungskontrolle auf mikrobielle Kontamination sollte dem jeweiligen Produkt angepasst sein (siehe 3.1 Was ist GMP?). Dabei sollten das Kontaminationsniveau der Ausgangstoffe und das Risiko für das Fertigprodukt berücksichtigt werden.“ (Zitat²⁸)

Bei dem Design von Reinräumen ist es wichtig den Fluss von Personal und Material so zu gestalten, dass diese sich nicht oder nur selten kreuzen.¹² Da die Änderung der Räumlichkeiten keine Möglichkeit darstellte, ist es wichtig die Flüsse in diesen klar zu gestalten um das Verteilen der Mikroorganismen in der Pilotanlage einzudämmen. Der Materialfluss, in Abbildung 16 mit einem roten Pfeil dargestellt, beschreibt die Wege die das eingebrachte Material vollzieht. Nach

der Materialschleuse werden die Materialien in die dafür vorgesehenen Lagerräume gebracht. Mit blauen Pfeilen wird der häufigste Weg des Personals, ebenfalls in *Abbildung 16* beschrieben. Die Mindestanzahl der Probenahmepunkte in einem Raum wird in der ISO-Norm 14644-1:1999²⁹ mit folgender Gleichung beschrieben:

$$N_L = \sqrt{A}$$

Wobei N_L die Mindestanzahl von Probenahmepunkten beschreibt und A die Grundfläche des Reinraumes in Quadratmeter.

Sie sollen gleichmäßig verteilt sein und auf der Höhe der Arbeitsaktivität sein. Wenn die Richtung des Luftstroms nicht zu regeln oder voraussagbar ist, muss der Einlass der aktiven Luftsammlung vertikal nach oben gerichtet sein.

Die Sedimentationsplatten wurden auf dem Boden ausgelegt. Das entspricht nicht der Arbeitshöhe, aber damit ist das Monitoring an vielen Punkten gleichzeitig durchführbar.

Es herrscht ein turbulenter Luftstrom, deshalb wurden die Probenahmepunkte möglichst gleichmäßig über die Räume verteilt. Außerhalb der Fermentationshalle habe ich darauf geachtet, dass die Probenahmepunkte nicht direkt unter Lufteinlässen liegen.

In der Fermentationshalle (UG/12.3 und EG/19) wurden für die Voruntersuchung sowie das Monitoring im Ruhezustand 10 Punkte ausgewählt, was aufgrund seiner nutzbaren Größe von ca. 100m² angebracht war.

Für die Untersuchungen im Ruhe- und Betriebszustand wurde in allen Räumen ein Beprobungspunkt pro ca. 10m² nutzbarer Fläche ausgewählt. Diese Maßnahme ist dem Umstand geschuldet, dass jede Probenahme acht Minuten aktive Luftsammlung erfordert und mit dieser sehr hohen Anzahl an Probepunkten ein Monitoring an einem Tag durchzuführen nicht mehr möglich gewesen wäre. In der Downstreamhalle habe ich deshalb 4 Punkte ausgewählt. Es zeigt sich beispielsweise in der Schaltwarte, dass die zwei gewählten Probenahmeorte nah beieinander liegen und nur gering in der Anzahl kolonienbildender Einheiten abweichen.

Der Abstellraum im Erdgeschoss ist nur mit drei Punkten untersucht worden. Diese Anzahl ist ausreichend, da dieser Raum selten benutzt wird, und hier nur ein Hinweis geben soll, wie hoch der Eintrag von diesem Raum auf die darunter befindliche Downstreamhalle ist, da hier eine direkte Verbindung besteht.

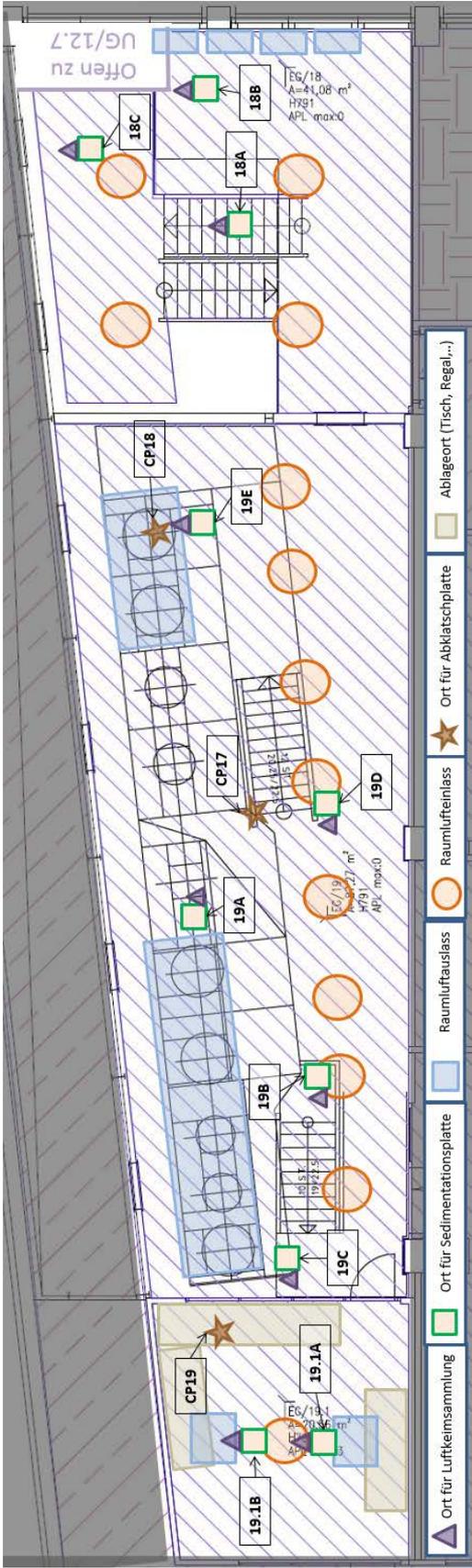
Obwohl das Rolllager nominell größer ist als der Gang, sind hier nur 3 Punkte für das Ruhemonitoring ausgewählt, da die nutzbare Fläche hier aufgrund eines großen Rollregals niedriger ist. Die Anzahl der Probepunkte im Gang wird aufgrund seiner Schlauchform etwas höher gewählt.

Es wurde ebenfalls darauf geachtet diese Orte nicht direkt in Arbeitswegen oder –plätzen zu wählen, sodass ein Monitoring möglich ist, wenn die Anlage benutzt wird.

Für die Beprobung mittels Abklatschplatten wurden Orte gewählt, an denen gearbeitet wird oder Personalkontakt besteht (Computermaus, Vorbereitungstisch, Regale, Geländer, Türgriffe).

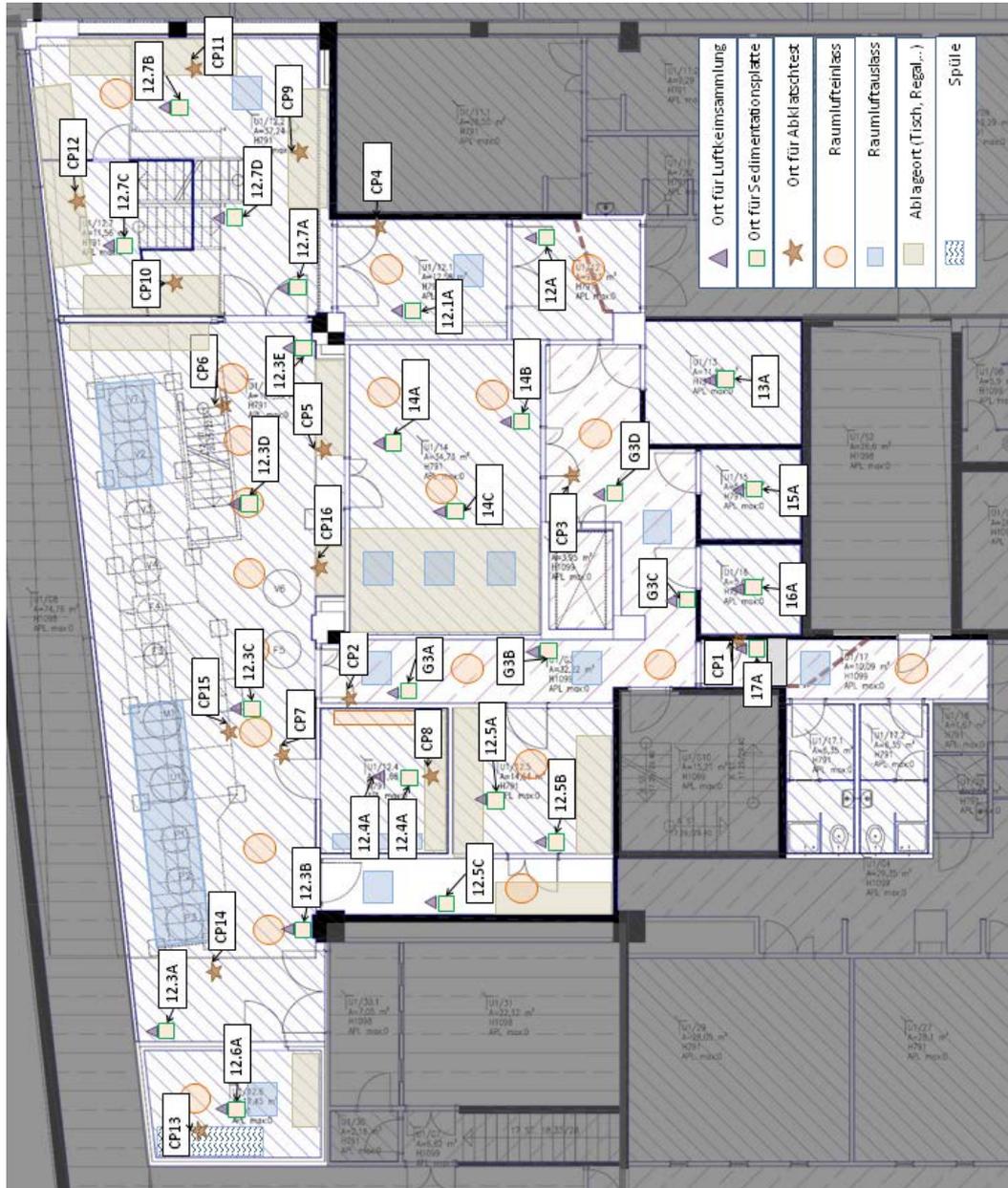
Durch die sehr allgemein formulierten Anforderungen der relevanten Richtlinien obliegt es in jedem Fall dem zuständigen Team zu entscheiden wo und wie das Monitoring durchzuführen ist. Daher ist es möglich, dass nicht alle Räume gleich oder gleich oft überprüft werden. Grundsätzlich muss jedoch die individuelle Entscheidung, so wie in diesem Fall, rationell begründet sein.

Abbildung 17



Bezeichnungen der Probenahmestellen im Erdgeschoss

Abbildung 18



Bezeichnungen der Probenahmestellen im Untergeschoss

5.2.2 Allgemeine Durchführung Monitoring

Die EU-GMP-Richtlinien machen keine genaue Angabe, welches Medium verwendet noch dazu bei welcher Temperatur und wie lange das Medium inkubiert werden soll.

Der Müller-Hinton-Agar hat einen neutralen pH-Wert und ist ein unspezifisches Mikroorganismen-Nährmedium, besitzt jedoch keinen Reinigungsmittelenthemmer. Müller-Hinton-Agar wurde aufgrund dieses Mangels in weiterführenden Untersuchungen durch Casein-Soja-Pepton-Agar (Tryptic-Soy-Agar, kurz: TSA) ersetzt, der mit Lecithin, Histidin sowie Tween 80 versetzt ist. Casein-Soja-Pepton-Agar wird normalerweise für die Kultivierung eines breiten Spektrums an Mikroorganismen verwendet.³³ Der Sabouraud-Dextrose-Agar (kurz: SDA) wird als Optimalmedium für die meisten Pilze angesehen³⁰ und es war deshalb auch eine Option diesen zusätzlich zu den TSA-Platten hinzuzufügen. Wie Marshall et al. feststellten, bringt das Medium jedoch keinen Extranutzen für das Umgebungsmonitoring, da die Pilze auf dem Sabouraud-Dextrose-Agar oftmals sehr schnell in ihrer Größe wuchsen und deshalb schlechter auszählbar waren, als die gleichen Pilzkolonien, die auf TSA-Platten gewachsen sind.³⁰ Zudem ist der Sabouraud-Dextrose-Agar im Vergleich zum TSA sehr teuer, was für ein Monitoring eine wichtige Rolle spielt, da die Zusammensetzung der Medien beibehalten werden soll für folgende Untersuchungen, damit diese Monitorings vergleichbar sind.

In den Monitorings 3, 4 und 5 habe ich an fünf Punkten, die in den Monitorings 1 und 2 Pilzkolonien aufwiesen zusätzlich SDA-Platten ausgelegt um zu überprüfen, ob dieses Nährmedium einen weiteren Erkenntnisgewinn bringt, was nicht der Fall war. Auf diesen Platten sind nicht vermehrt Pilzkolonien (im Vergleich zu TSA-Platten) angewachsen, allerdings war zu beobachten, dass die viablen Pilz-Kolonien in ihrem Durchmesser deutlich größer waren als die Pilzkolonien auf den TSA-Platten (Daten nicht gezeigt).

Das in dieser Arbeit verwendete Inkubationsregime der Nährmedien stellte sich bei Gordon et al. als dasjenige heraus, das die realistischste Wiedergabe der vorhandenen Mikrobiota darstellte.³¹ Würde die Inkubation der Platten mit der höheren Temperatur beginnen, wird das Wachstum der Schimmelpilze

unterdrückt und so nicht ein wahres Bild über die vorhandenen Mikroorganismen abgeben.³¹ Marshall et al. haben 1998 keine Wachstumsinhibition der Pilzkolonien in ihrer Studie entdecken können. Allerdings muss dazu gesagt sein, dass diese als Simulationsstudie durchgeführt wurde und dafür gewisse Pilzstämme ausgesucht wurden.³⁰ Gordon et al. führten ihre Studie in situ in Reinräumen/reinen Bereichen durch und deshalb ist diese Studie frei von einem Stamm-Selektionsfehler.³¹

Die Raumtemperatur hat sich für alle Untersuchungen zwischen 20-21°C bewegt.

5.2.3 Besondere Hinweise zu einzelnen Monitorings

5.2.3.1 Voruntersuchung für Monitoring

Augenmerk dieser Untersuchung lag darauf einen groben Überblick zu bekommen, wie viele und auch welche Mikroorganismen sich in der Umgebungsluft der Pilotanlage befinden.

Es waren die Türen von der Downstreamhalle, von der Waschküche sowie von der Schaltwarte zur Fermentationshalle hin dauerhaft geöffnet.

Die Bakterien habe ich mit visuellen und biochemischen Methoden ausgewertet. Als Vorauswahlkriterium galt hier das makroskopische Kolonienwachstum. Mit der Gramfärbung, dem Cytochrom-C-Oxidase-Test, dem Katalase-Test sowie der mikroskopischen Morphologie ließen sich die meisten der untersuchten Kolonien als grampositive, Katalase positive, Oxidase negative Kokken identifizieren. Diese Eigenschaften können dem Bakterium *Staphylococcus epidermidis* zugeordnet werden.

Im Kühlraum habe ich gramnegative, Oxidase und Katalase positive Stäbchen auf den Nährmedien wiedergefunden. Diese Eigenschaften besitzt unter anderen *Pseudomonas aeruginosa*.

Beide Bakterienspezies lassen sich auf der Haut des Menschen wiederfinden. Hier liegt also der Verdacht nahe, dass der größte mikrobiologische Eintrag auf den Menschen zurückzuführen ist.³²

5.2.3.2 Monitoring 1

Bereits nach 2 Tagen Inkubation zeigte sich, dass an bestimmten Orten (Downstreamhalle, Trockenlager) sehr hohe Keimzahlen zu erwarten sind.

Die Türen zur Schaltwarte, von der Fermentationshalle zum Rolllager, zur Waschküche und zur Downstreamhalle waren beim ersten Monitoring im Ruhezustand dauerhaft geöffnet.

5.2.3.3 Sofortmaßnahmen zwischen Monitoring 1 und 2

Zur Verringerung der Kontaminationswerte wurden einige Maßnahmen ergriffen. Es wurden die Technikumsschuhe, die in der Umschwenkbank der Personalschleuse gelagert werden, mit 70% Ethanol (v/v) gereinigt. Dies diente dem Zweck das Risiko zu verringern, dass lebensfähige Mikroorganismen über die Schuhe eingetragen und verteilt werden. Ebenso wurde etabliert die Reinraumbekleidung des Technikums jeden Freitag zu waschen um die Kontamination des Produktes über verschmutzte Kleidung zu vermeiden. Es wurden im Trockenlager ein großer Teil der lagernden Kartons entfernt und durch Plastikbehälter ersetzt. Zusätzlich wurden die Oberflächen in der Downstreamhalle, dem Trockenlager, der Schaltwarte, der Fermentationshalle und dem Labor mit 70% Ethanol (v/v) abgewischt, ebenso wie die darauf befindlichen Gerätschaften. In der Waschküche wurde die Spüle aufgeräumt, zum Trocknen aufgehängte Schläuche gereinigt und das Spülbecken gewaschen und mit 70% Ethanol (v/v) gereinigt. Die Oberflächen des Tellerseparators sowie des Homogenisators in der Fermentationshalle wurden ebenso mit 70% Ethanol (v/v) gereinigt. Auch jeder Ort für eine Abklatschplatte wurde mit 70% Ethanol (v/v) gereinigt um den Effekt der Reinigung erkennbar zu machen.

5.2.3.4 Monitoring 2

Alle Türen waren geschlossen und nur gegebenenfalls geöffnet.

Es war nicht mehr möglich im Abstellraum im Erdgeschoss Luftkeimsammlungen durchzuführen, da der Luftkeimsammler RCS (Reuter Centrifugal Sampler) von Biotest aufgrund eines Unfalls defekt war. Die Reparatur des Gerätes konnte nicht mehr am selben Tag durchgeführt werden.

Ein Vergleich der Untersuchungen 1 und 2 der mikrobiellen Luftkeimbelastung im Ruhezustand ist in *Abbildung 20 und Abbildung 21* dargestellt. Erkennbar ist dort, dass diese kurzfristigen Maßnahmen einen reduzierenden Effekt auf die Gesamtkeimzahl zu haben scheinen.

5.2.3.5 Monitoring 3

Während der Untersuchungen befanden sich insgesamt 7 Personen im Bereich der Pilotanlage.

5.2.3.6 Monitoring 4

Über den Zeitraum der Untersuchungen fand eine Übung mit 10 Studenten statt. Es waren insgesamt 15 Personen in der Pilotanlage.

5.2.3.7 Monitoring 5

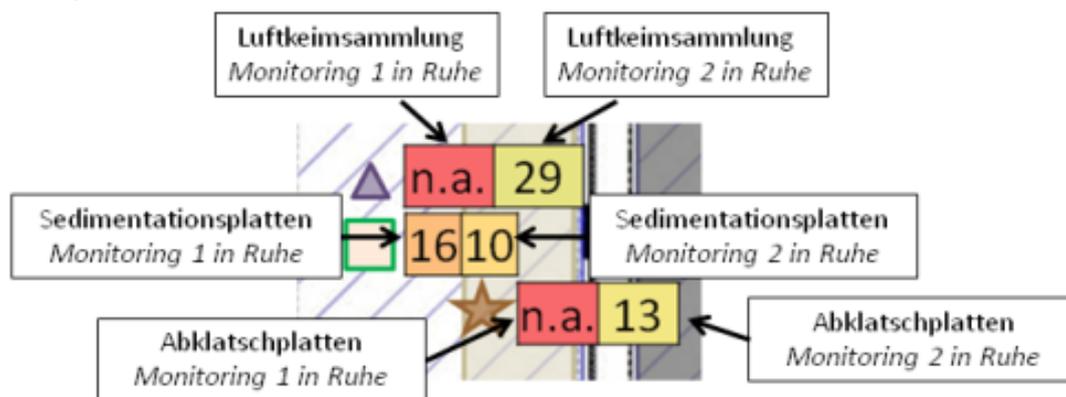
Am selben Tag wie Monitoring 4 durchgeführt. Keine Personen waren mehr anwesend.

Die Ergebnisse und Interpretationen der einzelnen Monitorings finden nach unterschiedlichen Gesichtspunkten statt und sind in den nächsten Kapiteln beschrieben.

5.2.4 Vergleich der Untersuchungen vor Raumluftfilterwechsel in Ruhezustand

In *Abbildung 20* und *Abbildung 21* sind die Werte der Monitorings in den Raumplan eingetragen um überblicksmäßig erkennen zu können, welche Räume besonders hohe Gesamtkeimzahlwerte erzielen. Die *Abbildung 16* beschreibt die Zuordnung der einzelnen Zahlen.

Abbildung 19



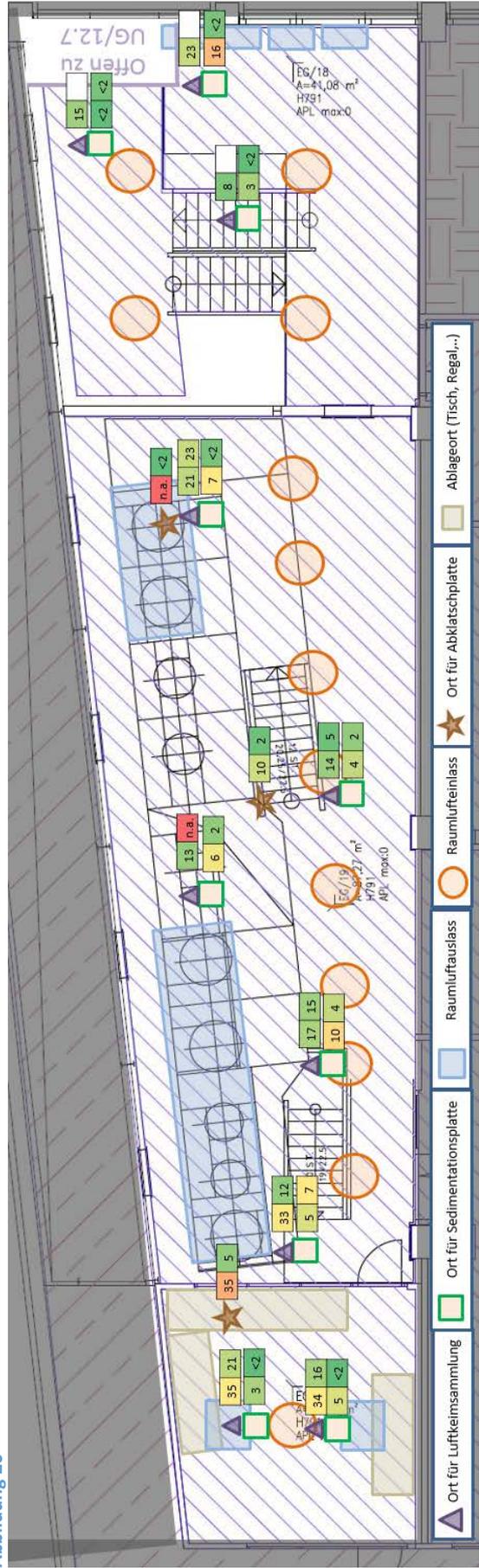
Erläuterung zu Abb. 20 und 21

Anhand der Farbhinterlegung der Zahlen lassen sich diese in ihrer Größe relativ einordnen. Da die Keimzahlen von Sedimentationsplatte und aktivem Luftkeimsammelstreifen stark variieren, können diese nicht direkt verglichen werden. Der in beiden Monitorings für Sedimentationsplatte höchste Wert der Gesamtkeimzahl, wird dunkelrot hinterlegt, der niedrigste Wert mit dunkelgrün. Die Farbnuancen zwischen grün, gelb bis hin zu rot habe ich das Programm Excel 2010 zuweisen lassen. Gleich bin ich für die Farbhinterlegung bei aktivem Luftkeimsammlungen und Abklatschplatten verfahren.

Es ist demnach auf *Abbildung 20* und *Abbildung 21* bereits mit einem kurzen Blick ersichtlich, wo kritischere Punkte bzw. Räume zu finden sind. Um eine fundierte Aussage machen zu können, sind zwei Monitorings allerdings zu wenig.

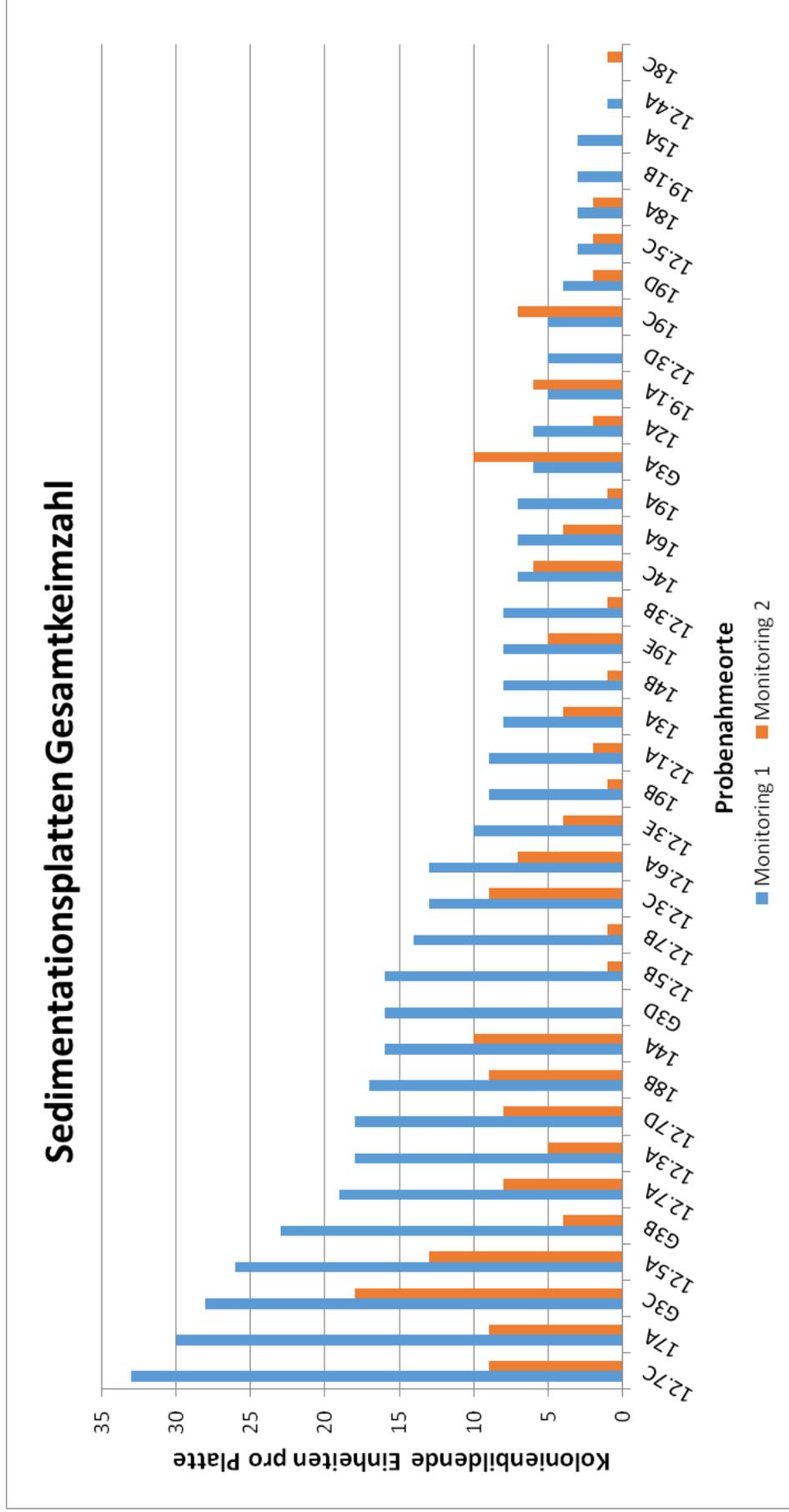
Die Downstreamhalle, die Personal- und Materialschleuse sowie die Waschküche lassen sich aufgrund der hohen Gesamtkeimzahlen als kritische Räume identifizieren.

Abbildung 20



Gesamtkeimzahl der Monitorings 1 und 2 im Ruhezustand, Erdgeschoss, Erklärung in Abb. 16

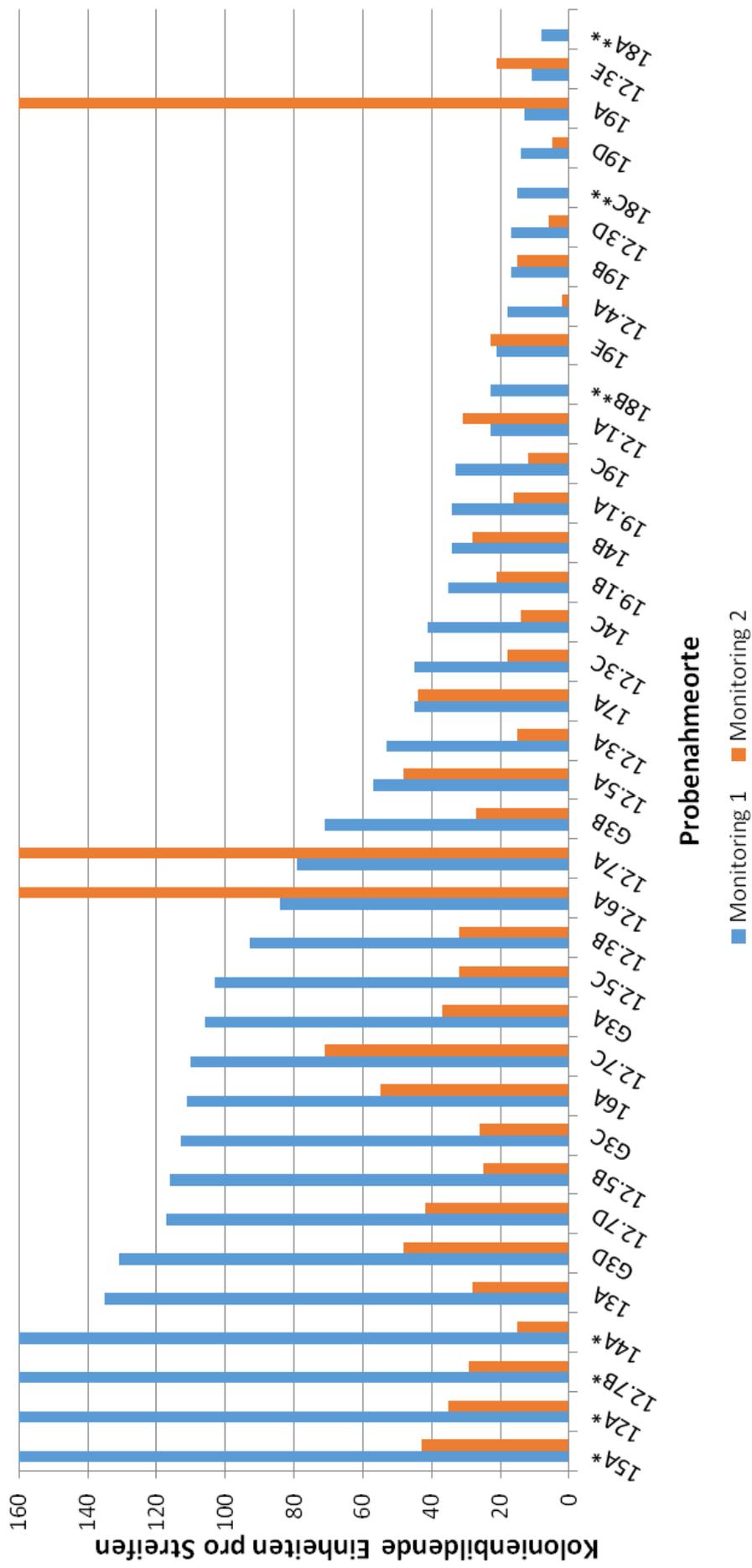
Abbildung 22



Gesamtkeimzahl aller Sedimentationsplatten während beider Monitorings im Ruhezustand-, Probenahmestellen sind in Abbildung 17Abbildung 18 eingetragen

Abbildung 23

Luftkeimsammlung Gesamtkeimzahl (320L)

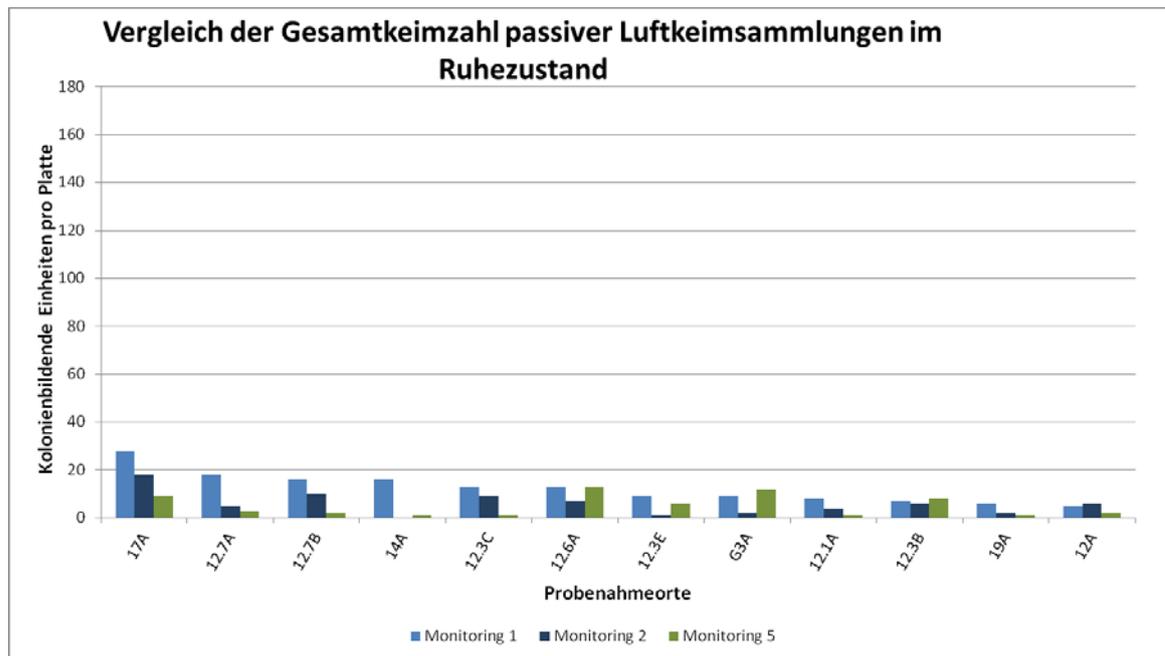


Gesamtkeimzahl aller Luftkeimsammelstreifen während beider Monitorings im Ruhezustand, Probenahmestellen sind in Abbildung 17Abbildung 18eingetragen, *=Streifen vom Monitoring1. nicht mehr auszählbar, -= Streifen vom Monitoring 2. nicht mehr auszählbar, **=keine Messung am 07.10.

5.2.5 Vergleich der Untersuchungen vor und nach Raumluftfilterwechsel in Ruhezustand

Die Daten zeigen, dass geringe Werte für die Gesamtkeimzahlen während der Untersuchungen im Ruhezustand gemessen wurden. Die Skala ist in *Abbildung 24* gleichbleibend zu *Abbildung 26*. Wobei auch hier wieder ein Trend zu erkennen ist. Die Personalschleuse (17A) sowie die Punkte in der Downstreamhalle (12.7A und B) haben hier verhältnismäßig die höchsten Werte.

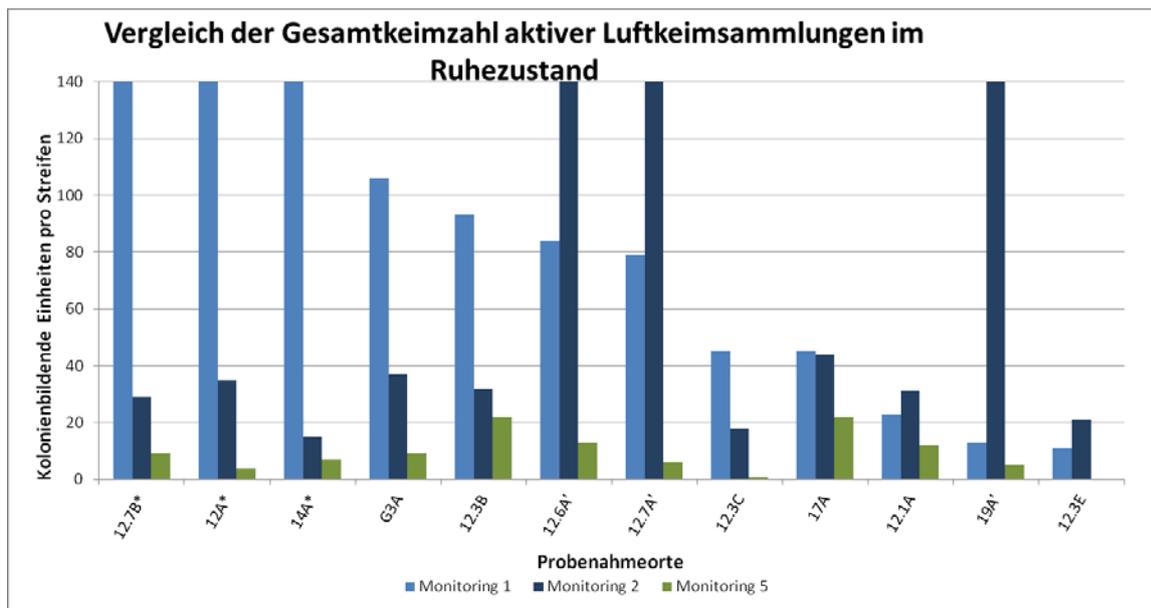
Abbildung 24



Vergleich der Gesamtkeimzahl passiver Luftkeimsammlungen im Ruhezustand, Probenahmestellen sind in *Abbildung 17* *Abbildung 18* beschrieben

Direkt nachdem sich Personen in der Pilotanlage befunden haben, also bei Monitoring 5, steigen die Werte der Gesamtkeimzahl an Orten, die stark frequentiert sind (auf dem Gang, G3A, in der Waschküche, 12.6A, und in der Fermentationshalle, 12.3B) im Vergleich zu den Monitorings 1 und 2, die vor Monitoringsbeginn eine längere Ruhephase hatten.

Abbildung 25



Vergleich der Gesamtkeimzahl aktiver Luftkeimsammlungen im Ruhezustand, *=Streifen vom Monitoring 1 nicht mehr auswertbar, `=Streifen vom Monitoring 2 nicht mehr auswertbar, Probenahmestellen sind in Abbildung 17/Abbildung 18 beschrieben

6 der 12 Probenahmeorte sind in den Monitorings 1 oder 2 nicht mehr auswertbar. In 4 der 6 Fälle lässt sich das auf stark bewegliche Organismen zurückführen, die sich schnell über die gesamte Oberfläche des Nährmediums verteilen und damit eine Auszählung unmöglich machen. Am Punkt 12A wurden beim Monitoring 1 und 2 ungewöhnlich viele Pilzkolonien gefunden (Monitoring 1: 20 Pilzkolonien, Monitoring 2: 14 Pilzkolonien). In Monitoring 5 hat sich lediglich eine Pilzkolonie auf dem aktiven Luftkeimsammelstreifen finden lassen. Hier ist also eine deutliche Reduktion erkennbar. Zwischen Monitoring 2 und 3 wurden die HEPA-Filter für die Raumluft gewechselt. Diese Maßnahme könnte diese Reduktion zur Folge haben.

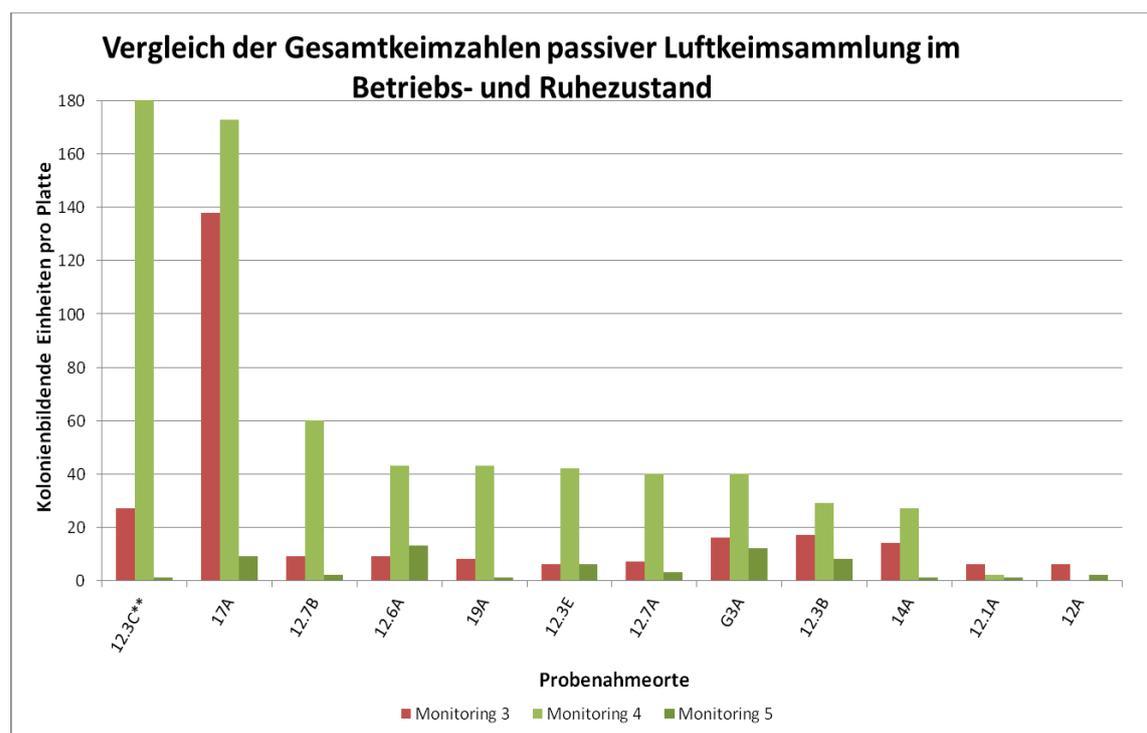
Beim Monitoring 5 sind an jedem Punkt die Werte geringer als an beiden anderen Monitorings im Ruhezustand und das obwohl Monitoring 5 eine Viertelstunde nach einer Übung mit 10 Studenten plus 5 Forschungsmitarbeiter durchgeführt wurde, die den ganzen Tag in dieser Anlage gewesen sind. Es zeigt sich hier also, dass trotz langer Erholungszeit (ca. 24 Stunden für Monitoring 1 und 36 Stunden für Monitoring 2) nicht die Werte erreicht werden können, die mit gewechselten Raumlufffiltern erzielbar sind. Daher ist im vorliegenden Fall zukünftig eine geeignetere Wartungsstrategie zu empfehlen und zeigt sehr deutlich auf, dass die externen Firmen nachhaltig einzubeziehen sind.

5.2.6 Vergleich der Untersuchungen nach Raumluftfilterwechsel in Betriebs- und Ruhezustand

Um die Untersuchungen im Betriebszustand durchführen zu können, wurden insgesamt weniger Probenahmeorte ausgewählt als beim Monitoring im Ruhezustand. Die genaue Auswahl findet sich in *Abbildung 17 und Abbildung 18*.

Der Grund für die Reduktion der Probenahmeanzahl ist ein einheitliches Bild der Situation zu zeichnen. Dazu müssen zu jeder Messung vergleichbare Bedingungen herrschen. Es soll also vermieden werden, dass eine aktive Luftkeimsammlung stattfindet, während 15 Personen in der Pilotanlage sind und eine weitere Luftkeimsammlung in der keine Person sich mehr im Technikum befindet. Je mehr Probenahmeorte es gibt, desto länger dauert das Monitoring und verschiedene Messpunkte sind nicht mehr vergleichbar.

Abbildung 26



Vergleich der Gesamtkeimzahlen der passiven Luftkeimsammlungen im Betriebs- und Ruhezustand, **=in Monitoring 4 nicht mehr auswertbar

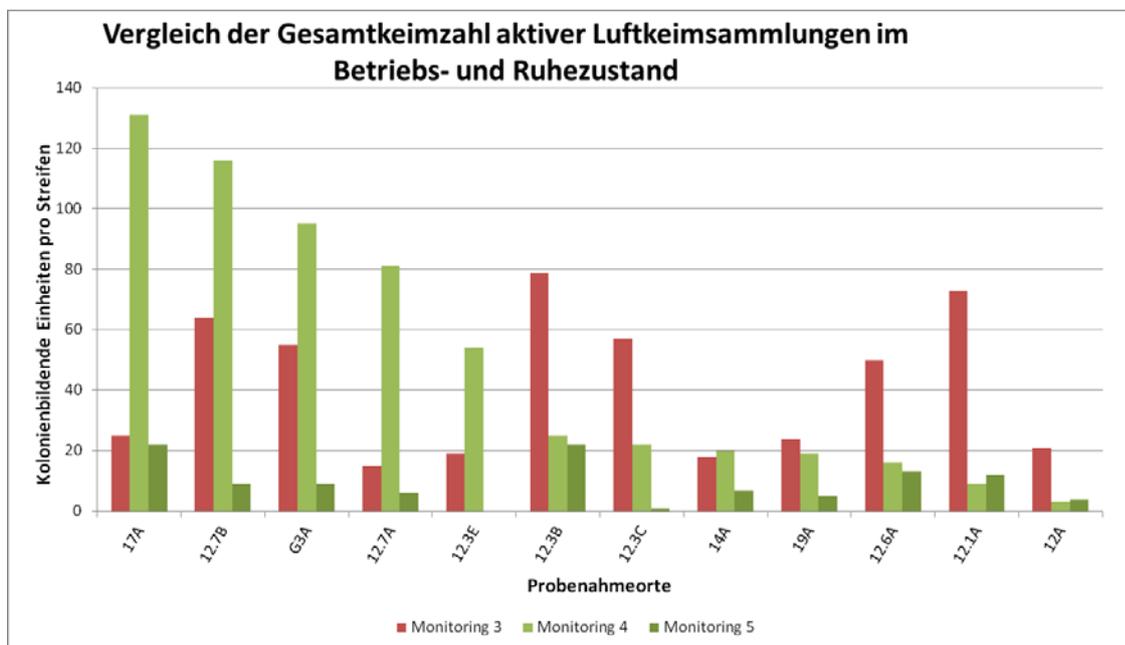
In *Abbildung 26* werden Monitoring 3-5 gegenübergestellt. In Monitoring 3 befanden sich über den gesamten Zeitraum der Probenahme insgesamt 7 Personen in der Pilotanlage. Monitoring 4 wurden während eines Kurses mit Studenten durchgeführt, währenddessen insgesamt 15 Personen in der

Pilotanlage waren. Hierbei liefen auch biotechnologische Prozesse ab. Das Monitoring 5 wurde als Monitoring im Quasi-Ruhezustand am selben Tag, wie das Monitoring 4, durchgeführt. Monitoring 5 wurde gestartet 15 Minuten nach Verlassen der letzten Person, der Tank für die Fermentation wurde dabei auf 4°C in einem geschlossenen Kühlkreislauf abgekühlt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Gesamtkeimzahl, sobald Personen im Raum sind, tendenziell deutlich höher liegt als ohne Personen, was zu erwarten war. Diese Daten decken sich mit den biochemischen Tests der Voruntersuchung, in denen die meisten Keime *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* als typische Vertreter der Hautflora zuzuordnen sein könnten.

Hier sind die Punkte in der Personalschleuse (17A) und die Downstreamhalle (12.7B) als diejenigen mit den höchsten Spitzenwerten zu sehen. Der Punkt 12.3C in der Fermentationshalle ist bei passiver Luftkeimsammlung bei Monitoring 4 nicht mehr auswertbar. Das ist auf einen stark beweglichen Mikroorganismus zurückzuführen. Die Punkte in der Materialschleuse 12A und 12.1A haben hier die geringsten Gesamtwerte erzielt. Die Begründung dafür kann eine geringe personelle Frequentierung dieser Räume sein.

Abbildung 27



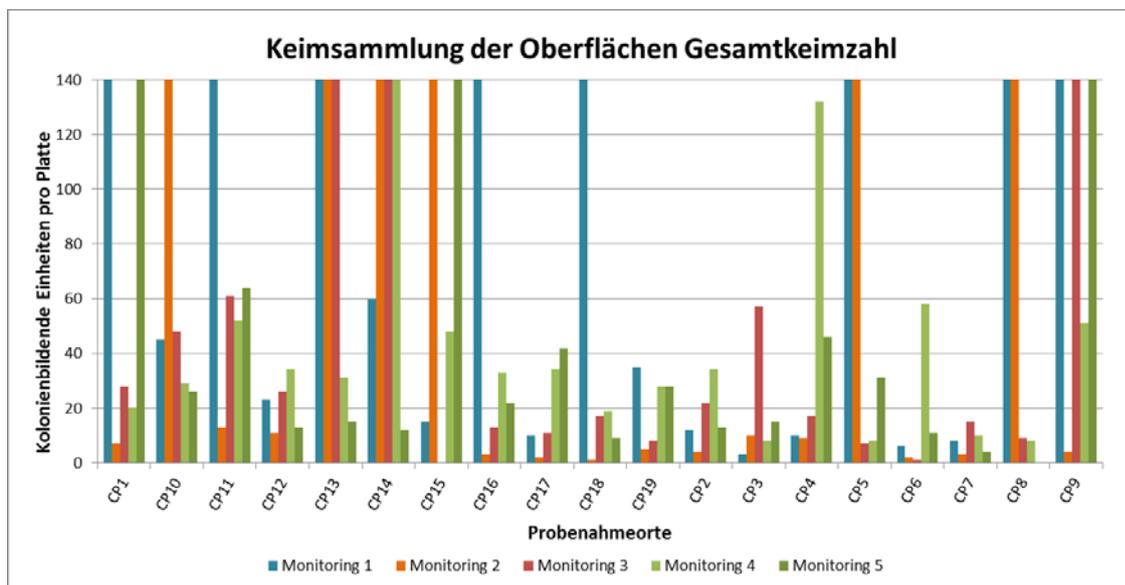
Vergleich der Gesamtkeimzahlen der aktiven Luftkeimsammlungen im Betriebs- und Ruhezustand

Auch in der Keimbelastung der aktiven Luftkeimsammlung zeichnet sich ein ähnliches Bild wie bei der passiven Luftkeimsammlung. Befinden sich keine Personen mehr in der Anlage, sind die viablen Mikroorganismen geringer als bei Personenverkehr. Auch hier sind die Punkte in der Personalschleuse (17A) und die Downstreamhalle (12.7B) als diejenigen zu sehen, die die höchsten Gesamtkeimzahlen erzielen (gewertet wird hierbei der Spitzenwert über die drei Messungen). Punkte mit hoher Personenfrequenz erzielen also generell deutlich höhere Werte als Punkte, die sich in Räumen befinden durch die nicht oft gegangen wird. Die Punkte 12.1A und 12A befinden sich in der Materialschleuse und deren Gesamtkeimzahlen sind besonders in den Monitorings 4 und 5 niedrig. Hier sind wenige bis gar keine Personen zu diesen Messungen in den Räumen 12 und 12.1 gewesen. Monitoring 3 zeichnet hier ein anderes Bild. Hier wurde während den Messungen etwas über die Materialschleuse ausgebracht. Dies kann der Grund für hohe Gesamtkeimzahl sein. Vergleicht man hier die aktive und passive Luftkeimsammlung, lässt sich erkennen, dass über die gesamte Dauer der passiven Luftkeimsammlung von 4 Stunden diese Öffnung der Materialschleuse keinen großen Einfluss auf die Gesamtkeimzahl hatte. Hier kann man also von einem punktuellen Anstieg zur Zeit der Öffnung der Tür rechnen, der sich nicht stark auf die Gesamtkeimzahlbelastung im Raum auswirkt. Hieran kann man gut erkennen, wie die passive Luftkeimsammlung über 4 Stunden und die aktive Luftkeimsammlung über 8 Minuten sich gegenseitig im Sinne des Erkenntnisgewinns ergänzen. Dies wird ein Grund sein, warum noch immer beide Arten der Luftkeimsammlung parallel eingesetzt werden.

5.2.7 Interpretation der Gesamtkeimzahl der Oberflächenkeimsammlung

In *Abbildung 28* zeigt sich das sehr durchwachsene Bild der Oberflächenkeimsammlung. Es gibt einige Orte wie CP14 (Griff des Homogenisators), CP13 (Spüle) und CP9 (Computermaus in der Downstreamhalle), die an mehreren Untersuchungen nicht mehr auszählbare Platten aufwiesen. Punkte wie CP17(Geländer oben), CP19(Computermaus in der Schaltwarte) sowie CP7(Türgriff Kühlraum) zeigen bei allen Monitorings geringe Werte.

Abbildung 28



Gesamtkeimzahlwerte aller Abklatschplatten

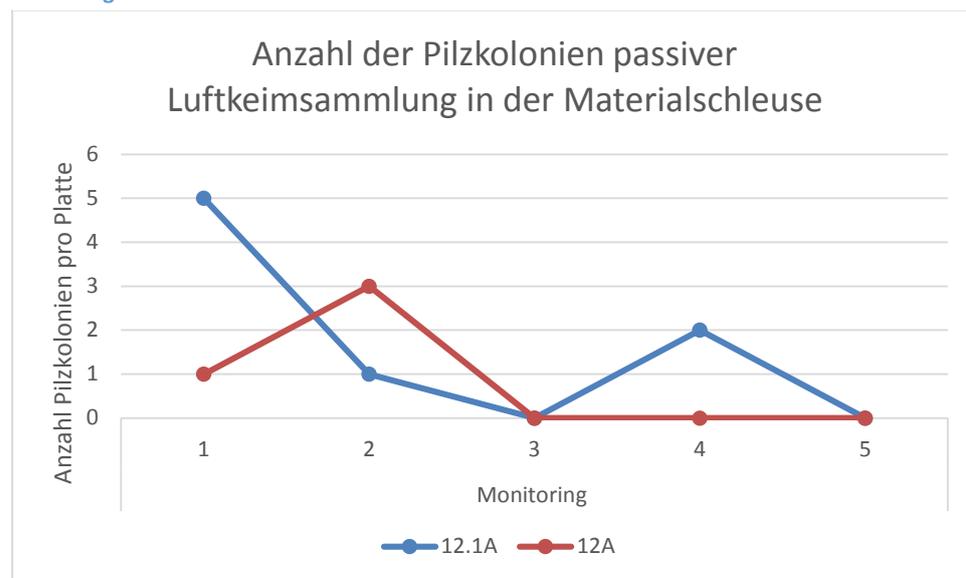
Zu erwarten wäre hier eine hohe Gesamtkeimzahl bei Monitoring 3 und 4, da in diesem Zeitraum Personen in der Pilotanlage waren. Zumindest bei den Punkten CP16(Computermaus in Fermentationshalle) und CP18(Deckel eines Medienbehälters) ist nach dem ersten Monitoring kein starkes Keimwachstum mehr erkennbar. Hier könnte allein das Abwischen des Punktes mit 70% Ethanol (v/v) nach dem Abklatsch einen Reinigungseffekt erzielt haben. Dieser Effekt ist aber nicht an jedem Punkt zu beobachten, was den Einsatz eines zweiten Desinfektionsmittels notwendig macht um eine sichtbare Reduktion der Gesamtkeimzahl auf den Oberflächen herbeizuführen.

5.2.8 Monitoring mit dem Fokus auf das Pilzwachstum

Dieser Fokus wurde gewählt, da sporenbildende Pilze immer ein erhöhtes Risikopotential haben. Sowohl bei der Reinigung als auch bei der Sterilisation sind sie gefürchtet, da Sporen nur äußerst schwer entfernbar sind.

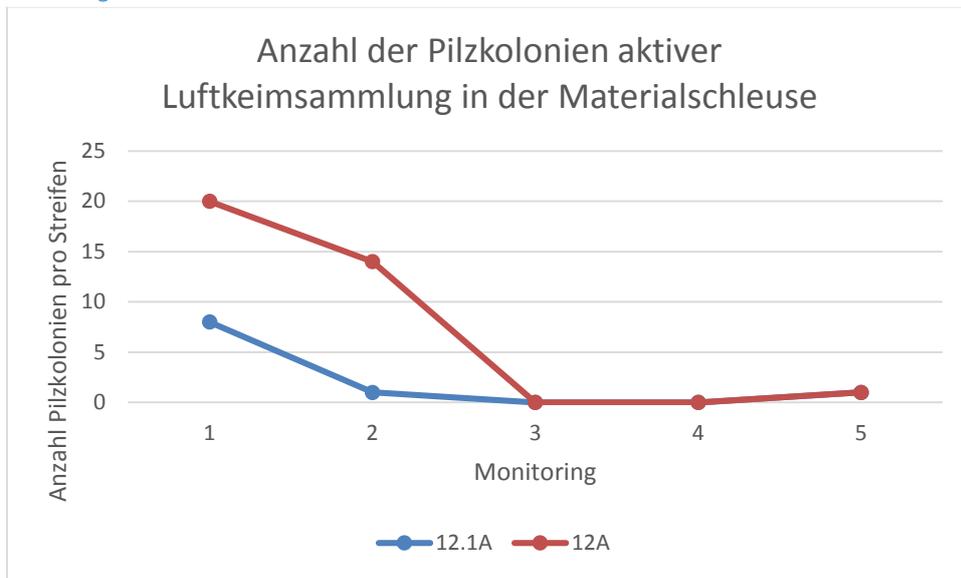
Am Beispiel der Materialschleuse kann in *Abbildung 29 und Abbildung 30* gezeigt werden, dass die Anzahl der Pilzkolonien für die Monitorings 3,4 und 5 deutlich unter der Anzahl der Pilzkolonien liegt, die an den ersten beiden Monitorings gezählt wurden. Erwartet wäre hier ein höherer Wert bei den Monitorings 3 und 4, da hier Personen sich in der Pilotanlage aufgehalten haben. Eine mögliche Erklärung für diese Abnahme der Pilzkolonien nach dem Monitoring 2 kann der Wechsel der Raumlufffilter gewesen sein. Dieser fand zwischen dem zweiten und dritten Monitoring statt.

Abbildung 29



Veränderung der Pilzkolonien der passiven Luftkeimsammlung über die gesamten Monitorings am Beispiel der Materialschleuse

Abbildung 30



Veränderung der Pilzkolonien der aktiven Luftkeimsammlung über die gesamten Monitorings am Beispiel der Materialschleuse

5.3 Abgeleiteter Maßnahmenkatalog

Der an dieser Stelle vorgestellte Maßnahmenkatalog bezieht sich dabei auf die in Kapitel „3.1 Was ist GMP?“ genannten Richtlinien, die in der EU für pharmazeutisch herstellende Betriebe verpflichtend sind. Im Detail ist dieser dann in *Abbildung 32 - Abbildung 37* dargestellt.

Zu a) In der Pilotanlage des DBT handelt es sich um geschlossene und offene Prozesse. Um das Kontaminationsrisiko gering zu halten, wird hier bereits in Kampagnen gearbeitet. Das bedeutet, dass nicht zwei verschiedene Prozesse zeitgleich in der Fermentationshalle bearbeitet werden. Die verwendeten Nährlösungen werden mittels Filtration vorbereitet. Dazu wird das bereitete Medium durch zwei Filter mit unterschiedlicher Porengröße geschickt. Der erste Filter besitzt eine Porengröße von 0,4 µm, der zweite eine Porengröße von 0,2 µm. Als geschlossener Prozess wird die Fermentation an sich betrachtet. Die Einwaage und das Mischen im Medienbehälter V1 ist ein offener Prozess. Sobald die Flüssigkeit den Sterilfilter passiert hat, ist es bis zum Ende der Fermentation ein geschlossener Prozess. Dieser als Sterilfiltration bezeichneter Prozessschritt wird für thermolabile Lösungen häufig verwendet. Dieser Vorgang wird bereits routinemäßig durchgeführt. Hierzu gibt es auch die Standardarbeitsanweisung „PF0003 – Sterilfiltration von Medien- und Pufferlösungen“.

Zu b) Zurzeit fehlen Daten, die die aktuellen Umgebungsbedingungen in der Pilotanlage umfassend widerspiegeln. In den Räumlichkeiten, die unter GMP-Richtlinien betrieben werden, gibt es genaue Raumspezifikationen. Da in der Pilotanlage des DBT kein GMP-relevantes Material produziert wird, sind diese Spezifikationen nicht angestrebt. Für die Projektabwicklung einerseits und andererseits um die Räumlichkeiten unter optimalen Bedingungen zu benutzen, wird es angestrebt die Keimbelastung zu optimieren, das bedeutet zu minimieren. Es sollen einerseits die Freisetzung der Produktionsstämme und andererseits Kontaminationen, die durch Personen, Materialien und Lufteinträge entstehen, identifiziert, bewertet und neue Maßnahmen entwickelt werden. Eine Lüftung, die nur für einen Teilbereich der Anlage zuständig ist, ist in dieser Pilotanlage nicht gegeben. Daher ist, wie bereits beschrieben, die Überprüfung und die Wartung von großer Bedeutung.

Zu c) Dies ist ein Punkt, der in dieser Anlage besonders zum Tragen kommt. Da aufgrund des universitären Kontextes der Anlage, die eintretenden Personen einer hohen Fluktuation unterlegen sind, ist es umso wichtiger die Regeln der Personalhygiene klar zu definieren. Es steht in der Personalschleuse ein Spender mit Desinfektionslösung für die Hände bereit. Nach dem Anziehen der Überbekleidung ist ein Desinfizieren der Hände vorgesehen um die Keimanzahl zu reduzieren, die durch den Menschen eingebracht wird. Als physikalische Barriere besitzt die Personalschleuse eine Umschwenkbank. Zum Einschleusen in die Pilotanlage muss sich jede Person dort hinsetzen, sich auf die saubere Seite drehen um danach die Schuhe anziehen zu können und die Personalschleuse in Richtung der „sauberen“ Seite zu verlassen. Beim Verlassen der Anlage ist dieses Prozedere in umgekehrter Reihenfolge durchzuführen um jegliches Risiko Organismen nach außen zu tragen zu minimieren. Luftschleusen mit einer logischen Druckkaskade sind gegeben. Die Benutzung der Räumlichkeiten wird über ein Gästebuch ermittelt. Dies liegt in der Personalschleuse auf und ist von jedem auszufüllen, der in der Pilotanlage nicht regelmäßig arbeitet.¹⁵ Diese Maßnahme dient der Ursachenforschung bei einer aufgetretenen Kontamination.

Zu d) An einer Universität ist diese Praxis nicht durchführbar. Darauf muss verzichtet werden. Es sollte aber expliziert darauf hingewiesen werden, dass erkrankte Personen nicht in der Anlage arbeiten dürfen. Somit gilt für diese Bereiche, dass grundsätzlich ein umfassendes Konzept zu planen, durchzuführen, zu dokumentieren und zu überprüfen ist. Dabei gilt es alle Personen, die permanent oder zeitweise, aber auch deren Leistungen zugekauft werden, besonders zu instruieren sind.

Zu e) Um zu wissen, ob die Produktqualität kompromittiert wird, benötigt es eine Prozessvalidierung. Wird diese durchgeführt, ist es auch in der Pilotanlage möglich mehrere aufeinanderfolgende Chargen mit geringerem Reinigungsaufwand durchzuführen. Derzeit werden die Prozesse bereits in Kampagnen durchgeführt, das bedeutet, dass während eines Zeitintervalls nur ein Prozess durchgeführt wird. Nach Beendigung der Kampagne findet eine Reinigung der Ausrüstung in der Pilotanlage statt.

Zu f) Die Wartung der Räumlichkeiten erfolgt durch die Haustechnik. Es ist wichtig diese mittels einer Schulung auf die Gefahren und Risikobereiche der Pilotanlage aufmerksam zu machen. Schriftliche Vorgaben existieren zurzeit noch nicht. Die Dokumentation der verrichteten Arbeiten kann in einem eigenen Protokoll festgehalten werden. Es könnte auch über die Einführung eines Log-Buches nachgedacht werden, zumal dann die Historie besser abbildbar wäre. Ebenso ist es notwendig das vorhandene Gästebuch gewissenhaft zu führen um bei einer Kontamination in der Pilotanlage eine Ursachenforschung betreiben zu können.

Zu g) Schriftliche Anleitungen zur Reinigung existieren, z.B. in der Standardarbeitsanweisung „GA0007 – Reinigung der Ausrüstungsgegenstände“. Beschriftungen finden handschriftlich statt. Um Fehler aufgrund der Lesbarkeit zu vermeiden, ist es empfehlenswert die Beschriftung mit einem Etikettendrucker durchzuführen. Essentielle Informationen, die dabei festgehalten werden sollen, sind das Datum der Herstellung/Öffnung, Nachname der Person, die das Behältnis prozessiert hat, sowie der Inhalt mit Konzentration. Je mehr Informationen auf einem Behältnis zu finden sind, desto einfacher kann später mit diesem verfahren werden.

Zu h) Rückstände der Reinigungsmittel im Produkt sind nicht bestimmt worden, deshalb kann hier auch kein Akzeptanzkriterium festgelegt werden. Die verwendeten Geräte sind für die Verwendung in der Fermentation ausgelegt und entsprechen deshalb den Anforderungen an die Reinigung. Die Schläuche, mit denen Tanks und Geräte verbunden werden, werden in der Waschküche gereinigt und über der Spüle zum Trocknen aufgehängt.²⁶ Sobald diese trocken sind, müssen sie in das Trocken- oder Rolllager gebracht werden, in dem sie trocken bis zur nächsten Benutzung lagern können. Diese Vorgabe muss über Schulungen der betreffenden Personen implementiert werden.

Zu i) Lagerräume sind für diesen Zweck angelegt und konzipiert. Die Pilotanlage ist so gestaltet worden, dass der Waschbereich in der Waschküche und der Lagerbereich eine räumliche Trennung erfahren. Die Lagerräume Trockenlager, Säure-Basen-, sowie das Chemikalienlager der Anlage wurden auf den Oberflächen gereinigt und mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Temperatur in diesen

Räumen wird auf 20°C gehalten und ebenso wie in den anderen Räumen durch die Haustechnik überwacht. Diese Räumlichkeiten bedürfen besonderer Aufmerksamkeit, da viele Materialien von außen in diese Bereiche gelangen. Über Schulungen werden die Mitarbeiter in regelmäßigen Abständen auf diese Risiken hingewiesen. Sekundärverpackungen und überflüssige Primärverpackungen werden in der Pilotanlage vor der Materialschleuse entfernt und nur die notwendige Primärverpackung wird in die Materialschleuse eingebracht, wo sie mit einer bereitgestellten Sprühflasche mit 70% Ethanol eingesprüht wird. Das von außen desinfizierte Material wird daraufhin auf einen bereitgestellten Wagen gestellt, von wo aus es von der „sauberen“ Seite der Schleuse entgegengenommen werden kann. Es ist ein Übertreten der schwarzgelben Linie auf dem Boden strengstens untersagt (wie bereits in der Ordnung der Pilotanlage festgelegt worden ist). Beim Einbringen von Material kann es hilfreich sein das Material für eine bestimmte Zeit in der Materialschleuse zu belassen. Die Reinigung und die Wartung des Tellerseparators sowie des Homogenisators in der Fermentationshalle werden vor Ort in das Geräte-Log-Buch eingetragen. Hierbei werden Datum, Zeit, benutzter Organismus und der durchgeführte Arbeitsschritt festgehalten. Die durchführende Person setzt ihre Unterschrift unter das Protokollierte. Zukünftig sollte festgeschrieben werden, dass die Reinigung umgehend nach der

Abbildung 31

Benutzung zu erfolgen hat. Dadurch wird einerseits die Verbreitung minimiert, aber auch die Reinigbarkeit erleichtert, sowie die Verwendung kritischer Reinigungslösungen vermieden.

Zu j) Verantwortung für die Grundreinigung in der Pilotanlage trägt die Fa. ISS Facility Services GmbH. Ein Reinigungsplan existiert derzeit nicht. Die Dokumentation der Reinigungsvorgänge durch die Firma ISS Facility Services GmbH ist eine



3-Eimer-Reinigungswagen, Quelle: http://img.directindustry.com/images_di/photo-m2/janitorial-trolleys-37507-2695509.jpg

Maßnahme, die implementiert werden soll. Der Boden wird mit einem Scheuersaugautomat gewischt. Dieser wird über die Materialschleuse eingebracht. Somit wird hierbei die Linie übertreten und mit den gleichen Utensilien der Boden gereinigt, wie es in den Bereichen außerhalb der Pilotanlage der Fall ist. Eine Lösung kann ein gewidmetes Reinigungssystem mit einem 3-Eimer-Wagen für die Pilotanlage sein, das in der Pilotanlage verbleibt und die Reinigungsfachkraft sich über die Personalschleuse einschleust.

Zu k) Reinigungsmittel werden in der Pilotanlage derzeit nur auf dem Boden eingesetzt. Als Desinfektionsmittel wird 70% Ethanol (v/v) für die Oberflächen eingesetzt. Nagetierbekämpfungsmittel, Insektizide, und Fungizide werden nicht eingesetzt. Der Einsatz von 70% Ethanol wird nicht dokumentiert. Der bewusste Einsatz von Ethanol als Desinfektionsmittel sollte in Schulungen verdeutlicht werden. Die Dokumentation des Ethanoleinsatzes gestaltet sich schwierig und in meinen Augen auch nicht zielführend. Aufgrund der Erkenntnisse in Abschnitt „5.2.7 Interpretation der Gesamtkeimzahlen der Oberflächenkeimsammlung“ wäre es empfehlenswert über ein weiteres Desinfektionsmittel nachzudenken, dass eine andere Wirkweise als Ethanol besitzt.

Zu l) Schulungen beziehen sich derzeit nur auf den Personenschutz. Derzeit werden sowohl allgemeine Schulungen zum Thema Sicherheit und spezifische Technikumsschulungen verpflichtend umgesetzt. Der Produktschutz, der durch die Gute Herstellungspraxis gewährleistet werden soll, ist darin nicht unbedingt mit einbezogen. Zukünftig wäre dieser Punkt jedoch mit Nachdruck zu schulen.

Zu m) Cleaning-in-Place beschreibt die Reinigung vor Ort. In den Tanks der Fermentationsanlage wird dies durch vorinstallierte Sprühköpfe erreicht, die das Wasser für die Reinigung im Kessel verteilen. Sterilization-in-Place zielt darauf ab in einem System keimfrei zu arbeiten.³³ Dazu werden in der Pilotanlage zwei verschiedene Methoden angewendet. Über vorinstallierte Rohrleitungen wird zur Keimreduktion heißer Wasserdampf in den Tank eingebracht. Im Kessel soll eine Temperatur von 121°C für mindestens 30 Minuten gehalten werden. Diese Temperatur kann in den Rohrleitungen nicht erreicht werden. Hier ist eine Temperatur von 90°C für die Keimreduktion vorgesehen.

Zu n) Gesonderte Schutzkleidung für bestimmte Räume sind aktuell noch nicht eingeführt, kann aber je nach Anspruch an den Prozess als Maßnahme integriert werden. Allerdings gibt es bereits einen zweiteiligen Anzug, der bei Eintritt in die Pilotanlage angezogen wird. Eine Reinigungsverifizierung findet derzeit keine Anwendung. Indirekte Schlüsse lassen sich aus den von mir erhobenen Daten zur Gesamtkeimzahlbelastung erkennen. Abfall, der direkten Kontakt mit dem Produkt hat, wird autoklaviert. Abfall, der nicht direkt mit dem Produkt in Berührung gekommen ist, wird von der Reinigungsfirma ISS Facility Services GmbH einmal wöchentlich geleert und entsorgt. Verschmutztes Wasser wird in die Thermodesinfektion geleitet, wo es aufgefangen wird und viable Organismen bei 95°C über 20 Minuten unschädlich gemacht werden. Obwohl hitzestabile Sporen dadurch nicht abgetötet werden, entspricht dieser Prozess den umweltrechtlichen Vorgaben. Verschmutzte Kleidung wird in einem Wäscheständer in der Personalschleuse gesammelt und zumindest einmal die Woche wird die komplette benutzte Überbekleidung bei 60°C gewaschen. Der Reinigungsprozess ist nicht klar definiert. Deshalb ist das Kontaminationsrisiko, das vom Reinigungsprozess ausgeht, hier nicht eindeutig feststellbar. Eine Aufzeichnung über die Reinigung und eine Kennzeichnung der gereinigten Gegenstände findet nicht statt. Ein Raum-Log-Buch könnte installiert werden, in dem notiert wird, welcher Reinigungsschritt an welchem Gerät durchgeführt wurde. Eine Aufsicht der Mitarbeiter wird an der Universität nicht durchzuführen sein.

Abbildung 32

	betrifft:	Referenz	Maßnahmen	Maßnahmen-Kürzel
Schulung	alle	1.1 1.2 1.4 6.1	Hinweistafeln an Durchgangstüren Hinweistafeln "Zutritt nur für geschultes Personal" geschlossene Türen	A.1 A.2 A.3
	ForschungsmitarbeiterInnen/TutorInnen	1.1 1.2 4.1.7 4.2.5 4.2.7	regelmäßige Schulung von MitarbeiterInnen/TutorInnen	B.1
		5.1.3 10.2 12.1 13.3 15.1	Schulung der Tutoren	B.2
		15.2.2 16.1 16.7.2 16.9	Schulung zum Transport	B.3
		1.4	Implementierung von SOP GO0014 - Maßnahmen zur allgemeinen und biolog. Sicherheit, Schulung zu Krankheiten	B.4
		3.1	Implementierung von SOP GO0002 - Verhaltensmaßnahmen beim Betreten des Technikums	B.5
		1.6	Einhaltung der Regeln der Sicherheits- und Departmentsordnung	B.6
		1.10	Implementierung von SOP GA0004 - Betrieb, Reinigung und Instandhaltung von Sterilwerkbanken	B.7
		4.3	Sicherheitswerkbank für eukaryote Zellen, andere Sicherheitswerkbank für prokaryote Zellen	B.8
		5.1.1	Herstellvorschrift 0,1 mol/L Natronlauge	B.9
		5.3	Implementierung von SOP PF0003 - Sterilfiltration von Medien oder Pufferlösungen	B.10
		8.1 8.3.1 9.1 9.3.1 14.1.1	Implementierung von SOP PF0005 - Probenahme mittels sterilem Probenentnahmesystem aus Kessel/Behältern	B.11
		10.1.1	Manuelle Reinigung der Kessel	B.12
		13.3 16.9	Implementierung von SOP PA0008 - Grundreinigung, Sterilisation und Lagerung von Schlauchmaterialien	B.13
		14.1.3	Implementierung von SOP PA0005 - Herstellung steriler Verbindungen mit Schlauchverbindern und Silikonschläuchen	B.14
		15.2	Implementierung von SOP GA0007 - Reinigung der Ausrüstungsgegenstände	B.15
		15.2.2	Herstellvorschrift Feed-Medium	B.16
16.5	Herstellvorschrift Batch-Medium	B.17		

Maßnahmenkatalog zur Risikoreduzierung durch Schulungen für alle eintretenden Personen und die ForschungsmitarbeiterInnen, dunkelgrün hinterlegt ist die Art der Maßnahme, hellgrün hinterlegt sind betroffene Personen, Referenz bezieht sich auf die in Abbildung 11 - Abbildung 13 identifizierten Risiken, , jede Maßnahme bekommt ein spezielles Maßnahmenkürzel

Abbildung 33

	betrifft:	Referenz	Maßnahmen	Maßnahmen- kürzel	
Schulung	Studierende/Praktikantinnen	1.4	Schulung der Studierenden zu Pflichten - Sicherheitsmaßnahmen und Vorschriften für die Pilotanlage	C.1	
		3.1	Schulung zum Transport	C.2	
		1.6	Implementierung von SOP GO0014 - Maßnahmen zur allgemeinen und biologischen Sicherheit, Schulung zu Krankheiten	C.3	
		1.10	Implementierung von SOP GO0002 - Verhaltensmaßnahmen beim Betreten des Technikums	C.4	
		4.3	Einhaltung der Regeln der Sicherheits- und Departmentsordnung	C.5	
		5.1.1	Implementierung von SOP GA0004 - Betrieb, Reinigung und Instandhaltung von Sterilwerkbanken	C.6	
		5.3	Sicherheitswerkbank für Zellen, andere für Bakterien	C.7	
		8.1	8.3.1 9.1 9.3.1 14.1.1	Herstellvorschrift 0,1 mol/L Natronlauge	C.8
		10.1.1		Implementierung von SOP PF0003 - Sterilfiltration von Medien oder Pufferlösungen	C.9
		13.3	16.9	Implementierung von SOP PF0005 - Probenahme mittels sterilem Probeentnahmesystem aus Kessel/Behältern	C.10
		15.2		Implementierung von SOP PA0008 - Grundreinigung, Sterilisation und Lagerung von Schlauchmaterialien	C.11
		15.2.2		Implementierung von SOP PA0005 - Herstellung steriler Verbindungen mit Schlauchverbindern und Silikonschläuchen	C.12
		15.2.2		Implementierung von SOP GA0007 - Reinigung der Ausrüstungsgegenstände	C.13
		16.5		Herstellvorschrift Feed-Medium	C.14
		16.6		Herstellvorschrift Batch-Medium	C.15
Externe	1.10		Einweisung jedes Besuchers/jeder Besucherin mit Checkliste	D.1	

Maßnahmenkatalog zur Risikoreduzierung durch Schulungen für Studierende und externe Personen, dunkelgrün hinterlegt ist die Art der Maßnahme, hellgrün hinterlegt sind betroffene Personen, Referenz bezieht sich auf die in Abbildung 11 - Abbildung 13 identifizierten Risiken, jede Maßnahme bekommt ein spezielles Maßnahmenkürzel

Abbildung 34

	betrifft:	Referenz	Maßnahmen	Maßnahmen-Kürzel
Systemüberwachung	ForschungsmitarbeiterInnen/TutorInnen (Teil 1)	11.3.2 11.3.3 14.3.2 14.3.3 16.2.2 16.2.3	Implementierung von SOP PF0002 - Sterilisation fix installierter Kessel	E.1
		1.1 1.2 1.8 10.2 13.1.2	Implementierung von SOP GK0013 - Selbstinspektion	E.2
		13.1.3 16.2.2 16.2.3	Instandhaltung der Räumlichkeiten (Wände, Decken, Oberflächen, etc.) durch regelmäßige Checks festgelegte, dokumentierte Reinigungszyklen der Arbeitskleidung	E.3
		1.8	Implementierung von SOP GU0002 - Reinigung des Technikums	E.4
		1.1	mikrobiologisches Monitoring	E.5
		1.5	Besucher unter ständiger Begleitung des Stammpersonals	E.6
		1.10	Datenlogger für Temperatur und Feuchtigkeit	E.7
		4.1.3 4.1.4	Implementierung von SOP GG0008 - Temperaturerfassung und Qualifizierung von Geräten mit konstanter Temperatur	E.8
		4.1.3 4.1.4	Protokollierung der Aliquotierung (in-house-/Außer-Haus-Waren)	E.9
		4.1.7 4.2.7	Geräteüberprüfung durch zertifizierte/akkreditierte Stelle (Liste der betroffenen Geräte erstellen)	E.10
		5.1.2	visuelle Überprüfung des laminaren Luftstroms	E.11
		5.1.2	Kalendereintragungen mit Nennung von Zelllinie oder Bakterienstamm / Auslastungsplanung	E.12
		5.3	Implementierung von SOP PF0001 - Reinigung fix installierter Gefäße	E.13
		8.1 8.3.2 9.1 9.3.2 14.1.2		

Maßnahmenkatalog zur Risikoreduzierung durch Systemüberwachung für ForschungsmitarbeiterInnen (Teil 1), dunkelgrün hinterlegt ist die Art der Maßnahme, hellgrün hinterlegt sind betroffene Personen, Referenz bezieht sich auf die in Abbildung 1.1 - Abbildung 13 identifizierten Risiken, jede Maßnahme bekommt ein spezielles Maßnahmenkürzel

Abbildung 35

	betrifft:	Referenz	Maßnahmen	Maßnahmen-Kürzel
Systemüberwachung	ForschungsmitarbeiterInnen/TutorInnen (Teil 2)	10.1.1	Kennzeichnung und Lagerung von Luft-/Sterilfilter an verschiedenen Orten	E.15
		10.1	genaue Überwachung von abnormalen Flussraten	E.16
		10.1.2 16.3	regelmäßiger Wechsel des Sterilfilters/Gasfilters	E.17
		13.1 16.2	regelmäßiger Wechsel der Ventile/Ventilmembranen	E.18
		10.3.2 13.1	regelmäßige Dichtheitsprüfung der Ventile, Ventilmembranen und Dichtringen an Sterilfiltration und Medienlagerbehälter	E.19
		11.3.2 11.3.3 14.3.2 14.3.3	regelmäßige Temperaturprotokollierung an Rohren und Kessel während Sterilisation	E.20
		14.1.3	Protokollierung der Nachreinigung in Mikrobiologiefermenter	E.21
		16.4	Probenahme Flüssigkeiten	E.22
		16.3	Implementierung von SOP GU0006 - Monitoring Druckluft	E.23
		16.3	Integritätstest Gas-Filter	E.24
		16.4	Implementierung von SOP GG0004 - Mikrobiologische Qualitätskontrolle von HQ-Wasser, Reindampf und RO-Wasser	E.25
		16.4	Implementierung von SOP GG0006 - Maßnahmen zur Qualitätserhaltung des HQ-Wassers	E.26
		16.5	Probenahme Feed-Medium	E.27
16.6	Probenahme Batch-Medium	E.28		
16.3 16.4	genaue Spezifikationen der Gase und Flüssigkeiten	E.29		
1.5	detailliertes Reinigungsprotokoll	E.30		

Maßnahmenkatalog zur Risikoreduzierung durch Systemüberwachung für ForschungsmitarbeiterInnen (Teil 2), dunkelgrün hinterlegt ist die Art der Maßnahme, hellgrün hinterlegt sind betroffene Personen, Referenz bezieht sich auf die in Abbildung 11 - Abbildung 13 identifizierten Risiken, jede Maßnahme bekommt ein spezielles Maßnahmenkürzel

Abbildung 36

	betrifft:	Referenz	Maßnahmen	Maßnahmen-Kürzel
Systemüberwachung	Studierende/ Praktikant/ Innen	4.2.5	Anwendung des Vier-Augen-Prinzips	F.1
		5.1.3		
		10.1.1	Implementierung von SOP PF0002 - Sterilisation fix installierter Kessel	F.2
		13.3		
		11.3.2		
	14.3.2			
	14.3.3	Entnahmeprotokoll	F.3	
	16.2.2			
	16.2.3	Implementierung von SOP PF0001 - Reinigung fix installierter Gefäße	F.4	
	4.3			
	8.1			
	8.3.2	Studierende schnell erkennbar (durch Namensschild)	F.5	
	9.1			
	9.3.2	Kontrolle, ob Seife vorhanden	G.1	
	14.1.2			
1.4				
1.2				
1.5				
1.5	detailliertes Reinigungsprotokoll	G.2		
1.5.1				
1.5.1	Implementierung von SOP GU0002 - Reinigung des Technikums	G.3		
4.1.3				
4.2.3				
4.2.4				
4.1.4	Nachweis der Einweisung des Reinigungspersonals durch Vorgesetzte(n)	G.4		
6.1				
6.1	Überwachung der Kühlräume mit Haustechnik vernetzt - Feedback von Haustechnik an Leiter Pilotanlage	H.1		
1.3.2				
1.10				
1.10	regelmäßige Überprüfungen (Raumfilter) mit Nachweis	H.2		
1.10				
1.10	Besucher unter ständiger Begleitung des Stammpersonals	I.1		
1.10				
1.10	Eintrag ins Besucherbuch	I.2		
1.10				

Maßnahmenkatalog zur Risikoreduzierung durch Systemüberwachung für Studierende, Reinigungsfachkräfte, Haustechniker und Externe, dunkelgrün hinterlegt ist die Art der Maßnahme, hellgrün hinterlegt sind betroffene Personen, Referenz bezieht sich auf die in Abbildung 11 -Abbildung 13 identifizierten Risiken, jede Maßnahme bekommt ein spezielles Maßnahmenkürzel

Abbildung 37

	Referenz	Maßnahmen	Maßnahmen- kürzel
Innovation	1.6	Meldung einer Reise in tropische Gebiete (Typhus)	J.1
	3.1	SOP für geeigneten Transport erstellen	J.2
	4.1.3 4.2.3	Notstromaggregat-Anschluss (prioritär für Tiefkühlgeräte)	J.3
	4.3	Trennung der Materialien für Studien-/Forschungsbetrieb	J.4
	10.2 15.1	Programm für Ventiliereinfolge erstellen / Automatisierung	J.5
	10.3.2 13.1.3 13.1.3 16.2.2 16.2.3	regelmäßiger, definierter Wechsel/Wartung von Ventilen und Schläuchen	J.6
	16.3	Einmalverwendbare Schläuche benutzen	J.7
	13.2.2 15.2.1 16.8.2	Fixe Transferteilung von Medienlagerbehälter zu Mikrobiologieförderer verwenden	J.8
	13.2.2	SOP für Abflammen von Septen erstellen	J.9
	16.7.1		

Maßnahmenkatalog zur Risikoreduzierung durch Innovation, dunkelgrün hinterlegt ist die Art der Maßnahme, hellgrün hinterlegt sind betroffene Personen, Referenz bezieht sich auf die in Abbildung 11 - Abbildung 13 identifizierten Risiken, jede Maßnahme bekommt ein spezielles Maßnahmenkürzel

5.4 Ausblick

Die mikrobiologische Überwachung in der Pilotanlage des DBT ist durch zwei grundsätzliche Faktoren sehr aufwendig. Einerseits wird die Anlage aus Sicht der Prozesse mehrfach genutzt und andererseits ist die Personenfluktuation durch den forschungsgetriebenen Lehrauftrag komplexer als in einem pharmazeutisch herstellenden Betrieb.

Eine Anlage dieser Funktionalität einzusetzen und trotzdem die Idee der Guten Herstellungspraxis einzubetten, ist eher unüblich. Das DBT hat sich jedoch aufgrund seiner Philosophie dahingehend entschieden den Auszubildenden ein Maximum an GMP-Kenntnissen zu vermitteln und es gleichzeitig möglich zu machen die Anlage für Forschungsprojekte zu nutzen.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen und vorgeschlagenen Maßnahmen kann das Umgebungsmonitoring über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Davon abgeleitet können sowohl relevante Grenzwerte eingeführt werden, sodass es beispielsweise einen Warn- sowie Arbeitsgrenzwert gibt, aber auch Abläufe optimiert werden. Dies betrifft die Planung von Prozessschritten, die Einbettung von Praktika, notwendige Reinigungs- und Wartungsintervalle sowie Schulungsaktivitäten.

Pasquarella et al. beschreiben, dass Sedimentationsplatten von vielen Personen als nicht zuverlässig eingestuft werden.³⁴ In diesem Artikel berichten sie aber ebenfalls, dass sie die Sedimentationsplatten als wichtige Ergänzung zur aktiven Luftkeimsammlung sehen um eine Aussage über die Gesamtkeimzahl zu treffen. Sie haben ein 1/1/1-Schema angewendet (1 Meter über dem Boden, 1 Meter von jedem Hindernis entfernt, für 1 Stunde offen), was in meiner Arbeit nicht anwendbar war. Die Sedimentationsplatten gleichzeitig auf 1 Meter Höhe im Raum zu halten gestaltet sich vor allem schwierig, sobald das Monitoring im Betriebszustand durchgeführt werden soll. Sie werden stattdessen auf dem Boden abgestellt. Außerdem kann die Entfernung 1 Meter von jedem Hindernis/Wand auch nicht eingehalten werden, da sonst einige Messpunkte komplett wegfallen müssten. Ebenfalls ist es wichtig, dass die Messung durchgeführt werden kann, wenn die Personen in der Pilotanlage arbeiten. Deshalb ist es kontraproduktiv diese Messpunkte zentraler in den Raum zu

rücken. Dies würde dazu führen, dass die Sedimentationsplatten übersehen und zerstört werden.

Zum Monitoring selbst hat sich herausgestellt, dass die Wahl der Probenahmeorte und die Methodik sinnvoll gewählt wurden.

Alternative mikrobiologische Methoden könnten auch zur Anwendung kommen, zumal es sie bereits seit längerer Zeit gibt. Im GMP-geregelten Bereich wird jedoch oft kritisiert, dass die Validierung gegenüber den langwierigen Nährmedien-Standards fehlt.³⁵ Im Falle der Pilotanlage ist die Validierung keine prinzipiell geforderte Voraussetzung. Ob allerdings die Kosten und der Aufwand für den gegebenen Fall zielführend sind, bleibt offen.

Nicht alle vorhandenen und viablen Keime wachsen auf den Allgemeinmedien. Von Nagarkar et al.³⁶ wurde deshalb vorgeschlagen oligophile Bakterien als Monitoringindikatoren zu benutzen. Diese Sicht hat sich im Allgemeinen jedoch nicht durchgesetzt.

Prinzipiell wird erst nach einem längeren Beobachtungszeitraum mit weiteren Umgebungsuntersuchungen das optimale Design und der optimale Maßnahmenkatalog festzulegen sein.

6 Literatur

1. COMMISSION DIRECTIVE 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use. (2003).
2. COMMISSION DIRECTIVE of 23 July 1991 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice for veterinary medicinal products. (1991).
3. EUROPEAN COMMISSION. Introduction. (2010).
4. ICH, Q. Quality risk management. *ICH Expert Work. Group* (2005).
5. Guideline, I. H. T. *viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A (R1)*. (1997).
6. Committee, I. S. & Products, C. for P. M. *ICH Harmonised Tripartite Guideline Q5C: Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products*. 1995. (CPMP/ICH/138/95).
7. Guidance, I. C. H. Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological. *Biol. Prod.* **63**, (1998).
8. Administration, U. F. and D. ICH Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process. *US FDA Rockv. MD*
Www Fda GovOHRMSDOCKETS98fr2004d-0118-Gdl0001 Pdf Nov 13 2003
9. Guideline, I. H. T. Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. Q6A. in *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland* (1999).

10. *Guidance for industry Q6B specifications : test procedures and acceptance criteria for biotechnological /biological products.* (Rockville, MD : U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research : Center for Biologics Evaluation and Research, [1999], 1999). at <<https://search.library.wisc.edu/catalog/9910092470002121>>
11. ICH, Q. *Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients.* (2000).
12. Maas, A. *GMP-Berater: Nachschlagewerk für Pharmaindustrie und Lieferanten. Die praxisorientierte Loseblattsammlung für die Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice). K-M. Bd. E.* (Maas und Peither GMP Verlag, 2000).
13. EUROPEAN COMMISSION. Part II: Basic Requirements for Active Substances used as Starting Materials. (2014).
14. EUROPEAN COMMISSION. Chapter 1 Pharmaceutical Quality System. (2013).
15. EUROPEAN COMMISSION. Chapter 4: Documentation. (2011).
16. Auberle, A. *et al. Duden-die deutsche Rechtschreibung.* (Dudenverlag, 2009).
17. Lundén, A. *The GMP handbook (good manufacturing practice) : quality systems for the pharmaceutical industry.* (Lundén/Elow AB, 2012).
18. Kastango, E. S. & Douglass, K. QUality Assurance for Sterile Products. *Int. J. Pharm. Compd.* **5**, 246 (2001).
19. Bowles, J. B. & Peláez, C. E. Fuzzy logic prioritization of failures in a system failure mode, effects and criticality analysis. *Reliab. Eng. Syst. Saf.* **50**, 203–213 (1995).

20. Stamatis, D. H. *Failure mode and effect analysis: FMEA from theory to execution*. (ASQ Quality Press, 2003).
21. Zadeh, L. A. Fuzzy sets. *Inf. Control* **8**, 338–353 (1965).
22. Ölcer, A. İ. & Odabasi, A. Y. A new fuzzy multiple attributive group decision making methodology and its application to propulsion/manoeuvring system selection problem. *Metaheuristics Worst-Case Guarant. Algorithms Relat. Provable Prop. Appl.* **166**, 93–114 (2005).
23. Liu, H.-C., Liu, L. & Liu, N. Risk evaluation approaches in failure mode and effects analysis: A literature review. *Expert Syst. Appl.* **40**, 828–838 (2013).
24. EUROPEAN COMMISSION. Chapter 2: Personnel. (2014).
25. Administration, U. F. and D. CFR-code of federal regulations title 21. *Curr. Good Manuf. Pract. Finish. Pharm. Part* **211**, (2010).
26. EUROPEAN COMMISSION. Chapter 3: Premises and Equipment. (2015).
27. EUROPEAN COMMISSION. Chapter 5: Production. (2014).
28. Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten. Aide mémoire Bio- und Gentechnologie. (2006).
29. ISO, E. 14644-1, 'Cleanrooms and associated controlled environments—Part 1: Classification of air cleanliness,'. *Eur. Stand.* (1999).
30. Marshall, V., Poulson-Cook, S. & Moldenhauer, J. Comparative Mold and Yeast Recovery Analysis (The Effect of Differing Incubation Temperature Ranges and Growth Media). *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **52**, 165–169 (1998).
31. Gordon, O., Berchtold, M., Staerk, A. & Roesti, D. Comparison of Different Incubation Conditions for Microbiological Environmental Monitoring. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **68**, 394–406 (2014).

32. Alexander, S. K., Strete, D. & Kothe, E. *Mikrobiologisches Grundpraktikum: Ein Farbatlas*. (Pearson-Studium, 2006).
33. Storhas, W. *Bioverfahrensentwicklung*. (John Wiley & Sons, 2013).
34. Pasquarella, C., Pitzurra, O. & Savino, A. The index of microbial air contamination. *J. Hosp. Infect.* **46**, 241–256 (2000).
35. Peris-Vicente, J., Carda-Broch, S. & Esteve-Romero, J. Validation of Rapid Microbiological Methods. *J. Lab. Autom.* **20**, 259–264 (2015).
36. Nagarkar, P. P., Ravetkar, S. D. & Watve, M. G. Oligophilic bacteria as tools to monitor aseptic pharmaceutical production units. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1371–1374 (2001).

Definition GMP der WHO_Homepage: abgerufen am 22.11.2015

http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/gmp/en/

Bildquelle 3-Eimer-Wagen: abgerufen am 10.12.2015

http://img.directindustry.com/images_di/photo-m2/janitorial-trolleys-37507-2695509.jpg

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Curriculum vitae

Name	Christoph Aner	
Geburtsdatum	13.04.1988	
Geburtsort	Annaberg-Buchholz	
Nationalität	deutsch	
Schulbildung	09/1995 - 08/1999	Grundschule Neugereut, Stuttgart
	09/1999 - 06/2008	Gymnasium Jörg-Ratgeb-Schule Neugereut, Stuttgart
Schulabschluss	06/2008	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	09/2008 - 05/2009	Personenbeförderung, Deutsches Rotes Kreuz, Stuttgart
Studium	10/2009 - 01/2013	Ernährungswissenschaften, Universität Wien
	seit 03/2013	Molekulare Biologie, Universität Wien
Praktika	02/2004	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
	04/2006	Neckartalwerkstätten, Esslingen
	07/2011	Ernährungsberatung, Esslingen
	08/2011	Lebensmittelüberwachung, Stuttgart
	10/2012 - 03/2013	Naturwissenschaftlich-Medizinisches Institut, Reutlingen
	11/2014 - 12/2014	Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart
Fremdsprachen	Englisch	Fließend
	Spanisch	Grundkenntnisse
	Französisch	Grundkenntnisse

Wien, den 31.12.2015