

# Primärvalidierung der Durchflusszytometrie als mikrobiologische Schnellmethode für Pharmawasser

Gemäß den Pharmakopöen (USP/Ph. Eur.), Folgen und Beispiele aus der Praxis

Dr. Jürgen Illerhaus und Felix Thiele<sup>\*)</sup>

BWT Aqua AG, Aesch (Schweiz)

Die mikrobiologische Überwachung einer Anlage zur Erzeugung von Pharmawasser stellt eine große Herausforderung dar. Mit dem überarbeiteten Annex 1 werden diese Anforderungen noch drastisch erhöht: Eine sog. Kontaminations-Kontrollstrategie muss implementiert werden. Allerdings können diese Anforderungen mit dem herkömmlichen Plattentest nur schwer erfüllt werden. Eine kontinuierliche, vollautomatische Überwachung aller Verfahrensschritte ist ein Schlüssel, um diese Anforderungen zu erfüllen. Die Durchflusszytometrie bietet hierbei ein geeignetes Werkzeug. Sie ist eine seit Langem bekannte und etablierte Methode, die in anderen Anwendungen schon Alltag ist. Für die pharmazeutische Industrie ist die Validierung einer neuen Methode die größte Herausforderung. In diesem Beitrag soll die Primärvalidierung als Basis aller weiteren Validierungsschritte vorgestellt werden.

## 1. Einleitung

### ■ 1.1 Mikrobiologische Kontrolle von pharmazeutischem Wasser

Wasser kommt in der pharmazeutischen Industrie bei der Herstellung von praktisch allen Produkten zum Einsatz. Dabei ist Wasser entweder ein wesentlicher Bestandteil des Endprodukts oder es wird als Hilfs-

stoff während der Herstellung und/oder für Reinigungs- und Spülprozesse der Anlagen verwendet. Die beiden Qualitätsstufen, die in den Arzneibüchern definiert sind, heißen gereinigtes Wasser (engl. Purified Water = PW [1]) und Wasser für Injektionszwecke (engl. Water for Injection = WFI [2]).

Wasser für pharmazeutische Anwendungen unterliegt besonderen Anforderungen, wobei die mikrobiologische Qualität ein wesentlicher Faktor für die Sicherheit der Patienten und die Qualität von pharmazeutischen Produkten ist [3]. Als Einheit für die Bewertung der mik-

robiologischen Qualität wird derzeit die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) in den Arzneibüchern verwendet. KBE werden mit dem traditionellen Plattentest (engl. heterotrophic plate count = HPC) quantifiziert. Dieser ist im europäischen Arzneibuch „European Pharmacopoeia“ (Ph. Eur.) in den jeweiligen Monografien für PW (Ph. Eur. 0008) und WFI (Ph. Eur. 0169) definiert. Im amerikanischen Arzneibuch „United States Pharmacopoeia“ (USP) wird der Test in der USP <1231> [4] in den Kap. 8.5.2 und 8.5.3 beschrieben.

Diese Methode hat allerdings erhebliche Nachteile. Selbst in den Pharmacopöen wird erwähnt, dass es sich nur um eine grobe Abschätzung der Keimzahl handelt. Der Vergleich mit anderen Methoden zeigt, dass einerseits nur eine kleine Zahl von Mikroorganismen, die auf den Platten aufgetragen werden, tatsächlich zu Kolonien heranwachsen (sog. viable but not culturable, VBNC), und andererseits, dass die Mikroorganismen sehr häufig in Form von Konglomeraten vorliegen, die z. T. aus einer großen Zahl von Zellen bestehen. Auf dem Plattentest erscheint allerdings nur eine einzige Kolonie. Dies hat zur Folge, dass mit dem übliche Plattentest ein potenziell hohes Risiko besteht, die tatsächliche mikrobiel-

<sup>\*)</sup> Felix Thiele arbeitete bis 2022 bei BWT Aqua AG und war maßgeblich an der Erstellung dieses Beitrags beteiligt.

le Belastung des Wassers zu unterschätzen. Außerdem ist diese Methode sehr anfällig für unbeabsichtigte Kontamination. Dadurch kommt es relativ häufig zu falsch positiven Ergebnissen, was aufwendige Untersuchungen und Verzögerungen bei der Produktfreigabe nach sich zieht. Zudem ist diese wachstumsbasierte Methode nicht geeignet für eine echte Prozesskontrolle, da die Ergebnisse erst mehrere Tage nach der Probenahme vorliegen. Der Annex 1 des EU-Leitfadens zur Good Manufacturing Practice (GMP) fordert eine Contamination Control Strategy (CCS), die basierend auf einer Risikoanalyse alle wesentlichen Produktionsstufen überwacht. Dies ist mit der herkömmlichen Methode außerordentlich aufwendig.

Mikrobiologische Schnellmethoden (engl. Rapid Microbiological Methods = RMM) bieten hier Verbesserungsmöglichkeiten, da sie die mikrobiologische Qualität schneller und zuverlässiger bewerten können. RMM werden bereits seit mehr als 3 Jahrzehnten in anderen Bereichen eingesetzt. In der pharmazeutischen Industrie sind sie jedoch ein Novum, und die pharmazeutischen Unternehmen erkennen erst langsam den Mehrwert der kontinuierlichen Kontaminationskontrolle [5].

### ■ 1.2 Unterstützung für den Einsatz von RMM

Ein Zeichen für das wachsende Interesse ist die Gründung der „OWBA-Arbeitsgruppe“, in der sich mehrere pharmazeutische Unternehmen zusammengeschlossen haben, um gemeinsam die Entwicklung der Online Water Bioburden Analyzer<sup>1)</sup> voranzutreiben [6]. Leitliniendokumente, einschließlich der jüngsten Überarbeitung des GMP-Annex 1 aus dem Jahre 2022, unterstützen

eindeutig die Anwendung von RMM und weisen darauf hin, dass diese Technologien in Betracht gezogen werden sollten, um den Schutz des Produkts vor mikrobieller Kontamination zu erhöhen [7]. Weiterhin definiert das Dokument den Begriff der ganzheitlichen Kontaminationskontrollstrategie. Auch die European Medicines Agency (EMA) verweist in ihrem Q&A-Dokument zur membranbasierten WFI-Erzeugung auf den Einsatz einer zuverlässigen Kontrollstrategie. Da der Nachweis von Kontaminationen des Wassers wegen losgerissener Biofilme mit Einzelmessungen schwierig ist, werden kontinuierliche Überwachungssysteme empfohlen. Zudem wird die Trendanalyse als kritischer Faktor angesehen. Dementsprechend sollten RMM in Erwägung gezogen werden, um die frühzeitige Erkennung von Kontaminationen oder Biofouling gewährleisten zu können und sicherzustellen, dass zeitnah reagiert werden kann [8].

### ■ 1.3 Herausforderungen beim Einsatz

Es stellt sich die Frage, warum sich der Markt nur zögerlich bewegt, obwohl die gesetzlichen Grundlagen für den Einsatz von RMM gelegt sind und augenscheinlich das Interesse der Unternehmen vorhanden ist.

Die größte Herausforderung ist sicherlich, dass der Anwender einer solchen Methode nachweisen muss, dass die „alternative Methode“ (= RMM) mindestens so gut oder sogar besser ist als die „Arzneibuchmethode“ (= HPC). Das bedeutet, dass der Grundsatz der Nicht-Unterlegenheit gilt (engl. non-inferiority [9]). Um diesen Nachweis erbringen zu können, müssen umfangreiche Versuche durchgeführt und die Methoden anhand statistischer Parameter verglichen werden. Der erste Schritt auf dem Weg zu einer validierten Methode ist dabei die Primärvalidierung durch den Hersteller der alternativen Methode.

## 2. Validierung alternativer mikrobiologischer Methoden

### ■ 2.1 Primärvalidierung: 1. Schritt zu einer validierten Methode

Das Kap. 5.1.6 der Ph. Eur. beschreibt detailliert den Weg zu einer validierten alternativen Methode. Die Primärvalidierung ist dabei der erste Schritt zu einer Validierung. Laut Tab. 1 aus der Ph. Eur. ist die Primärvalidierung durch den Hersteller durchzuführen. Falls diese von Herstellerseite nicht verfügbar ist, muss sie aufwendig durch den Nutzer selbst erarbeitet werden.

Auf Basis der Daten der Primärvalidierung und des geplanten Einsatzes entscheidet der Anwender risikobasiert den Umfang der durchzuführenden Tests. Im Rahmen der PQ werden Daten der Primärvalidierung verifiziert oder ergänzt, wenn z. B. relevante mikrobiologische Stämme nicht geprüft wurden. Außerdem wird der Eignungstest (engl. method suitability) durchgeführt und es wird überprüft, ob die Methode für den geplanten Einsatzzweck geeignet ist. Zusätzlich werden während dieser Phase auch evtl. nötige Grenzwerte definiert.

### ■ 2.2 Relevante Dokumente

Die Arzneibücher und andere Institutionen bieten Dokumente als Grundlage für die Planung und Durchführung einer Primärvalidierung an. Im Folgenden werden die 3 relevantesten kurz beschrieben.

#### 2.2.1 Ph. Eur. 5.1.6

Die Ph. Eur. wird von der Europäischen Arzneibuchkommission und der Europäischen Direktion für die Qualität von Arzneimitteln und Gesundheitsfürsorge (EDQM) herausgegeben. Sie enthält fast 3 000 Monografien mit Qualitätsstandards für Stoffe und Produkte sowie allgemeine Analysemethoden. Die Ph. Eur. hat in den Mitgliedsstaaten der EU und darüber hinaus rechtsverbindlichen Status [10].

<sup>1)</sup> Äquivalent zu „RMM für Pharmawasser“

■ Tabelle 1

Während des Validierungsprozesses durchzuführende Tätigkeiten (Quelle: Ph. Eur. 5.1.6).

Activity	Normally carried out by	
	Supplier	User
Primary validation	+	_1
URS (instrument, application)	-	+
Description of the technique	+	_2
Risk benefit analysis	_3	+
Design qualification (DQ)	-	+
Installation qualification (IQ)	_4	+
Operational qualification (OQ)	_4	+
Performance qualification (PQ):		
- verification of primary validation data provided by the supplier;	-	+
- verification of the intended use (e.g. sterility testing, TAMC/TYMC, ...);	-	+
- method suitability test	-	+

<sup>1</sup> Der Anwender führt die Primärvalidierung durch, wenn er die Alternativmethode für eine andere als die vom Anbieter definierte Anwendung einsetzt.

<sup>2</sup> Der Anwender muss die vom Anbieter zur Verfügung gestellten Informationen kritisch prüfen.

<sup>3</sup> Im Rahmen der Kommerzialisierung kann der Lieferant die Vorteile der alternativen Methode gegenüber den Techniken des Arzneibuchs auflisten.

<sup>4</sup> IQ/OQ für komplexe Geräte, IQ/OQ wird häufig an den Lieferanten ausgelagert.

Kapitel 5.1.6 „ALTERNATIVE METHODEN ZUR KONTROLLE DER MIKROBIOLOGISCHEN QUALITÄT“ in der Ph. Eur. 10.0 von 07/2017 (07/2017:50106) beschreibt die Anwendung von mikrobiologischen Methoden, die nicht den in der Ph. Eur. beschriebenen Standardmethoden entsprechen. Der Zweck des Kapitels ist es, „die Implementierung und Anwendung alternativer mikrobiologischer Methoden zu erleichtern, wenn dies zu einer effizienten mikrobiologischen Kontrolle und einer verbesserten Qualitätssicherung von pharmazeutischen Produkten führen kann“ [11] (aus dem Englischen übersetzt). Das Kapitel enthält eine Auflistung bestehender Methoden sowie Einzelheiten zum Validierungsprozess einer alternativen Methode. Abschnitt 3-3-2 in dem o. g. Dokument behandelt die Validierung von quantitativen Methoden und enthält eine kurze Beschreibung der statistischen Parameter.

## 2.2.2 USP <1223>

Die USP ist das US-amerikanische Äquivalent zur Ph. Eur. Die USP-Konvention „entwickelt und veröffentlicht Standards für Arzneimittelwirkstoffe, Arzneimittelprodukte, Hilfsstoffe und Nahrungsergänzungsmittel in der United States Pharmacopeia-National Formulary (USP-NF)“ [12] (aus dem Englischen übersetzt). Die USP-Standards sind in den Vereinigten Staaten und anderen Ländern gesetzlich anerkannt. Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) und andere Behörden sind für die Durchsetzung der beschriebenen Standards verantwortlich. Die Monografie <1223> „VALIDATION OF ALTERNATIVE MICROBIOLOGICAL METHODS“ der USP43 NF38 [13] enthält eine Anleitung für den Implementierungsprozess alternativer mikrobiologischer Methoden. Das Kapitel umfasst Einzelheiten zum Validierungsprozess einer alternativen Methode und eine kurze Beschreibung der statistischen Para-

meter. Zusätzlich werden Beispiele zum Äquivalenznachweis für alternative quantitative mikrobiologische Verfahren aufgeführt.

## 2.2.3 PDA Technical Report Nr. 33

Die Parenteral Drug Association (PDA) ist eine gemeinnützige Organisation, die technische Informationen und Fachwissen auf dem Gebiet der pharmazeutischen Herstellung bereitstellt [14]. Die Organisation veröffentlicht technische Berichte (engl. Technical Reports = TR) zu Themen im Zusammenhang mit Fragen der pharmazeutischen Industrie. Die TRs werden von Fachleuten verfasst und von Experten begutachtet [14]. TR-33, „Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods“ (Bewertung, Validierung und Umsetzung neuer mikrobiologischer Testmethoden) wurde im Jahr 2000 veröffentlicht und soll „eine Anleitung für die erfolgreiche Bewertung,

Validierung und Umsetzung neuer mikrobiologischer Methoden bieten, die von der pharmazeutischen Industrie zur Sicherung der Produktqualität benötigt werden“ [15] (aus dem Englischen übersetzt). Weiter heißt es, dass diese neuen Methoden für die Überwachung von pharmazeutischem Wasser angewendet werden können. Der erste Teil des Dokuments befasst sich mit der Bewertung einer neuen Technologie und den geltenden Vorschriften. Im zweiten Teil werden die Wege zur Validierung und Implementierung einer neuen Methode aufgezeigt. Die Validierungsparameter werden kurz mit Akzeptanzkriterien definiert.

## ■ 2.2 Durchführung der Primärvalidierung

Es gibt verschiedene Instrumente zur Online-/Atline-Analyse, die unterschiedliche Technologien verwenden. In dieser Primärvalidierung wurde der AQU@Sense MB (Abb. 1) validiert. Dieser nutzt das bekannte Prinzip der Durchflusszytometrie. Diese Technologie ist eine quantitative Methode, die im Ph. Eur. 5.1.6. [11] und dem PDA TR-33 [15] erwähnt wird.

Bei der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen oder Partikel nach Anfärbung mit spezifischen Farbstoffen charakterisiert und quantifiziert, während sie in einem engen Flüssigkeitsstrom fließen, der von einer fokussierten Lichtquelle beleuchtet wird. Die daraus resultierende Lichtstreuung und Fluoreszenzemission wird von optischen Detektoren aufgezeichnet, die dann multiparametrische Informationen (einschließlich der Partikelkonzentration, Größe oder Lebensfähigkeit der Zellen) liefern können.

Die Primärvalidierung wurde in Zusammenarbeit mit der Fachhochschule Nordwestschweiz (FHNW) und der TU Eindhoven durchgeführt.

Im Folgenden werden einige Beispielergebnisse der Primärvalidierung der alternativen Methode vorgestellt. Die im obigen Text beschriebenen Prinzipien fanden in

der Planung und Durchführung der Validierung Anwendung.

### 2.3.1 Praxisbeispiel: Genauigkeit und Linearität

Gemäß den Leitfäden muss die Genauigkeit über den gesamten Bereich der Methode bewertet werden. Aus diesem Grund und wegen der Praktikabilität der Tests wurde der Versuch in Kombination mit den Tests für den Parameter Linearität durchgeführt.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse des Experiments zur Genauigkeit und Linearität für *Ralstonia pickettii*. Dabei wurden die konventionelle Methode und das Durchflusszytometer über eine Messung der gleichen Proben verglichen. Die Zellzahl wurde auf Basis des PDA TR-33 und der USP so gewählt, dass eine optimale Zählung auf den Platten möglich war. Der AQU@Sense MB

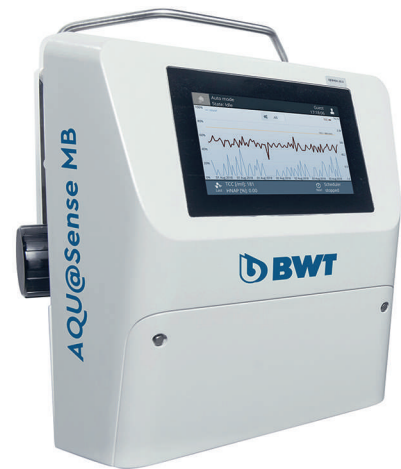


Abbildung 1: AQU@Sense MB. Ein vollautomatisches Durchflusszytometer (Quelle aller Abbildungen: BWT Aqua AG).

zeigte Nicht-Unterlegenheit in Bezug auf die Parameter Linearität und Genauigkeit über den gesamten Test.

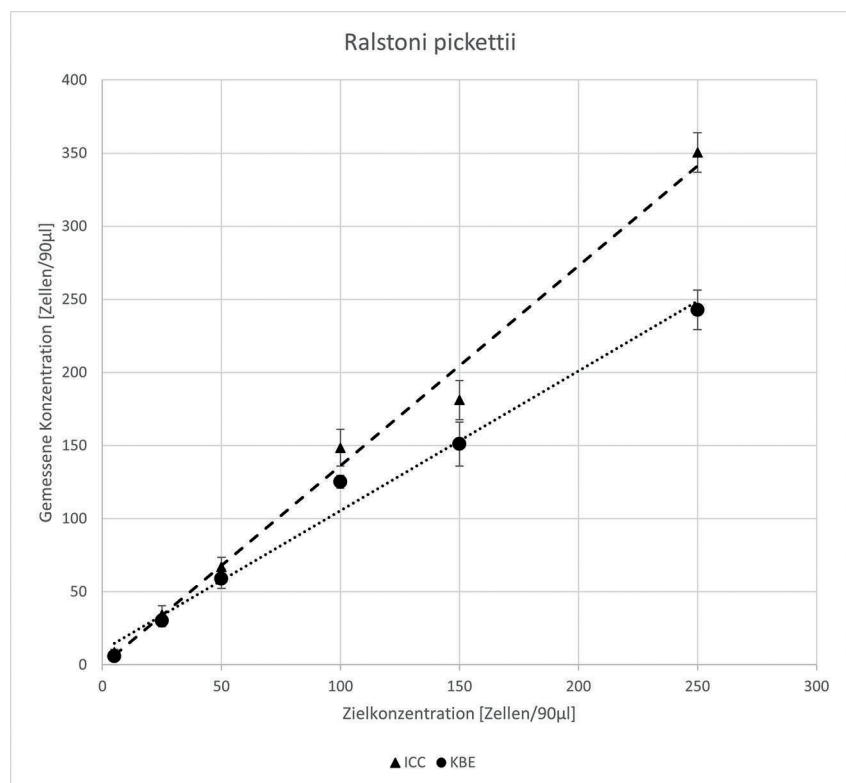


Abbildung 2: Ergebnisse der Untersuchung zur Genauigkeit und Linearität des Durchflusszytometers im Vergleich zum Plattentest mit *Ralstonia pickettii*. (ICC = Intact Cell Counts – lebendige, wachsende Zellen).

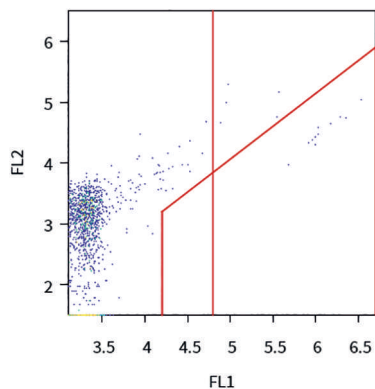


Abbildung 3: Ergebnis einer Messung von *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788) mit dem genutzten Messgerät. FL1 entspricht der grünen und FL2 der roten Fluoreszenzintensität. Die Punkte innerhalb des Gates werden als lebende Zellen interpretiert.

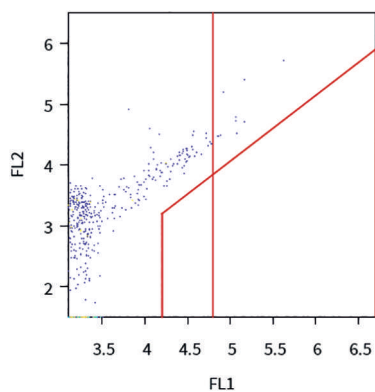


Abbildung 4: Eisenpartikel mit einer Konzentration von 10 µg/l in sterilem Wasser. Es ist zu erkennen, dass innerhalb des Gates (rotes Polygon) keine Punkte zu sehen sind und somit keine Partikel fälschlicherweise als Mikroorganismen erkannt wurden.

### 2.3.2 Praxisbeispiel: Spezifität

Die Spezifität dieser Methode ist ihre Fähigkeit, für pharmazeutische Wassersysteme relevante Mikroorganismen zu detektieren. Darüber hinaus werden Partikel, die in pharmazeutischen Wassersystemen vorkommen können, nicht als falsch-positives Ergebnis gewertet.

Die verwendeten Stämme wurden in Übereinstimmung mit den Leitdokumenten und der aktuellen Literatur über die Prävalenz von Bakterien- und Pilzstämmen in pharmazeutischen Wassersystemen

ausgewählt. Zusätzlich wurde noch die USP <1231> WATER FOR PHARMACEUTICAL PURPOSES (auf Deutsch: Wasser für pharmazeutische Zwecke) hinzugezogen. Das Kapitel ist ein „Informationskapitel zu pharmazeutischen Wasserthemen und enthält einige der chemischen und mikrobiologischen Aspekte, die für Wasser, seine Aufbereitung und Verwendung von Bedeutung sind“ [4] (aus dem Englischen übersetzt).

Die Auswahl konzentrierte sich auf gramnegative Bakterien, da diese in pharmazeutischen Wassersystemen am häufigsten vorkommen [4, 16, 17]. Die Gattungen *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* und *Sphingomonas* weisen eine hohe Prävalenz in PW-Systemen auf, wobei *Ralstonia pickettii* und *Burkholderia cepacia* die am häufigsten vorkommenden Spezies sind [17]. Darüber hinaus umfasste die Auswahl Stämme, die für Wachstumsförderungstests für R2A-Agar [1, 2, 18] verwendet werden, sowie Stämme, die aufgrund externer Probenkontaminationen häufig vorkommen [4, 16]. Gleichzeitig wurden gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, sporulierende Bakterien, eine Hefe und ein Schimmelpilz erfasst, um einen Grundsatzbeweis für die Nachweisfähigkeit der verwendeten alternativen Methode zu erbringen. Alle Mikroorganismen wurden während der Primärvalidierung erfolgreich detektiert. Ein Beispiel

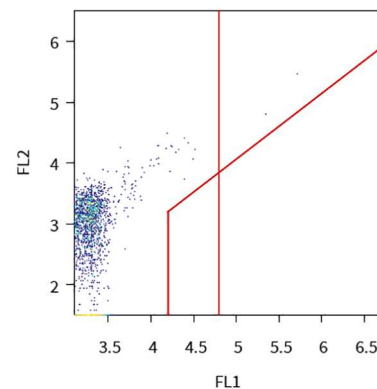


Abbildung 5: Polystyrol-Partikel mit einer Konzentration von 10 µg/l in sterilem Wasser. Es ist zu erkennen, dass innerhalb des Gates (rotes Polygon) keine Punkte zu sehen sind und somit keine Partikel fälschlicherweise als Mikroorganismen erkannt wurden.

von *Staphylococcus aureus* ist in Abb. 3 zu sehen. Die detektierten Zellen sind zum besseren Verständnis der Abb. blau eingekreist. Alles, was sich innerhalb des roten Polygons (Gate) befindet, wird als intakte Zelle (intact cell count – ICC) interpretiert. Für weitere Details zur Entstehung und Interpretation der Daten wird auf eine Veröffentlichung in der European Pharmaceutical Review hingewiesen [19].

Innerhalb der Spezifität ist allerdings nicht nur die korrekte Detektion der Zielorganismen zu prüfen, sondern auch der Einfluss anderer Substanzen auf potenziell falsch-positive Ergebnisse. Laut OWBA [20]

■ Tabelle 2

### Ergebnisse der Einzelversuche zur Primärvalidierung.

Parameter	Ergebnis	Details
Genauigkeit	bestanden	Nicht unterlegen zur HPC
Präzision	bestanden	RSD <30 %; Nicht unterlegen zur HPC
Spezifität	bestanden	Alle Spezies erkannt
Quantifizierungsgrenze	bestanden	Nicht unterlegen zur HPC
Linearität	bestanden	Nicht unterlegen zur HPC
Messbereich	bestanden	Nicht unterlegen zur HPC
Robustness	bestanden	Betriebs- und Umgebungsvariablen haben keinen Einfluss auf die Testergebnisse
Unempfindlichkeit	bestanden	unbeeinflusst von bewussten Variationen

sind polymere Partikel seit jeher in Wassersystemen vorhanden. Außerdem ist Rouging (eine Form der Oxidation) in thermischen pharmazeutischen Wassersystemen üblich. Aus den betroffenen Bereichen können Eisenoxide in das Wasser abgegeben werden.

Um typische Verunreinigungsquellen zu repräsentieren, wurden Proben untersucht, die Eisenoxide (Abb. 4) und Polystyrol (Abb. 5) enthielten. Die Ergebnisse sind in den betreffenden Abb. zu sehen. Dabei ist zu erkennen, dass keine Punkte innerhalb des Gates liegen. Das Ergebnis war in beiden Fällen „0 ICC/ml“, und es konnte über eine Verdünnungsreihe gezeigt werden, dass die Konzentration dieser Stoffe keinen Einfluss auf das Ergebnis haben.

#### ■ 2.4 Statistische Auswertung

Um einen echten Vergleich der Durchflusszytometrie und der HPC-Methode durchführen zu können, wurden die Daten an der TU Eindhoven mittels statistischer Methoden analysiert. Diese Analyse ergab, dass das hier untersuchte Gerät zur Durchflusszytometrie der klassischen HPC-Methode nicht unterlegen ist (Tab. 2).

### 3. Schlussfolgerung

Der mikrobiologischen Überwachung von pharmazeutischem Wasser kommt eine besondere Bedeutung zu. Das Interesse für das Monitoring durch RMM wächst stetig an, wie an der Bildung von Arbeitsgruppen durch Unternehmen und durch Veröffentlichungen von offizieller Seite zu erkennen ist. Eine der größten Herausforderungen für den Einsatz ist die Validierung dieser neuen Methoden. Dabei kommt der Primärvalidierung durch den Herstel-

ler, als ersten Schritt eine besondere Bedeutung zu.

Das hier vorgestellte Keimzahlmessgerät ist das erste voll automatisierte at-line Instrument für diese mikrobiologische Schnellmethode für den Einsatz in pharmazeutischem Wasser, das erfolgreich einer Primärvalidierung durch den Hersteller unterzogen wurde.

### ■ LITERATUR

- [1] European Pharmacopoeia Commission, „WATER PURIFIED“, in European Pharmacopoeia 10.0, 04/2018:0008
- [2] European Pharmacopoeia Commission, „WATER FOR INJECTIONS“, in European Pharmacopoeia 10.0, 01/2017:0169
- [3] ISPE Volume 4 „Water and Steam Systems“ 2nd edition, Dec. 2011
- [4] USP <1231> „WATER FOR PHARMACEUTICAL PURPOSES“, USP43-NF38, 2020
- [5] Miller MJ. „The regulatory acceptance of rapid microbiological methods“, 2017. <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/62880/rapid-microbiological-methods-regulatory-acceptance/>
- [6] Cundell A. et al. „Novel Concept for Online Water Bioburden Analysis: Key Considerations, Applications, and Business Benefits for Microbiological Risk Reduction“, 2013. <https://www.american-pharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/140513-Novel-Concept-for-Online-Water-Bioburden-Analysis-Key-Considerations-Applications-and-Business-Benefits-for-Microbiological-Risk-Reduction/>
- [7] EU Commission, „EU GMP Annex 1 Revision: Manufacture of Sterile Medicinal Products (Draft)“, 2020. [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/2020\\_annex1ps\\_sterile\\_medical\\_products\\_en.pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/2020_annex1ps_sterile_medical_products_en.pdf)
- [8] European Medicines Agency, „Questions and answers on production of water for injections by non-distillation - reverse osmosis and biofilms and control strategies“, 2017. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-production-water-injections-non-distillation-methods-reverse-osmosis-biofilms\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-production-water-injections-non-distillation-methods-reverse-osmosis-biofilms_en.pdf)
- [9] Miller MJ, van den Heuvel ER, Roesti D. „The role of statistical analysis in validating rapid microbiological methods“. European Pharmaceutical Review, 2016.
- [10] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, „Fact Sheet. The European Pharmacopoeia: ensuring the safety and good quality of medicines“, May 2020. <https://www.edqm.eu/documents/52006/87419/Fact+sheet++The+European+Pharmacopoeia+ensuring+the+safety+and+good+quality+of+medicines+%28May+2020%29.pdf/8242ba18-3cd0-2a22-6ed0-17d9b61d152c?version=1.2&t=1637674230113&download=true>
- [11] European Pharmacopoeia Commission, „5.1.6. ALTERNATIVE METHODS FOR CONTROL OF MICROBIOLOGICAL QUALITY“, in European Pharmacopoeia 10.0, 07/2017:50106.
- [12] USP, „Legal Recognition – Standards Categories“. <https://www.usp.org/about/legal-recognition/standard-categories>
- [13] USP, „<1223> VALIDATION OF ALTERNATIVE MICROBIOLOGICAL METHODS“, USP43-NF38, 2020.
- [14] PDA, „About PDA“, 2021. <https://www.pda.org/about-pda>
- [15] PDA, „Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods“, Technical Report No. 33, May/June 2000.
- [16] Rieth M. „Pharmazeutische Mikrobiologie“, Darmstadt: Wiley-VCH, 2017.
- [17] Sandle T. „Characterizing the Microbiota of a Pharmaceutical Water System-A Metadata Study“, SOJ Microbiology & Infectious Diseases, 18 July 2015
- [18] European Pharmacopoeia Commission, „2.6.12. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NON-STERILE PRODUCTS: MICROBIAL ENUMERATION TESTS“, in European Pharmacopoeia 10.0, 01/2021:20612.
- [19] BWT Aqua AG. „Application of flow cytometry for microbiological monitoring of pharmaceutical grade water“. European Pharmaceutical Review, Volume 25, Issue 03, 24 June 2020
- [20] Hjorth J, Annel PA, Noverini P, Hooper S. „GMP Implementation of ONLINE WATER BIOBURDEN ANALYZERS“, in Pharmaceutical Engineering, Jan.-Feb. 2021

Die Links wurden zuletzt abgerufen am 09.08.2023.

#### Korrespondenz:

Dr. Jürgen Illerhaus  
BWT Aqua AG  
Hauptstr. 192  
4147 Aesch/BL (Schweiz)  
E-Mail: Juergen.Illerhaus@bwt-aqua.ch