
■ Biotechnologie

Biopharmazeutika legen zu

■ Laborgerätesoftware

Allgemeiner Datenintegritäts-Standard

■ Pharmawasser

- Durchflusszytometrie zur Überwachung der mikrobiellen Qualität
- Mobile Wasseraufbereitung im GMP-Bereich

■ Analytik

- "State of the Art"-Sterilprüfung
- How stable are new biologics?

Einsatz der Durchflusszytometrie als Schnellmethode zur Überwachung der mikrobiologischen Qualität von Reinstwasser

Felix Thiele

BWT AQUA AG, Aesch, Schweiz

Um die Sicherheit der Patienten und die Qualität pharmazeutischer Produkte zu gewährleisten, sind in den Pharmakopöen eindeutige Qualitätsparameter für das verwendete Wasser definiert. Der Parameter, welcher der Beurteilung der mikrobiologischen Qualität des Wassers dient, ist die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE).

Während die Grenzwerte anderer geforderter Parameter wie Leitfähigkeit, Total Organic Carbon (TOC) oder Nitrat durch Aufbereitungsanlagen auf dem Stand der Technik sicher eingehalten werden, besteht bei der Mikrobiologie das Risiko der Biofilmbildung und der Kontamination des Systems. Der Überwachung der mikrobiologischen Qualität kommt daher besondere Bedeutung zu.

Für die Überwachung der mikrobiologischen Qualität gibt es verschiedene Verfahren mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen. Die konventionelle Methode ist die Keimzahlbestimmung auf festen Nährmedien. In Laboren kommen allerdings schon seit längerem alternative mikrobiologische Methoden anstelle der etablierten Keimzahlbestimmung zum Einsatz. Diese Entwicklung zeichnet sich nun auch zunehmend für industrielle Applikationen im Reinstwasserbereich ab.

1. Keimzahlbestimmung zum Nachweis der mikrobiologischen Qualität

Keimzahlbestimmungen auf der Basis eines Agarmediums werden bereits seit mehr als 130 Jahren eingesetzt, um die mikrobiologische Qualität des

Wassers zu bestimmen [1]. Dafür wird ein definiertes Probenvolumen auf ein spezielles, festes Nährmedium aufgebracht und für einige Tage bei konstanter Temperatur inkubiert. Die gebildeten Kolonien werden ausgezählt und deren Anzahl als koloniebildende Einheiten (KBE) angegeben.

Auch wenn die Nährmedien für die Bestimmung der KBE als unselektiv bezeichnet werden, wird doch nur ein Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Bakterien mit dieser Methode kultiviert [2]. Durch das verwendete Nährmedium, die Inkubationszeit und -temperatur werden die kultivierbaren Bakterien vorselektiert. Zum Beispiel unterstützt die dem menschlichen Körper angepasste Inkubationstemperatur das Wachstum von für den Menschen pathogenen Bakterien, während niedrigere Temperaturen das Wachstum von im Wasser lebenden Bakterien unterstützen [1]. Außerdem wird infrage gestellt, ob oder wie sehr die Anzahl der KBE überhaupt mit dem potenziellen Gesundheitsrisiko für den Menschen in Beziehung steht [2]. Ein weiteres Problem ist, dass die Anzahl der KBE nicht exakt der Anzahl der kultivierten Bakterien entspricht, da auch mehrere Bakterien zu einer Kolonie zusammenwachsen können.

Allgemein gesprochen handelt es sich bei den auf festen Nährmedien kultivierten Bakterien um heterotrophe Mikroorganismen, da sie auf organischen Kohlenstoff als Energiequelle angewiesen sind [2]. Die im Reinstwasser zu findenden Bak-

terien werden allgemein als oligotroph bezeichnet, da sie an nährstoffarme Umgebungen angepasst sind [3].

2. Bestimmung der mikrobiologischen Qualität von Reinstwasser

Für die Freigabe von pharmazeutischen Produkten ist die mikrobiologische Qualitätskontrolle der Hilfsstoffe, z. B. Reinstwasser, durch die Pharmakopöen vorgeschrieben. Die allgemein anerkannte Arzneibuchmethode zur Bestimmung von Bakterien im Reinstwasser ist die Keimzahlbestimmung auf festen Nährmedien. Für Wasser für Injektionszwecke (WFI) und Highly Purified Water (HPW) wird ein sog. R2A-Agar als Nährmedium vorgeschrieben [4, 5], welcher 1980 durch die amerikanischen Bakteriologen Reasoner und Geldreich entwickelt wurde, um ein spezifischeres Nährmedium für den Trinkwasserbereich zu schaffen [6].

Für die Bestimmung der KBE im WFI werden mindestens 200 ml einer Probe durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Der Membranfilter wird anschließend auf eine R2A-Agarplatte aufgelegt und die Platte für mindestens 5 Tage bei 30–35 °C inkubiert [4]. Nach 5 Tagen folgt eine Auszählung der KBE. Obwohl die Pharmakopöen die Methode der Keimzahlbestimmung auf festen Nährmedien mit vorhergehender Membranfiltration vorschreiben, weist diese einige grundlegende Nachteile auf:

- Die Ergebnisse der Beprobung sind frühestens nach 5 Tagen verfügbar. Dadurch kommt es zur verspäteten Erkennung von Kontaminationen der Reinstwasseranlage, was die Reaktionszeit stark verlängert. Dementsprechend müssen pharmazeutische Produkte häufig unter Annahme der Einhaltung der mikrobiologischen Grenzwerte produziert werden. Die tatsächliche mikrobiologische

Freigabe erfolgt erst 5 Tage nach der Produktion.

- Die fachgemäße Durchführung erfordert viele manuelle Arbeitsschritte. Dies ist nicht nur kosten- und zeitintensiv, sondern birgt auch die Gefahr der Kontamination der Probe. Die Kosten für Nachforschungen von einer einzigen falsch-positiven Bestimmung an einem WFI point-of-use (POU) werden auf 5 000–18 000 US-Dollar geschätzt [7].
- Es werden nicht alle vorhandenen Bakterien gezählt. Sowohl die Europäische Pharmakopöe (Ph. Eur.) als auch die United States Pharmacopeia (USP) definieren die Keimzahlbestimmung als eine Schätzung der tatsächlich in der Probe vorhandenen Bakterien [8, 9]. Wie vorgängig erwähnt, wird jede KBE als ein Bakterium interpretiert. Häufig lösen sich Bakterien jedoch in Form von Biofilmbriksen von Membranen oder Rohrleitungen ab, wodurch auch mehrere Bakterien in nur einer KBE wachsen können. Zusätzlich können Bakterien, die durch extreme Umweltbedingungen „gestresst“ werden, in eine Art Ruhezustand wechseln. Dieser Zustand wird von Experten „viable but non-culturable“ (VBNC, auf Deutsch „lebensfähig aber nicht kultivierbar“) genannt. VBNC sind also durchaus lebende Bakterien, lassen sich aber nicht auf einem Nährmedium innerhalb von 5 Tagen kultivieren. Sie sind also weiterhin im Reinstwasser vorhanden, können jedoch nicht mit der herkömmlichen Keimzahlbestimmung erfasst werden. Es wurde gezeigt, dass selbst für den Menschen pathogene Bakterien sich in diesen Zustand versetzen, indem sie ihren Stoffwechsel an die Umgebungsbedingungen anpassen [10].
- Aufgrund der Methodik ist eine Automatisierung schwierig. Es existieren zwar Analysegeräte zur Auszählung der inkubierten Nährmedien, die Probenahme und -aufbereitung ist allerdings weiter-

hin manuell durch Fachpersonal durchzuführen.

- Einzelproben schaffen wenig Überblick über mikrobiologische Trends in der Reinstwasseranlage. Eine lückenlose Überwachung der Wasserqualität ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Die gewählten Intervalle für die Heißwassersanitisierung membranbasierter Reinstwassererzeugeranlagen basieren für gewöhnlich auf den Erkenntnissen der initialen Validierungsphase. Einmal festgelegte Sanisierungsintervalle werden häufig nicht reevaluiert.

3. Alternative mikrobiologische Methoden

„Alternative mikrobiologische Methoden“ sind Verfahren zur Bestimmung der mikrobiologischen Qualität, die nicht dem herkömmlichen Keimzahlbestimmungsverfahren entsprechen. Es existieren bereits viele alternative Verfahren. Bislang wurden diese mehrheitlich in der Forschung und nur selten im Reinstwasserbereich eingesetzt, obwohl zahlreiche offizielle Dokumente auf den möglichen Einsatz dieser Methoden verweisen.

Durch die Anpassung der Monographie 0169 der Ph. Eur. im April 2017 wurde die Relevanz der alternativen mikrobiologischen Methoden weiter erhöht. Durch die Änderung der Monographie darf WFI nun auch mit nicht-destillativen Verfahren produziert werden [4]. Das größte Risikopotenzial membranbasierter Produktionsanlagen ist das Biofouling der Membranen. In der Monographie wird darauf hingewiesen, dass entsprechende Maßnahmen durchgeführt werden müssen, um zu gewährleisten, dass die Zahl der KBE angemessen kontrolliert und überwacht wird [4]. Eine kontinuierliche Messung der Bakterien ist in Anbetracht der pharmazeutischen Relevanz des WFI sicherlich als „angemessen“ einzuschätzen.

Die European Medicines Agency (EMA) verlangt in ihrem Q&A-Doku-



Abbildung 1: Der BWT AQU@Sense MB ist ein automatisiertes Durchflusszytometer für die kontinuierliche Messung von Bakterien im Reinstwasser (Quelle aller Abbildungen: der Autor/BWT).

ment zur membranbasierten WFI-Erzeugung den Einsatz einer zuverlässigen Kontrollstrategie. Da der Nachweis von Kontaminationen des Wassers wegen losgerissener Biofilme mit Einzelmessungen schwierig ist, werden kontinuierliche Überwachungssysteme empfohlen. Die Trendanalyse wird als kritischer Faktor angesehen. Dementsprechend sollten alternative mikrobiologische Methoden in Erwägung gezogen werden, um die frühzeitige Erkennung von Kontaminationen oder Biofouling gewährleisten zu können und um sicherzustellen, dass zeitnah reagiert werden kann [11].

Alternative mikrobiologische Methoden werden aufgrund ihrer Eigenschaft, Ergebnisse schneller als die etablierte Methode zu liefern, auch als rapid microbiological methods (RMM, auf Deutsch mikrobiologische Schnellmethoden) bezeichnet. Verglichen mit der Arzneibuchmethode weisen sie zahlreiche Vorteile auf:

- Die Ergebnisse der RMM sind, abhängig von der Methode bzw. der eingesetzten Technologie, in Sekunden bis wenigen Stunden verfügbar. Damit sind die RMM deut-

lich schneller als der etablierte Test und im Fall von Kontaminationen kann zeitnah reagiert werden.

- Weniger manuelle Arbeitsschritte werden benötigt. Dadurch reduziert sich das Potenzial für menschliche Fehler, z. B. durch Kontamination der Probe oder durch falsches Auszählen der KBE. Die Chance für falsch-positive Ergebnisse ist geringer und eventuell benötigte Messwiederholungen können kurzfristig durchgeführt werden.
- Mit RMM werden weitaus mehr der im Wasser befindlichen Bakterien detektiert. Abhängig von dem angewandten Analyseverfahren können auch VBNC-Bakterien detektiert werden, da viele Verfahren die Bakterien direkt zählen, anstatt sie zuerst zu kultivieren. Da-

durch erklärt sich u. a. auch, warum die Messwerte der alternativen Methoden häufig über denen der Arzneibuchmethode liegen. In der USP steht, dass die Ergebnisse der Arzneibuchmethode nur 0,1–1 % der vorhandenen Bakterien widerspiegeln, wenn man die Ergebnisse mit denen der Durchflusszytometrie vergleicht [9].

- Abhängig von der Methode sind automatisierte Verfahren verfügbar und ein kontinuierliches Monitoring ist möglich.
- Durch kontinuierliche Verfahren, kürzere Ansprechzeiten und höhere Genauigkeit lassen sich ein erhöhtes Prozessverständnis und Nachweise von Sanitisierungseffekten generieren. Dadurch können z. B. Sanitisierungsintervalle reevaluiert und Kosten eingespart werden.

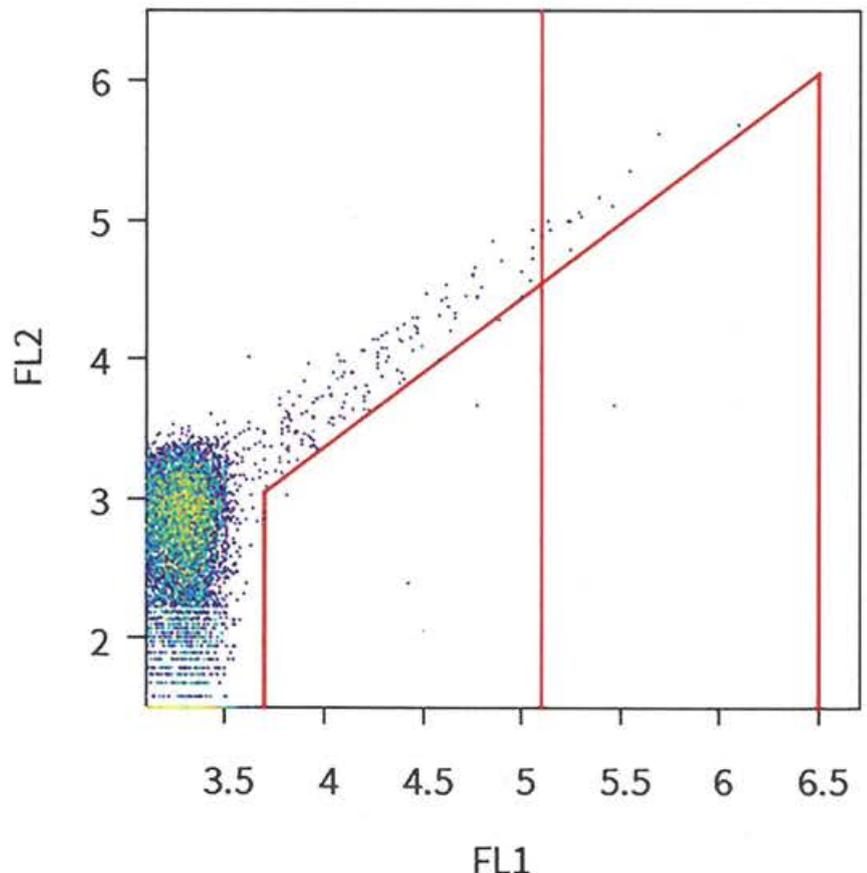


Abbildung 2: Messergebnis eines mit Durchflusszytometrie analysierten Reinstwassers. Der rot markierte Bereich ist das „Gate“ innerhalb dessen die Bakterien gezählt werden. Die vertikale Linie unterscheidet zwischen großen und kleinen bakteriellen Zellen. FL1 und FL2 entsprechen den beiden Fluoreszenzkanälen. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein relativer Wert ohne Einheit.

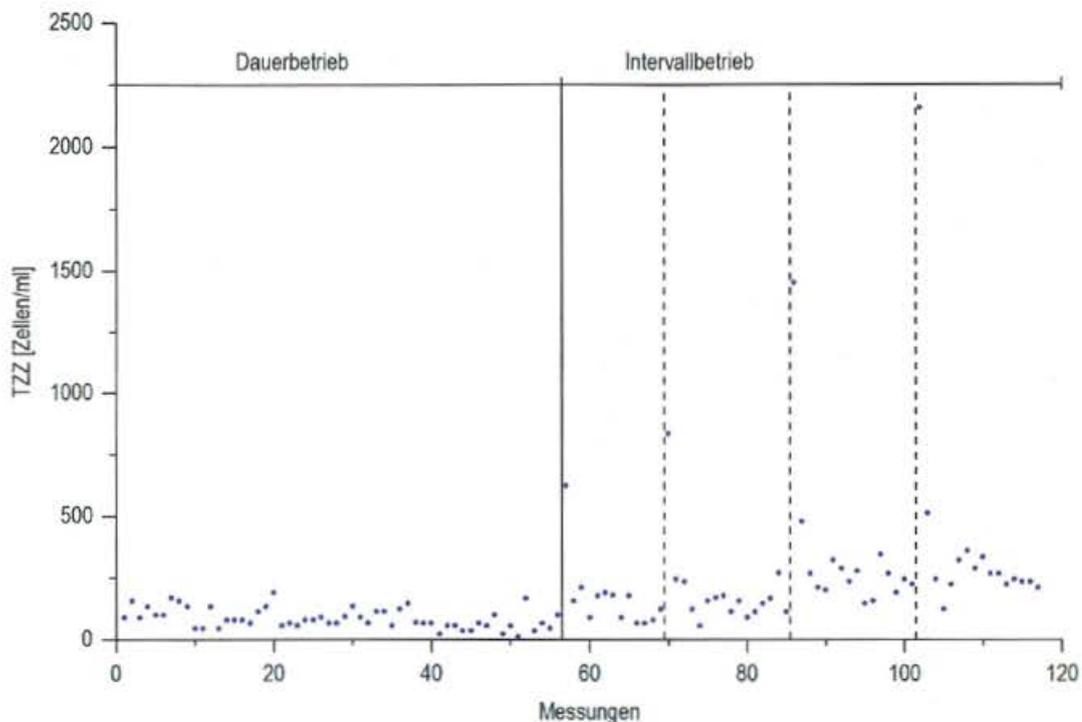


Abbildung 3: Nachweis des Biofoulings während des Intervallbetriebs ($N = 117$). Die Anlage wurde bis zum 56. Messpunkt im Dauerbetrieb gefahren und dann über Nacht gestoppt. Ab dem 57. Messpunkt wurde die Anlage im Intervallbetrieb gefahren. Vertikale Linien markieren jeweils das Abschalten der Anlage über Nacht und das erneute Anfahren am folgenden Morgen.

4. Durchflusszytometrie als alternative Methode

Es ist zu erwarten, dass die Bedeutung der RMM für die mikrobiologische Qualitätskontrolle von Reinstwasser zunimmt. Aus diesem Grund wurden bei BWT verschiedene RMM getestet. Zusätzlich wurden mehrere Forschungsprojekte zu RMM und zur membranbasierten Produktion von WFI durchgeführt. Dabei hat sich die Durchflusszytometrie als vielversprechendes Verfahren herausgestellt. Als Ergebnis hat BWT eine eigene Lösung zur kontinuierlichen Bestimmung der Bakterien im Reinstwasser lanciert (Abb. 1).

In Laboratorien für aquatische Mikrobiologie und im Trinkwasserbereich setzt sich die Durchflusszytometrie seit Jahren verstärkt durch und die Relevanz der Ergebnisse wurde vielfach wissenschaftlich belegt [12–14]. Das Schweizerische Lebensmittelhandbuch referenziert die Durchflusszytometrie bereits seit 2012 als anerkannte Methode zur Bestimmung der Bakterien im Trinkwasser [15].

Die automatisierte Durchflusszytometrie ist ein Batch-Verfahren, in dem folgende Schritte nacheinander durchgeführt werden:

- Die Reinstwasserprobe wird aus dem kontinuierlich durchströmten Probenehmer entnommen.
- Die Probe wird mit einem DNA-spezifischen Farbstoff gemischt.
- Während einer kurzen Einwirkzeit dringt der Farbstoff in die DNA der Zelle ein.
- Die angefärbte Probe wird durch eine Kapillare geführt.
- Ein Laser regt den DNA-gebundenen Farbstoff zum Fluoreszieren an.
- Die Intensität der Fluoreszenz wird für jedes organische und anorganische Partikel detektiert. Die Intensität der Fluoreszenz steigt mit der Menge des gebundenen Farbstoffs.
 - Bakterien fluoreszieren umso stärker, je größer sie sind bzw. desto mehr DNA sie aufweisen.
 - Anorganische Partikel emittieren keine Fluoreszenz in ausreichender Intensität, da an sie kein Farbstoff gebunden ist.

- Auswertung der Ergebnisse anhand der spezifischen Fluoreszenzcharakteristika: Der numerische Wert des Ergebnisses wird als Totalzellzahl (TZZ) bzw. Zellen/ml angegeben.
- Ein Reinigungsschritt stellt sicher, dass das Analysegerät frei von Biofouling bleibt und nur die tatsächlich im Reinstwasser vorhandenen Bakterien detektiert werden.

Über Referenzlösungen mit fluoreszierenden Mikrokugeln werden die „Gates“, also die Grenzen, definiert, in denen die Bakterien in dem in Abb. 2 dargestellten Plot zu finden sind (rot markierter Bereich). Die Gates dienen dazu, die Signale der Bakterien von denen des Hintergrunds und des Grundrauschens des Detektors zu trennen.

5. Validierung alternativer mikrobiologischer Methoden

Die größte Herausforderung zur Etablierung der RMM im Markt ist sicherlich die Validierung der Analysegeräte durch die Anwenderseite.

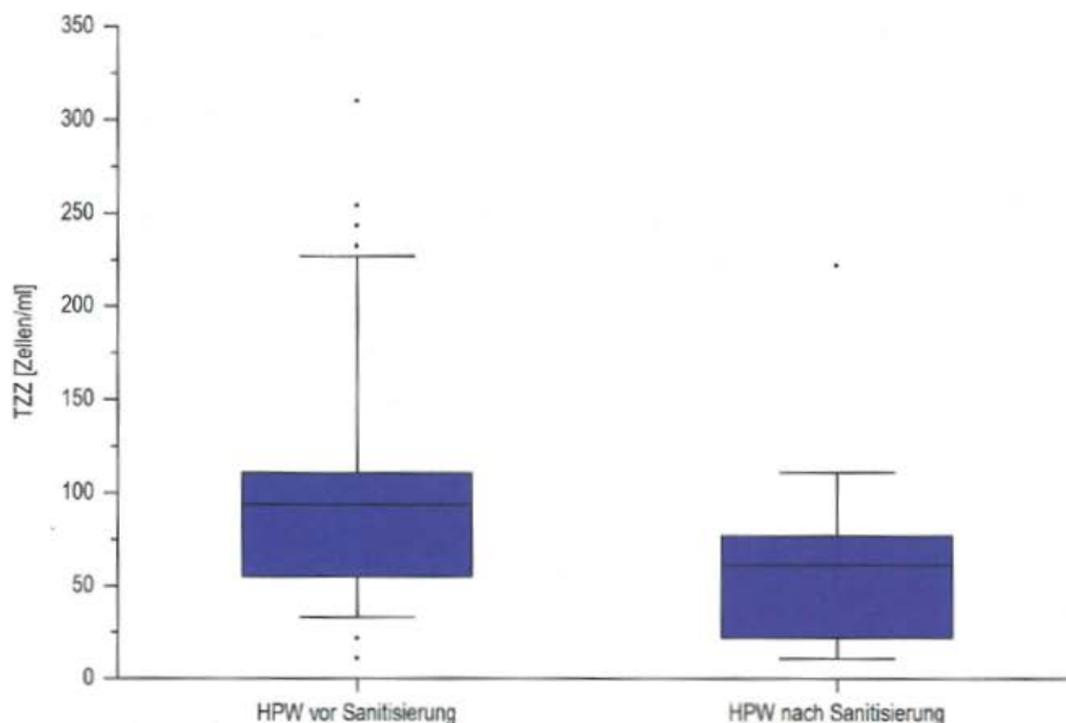


Abbildung 4: Vergleich TZZ vor und nach Sanitisierung ($N_{\text{vor Sanitisierung}} = 100$, $N_{\text{nach Sanitisierung}} = 23$). Die Kästen entsprechen den Werten zwischen dem oberen und unteren Quartil (mittlere 50 % der Werte), die horizontale Linie dem Mittelwert. Der Bereich zwischen den „Whiskers“ entspricht den mittleren 90 % der Werte.

Derzeit ist die Keimzahlbestimmung auf festen Nährmedien weiterhin die Arzneibuchmethode und die Grenzwerte sind in „KBE/ml“ bzw. „KBE/100 ml“ definiert. Demgegenüber stehen die Ergebnisse der RMM, die i. d. R. von den Ergebnissen der Standardtests abweichen. Sowohl Kapitel 5.1.6 der Ph. Eur. als auch Kapitel <1223> der USP und das Dokument TR-33 der Parental Drug Association (PDA) beschreiben die Möglichkeiten der Validierung der alternativen Methoden [8, 9, 16].

Wie im Kapitel 5.1.6 der Ph. Eur. beschrieben, lässt sich eine RMM mittels eines Vergleichs mit dem etablierten Test anhand verschiedener Parameter validieren. Bisherige Tests bei BWT haben gezeigt, dass die Durchflusszytometrie ca. 10- bis 100-mal mehr Bakterien detektiert als mit der Standardmethode an KBE bestimmt wurden [17, 18].¹⁾ Diese

Aussage steht im Einklang mit der aktuellen Literatur über den Einsatz der Durchflusszytometrie im Trinkwasserbereich, wobei hier z. T. noch höhere Faktoren angegeben werden [12, 13]. Auch die USP bestätigt diesen Umstand mit der Aussage, dass der etablierte Test beim Vergleich der Ergebnisse mit denen der Durchflusszytometrie nur 0,1–1 % der vorhandenen Bakterien widerspiegelt [9]. Eine direkte Korrelation der Ergebnisse der RMM und der Standardtests konnte bisher nicht gezeigt werden.

Auch wenn dies mehrheitlich als Problem angesehen wird, verweisen sowohl die USP als auch die Ph. Eur. auf die Möglichkeit dieses Falls. Die beschriebene „Gleichwertigkeit“ der Ergebnisse kann statt auf die numerischen Werte auch auf die Qualität der Entscheidungsgrundlage bezogen werden. Hierbei muss die alternative Methode eine mindestens gleichwertige Beurteilung zulassen wie die Arzneibuchmethode [8].

In der Praxis ist es vorstellbar, dass während der Qualifizierungsphase eines Reinstwassersystems, in welcher täglich oder wöchentlich

die KBE im Labor bestimmt werden, parallel mit der zu validierenden alternativen mikrobiologischen Methode gemessen wird. Selbst wenn es keine direkte Korrelation gibt, können so Grenzwerte definiert werden. Werden etwa im Reinstwasser regelmäßig 2 KBE/100 ml bestimmt und die Ergebnisse der alternativen Methode liegen konstant unter 200 Zellen/ml, könnte ein Grenzwert von 250 Zellen/ml definiert werden. Im Falle einer Überschreitung kann eine Untersuchung mit der herkömmlichen Methode durch die mikrobiologischen Experten durchgeführt werden. Solange die Werte der alternativen Methode unter diesem Grenzwert liegen, werden lediglich die zur Freigabe benötigten Proben anhand der etablierten Methode bestimmt.

6. Anwendungsbeispiele des AQU@Sense MB

Wie von der Online Water Bioburden Analyzer Workgroup erwähnt, sollen die alternativen Methoden dazu dienen, Sanitisierungseffekte

¹⁾ Die Ergebnisse wurden z. T. in dem bereits erschienenen Beitrag „Membranbasierte WFI-Erzeugung“ von A. Minzenmay präsentiert (Pharm. Ind. 2018;80(1):115–126).

■ **Tabelle 1**

Vor- und Nachteile von Standardmethode und RMM im Vergleich.

Faktor	Plattentests	RMM
Analysegeschwindigkeit	≥ 5 Tage	Sekunden bis Stunden
Reaktionszeit bei Kontamination	≥ 5 Tage	Sekunden bis Stunden
Kosten	Einzelne Keimzahlbestimmungen auf festem Nährmedium 65-110 US-Dollar [7]	Hohe Investitionskosten, aber geringere Kosten pro Probe
Fehlerpotenzial	Hohes Fehlerpotential durch manuelle Arbeitsschritte	Geringes Fehlerpotential durch Automatisierung
Detektierte Bakterien	Es wird geschätzt, dass nur 0,1-1 % der in einer Probe vorhandenen Bakterien tatsächlich auf einem Nährboden wachsen [9]. Lebensfähige, aber nicht kultivierbare Bakterien können mit Plattentests nicht gezählt werden.	Lebensfähige, aber nicht kultivierbare Bakterien können auch detektiert werden.
Quantitative oder qualitative Messung	Der Einsatz von Universalnährmedien ermöglicht eine quantitative Bestimmung eines möglichst weit gefassten Spektrums von Mikroorganismen. Im Gegensatz dazu erlauben Selektivnährmedien den Nachweis von ausgewählten Mikroorganismen(gruppen).	Bisherige automatisierte Verfahren messen die Bakterien lediglich quantitativ.
Kontinuierliche/Online-Messungen	Es sind keine kontinuierlichen Messverfahren verfügbar.	Es sind kontinuierliche Messverfahren verfügbar.
Prozesskontrolle und -verständnis	Die Prozesskontrolle und das Verständnis werden nur geringfügig beeinflusst (siehe alle vorherigen Punkte).	Ein kontinuierliches Monitoring generiert ein hohes Maß an Prozesskontrolle und -verständnis. Sanisierungsintervalle und -temperaturen können unaufwendig reevaluiert werden und darüber weitere Kosten eingespart werden.
Akzeptanz für Produktfreigabe	Arzneibuchmethode für die Freigabe von Produkten	Für die Freigabe von Produkten nur nach einer Validierung zugelassen
Grenzwerte	Grenzwerte sind in den Pharmakopöen definiert.	Grenzwerte müssen vom Anwender neu definiert werden.

und mikrobiologische Abweichungen zu erkennen [7]. Am Beispiel einer membranbasierten Reinstwasseranlage wurde gezeigt, dass der Wechsel von Dauerbetrieb zu Intervallbetrieb zu einem erhöhten Biofouling innerhalb der Anlage führt und dies mit einem kontinuierlichen Durchflusszytometer nachweisbar ist (Abb. 3).

Zu Beginn wurde die Anlage für 28 Stunden kontinuierlich betrieben und danach über Nacht abgestellt. Die mikrobiologische Qualität des Permeats der ersten Stufe wurde mit einem AQU@Sense MB kontinuierlich überwacht. Die erhöhten Ausschläge sind jeweils die erste Messung des Tages, nachdem die Anlage über Nacht abgestellt war. Danach stabilisieren sich die Werte und es ist zu erkennen, dass die Basislinie über mehrere Tage kontinuierlich ansteigt. Dementsprechend könnte eine Sanitisierung initiiert werden, sobald die Zellen/ml einen in der

Qualifizierung definierten Grenzwert überschreiten.

Abbildung 4 zeigt den Vergleich der TZZ einer HPW-Anlage vor und nach einer chemischen Sanitisierung. Sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung nehmen nach der Sanitisierung ab. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass sich die Anzahl der Ausreißer reduziert hat.

7. Zusammenfassung

Die Implementierung der RMM wird allgemein durch die Pharmakopöen und durch weitere Institutionen wie die PDA und EMA unterstützt. Leitfäden zum Ablauf der Validierung sind vorhanden. Anhand von Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die Durchflusszytometrie für die kontinuierliche Messung von Bakterien im Reinstwasser eignet. Sowohl Biofouling als auch der Effekt der Sanitisierung können mit

dieser Methode nachgewiesen werden. Da die Arzneibuchmethode weiterhin die Keimzahlbestimmung auf festen Nährmedien ist, müssen RMM zur Freigabe von Produkten vorgängig anhand der Pharmakopöen validiert werden. Allerdings können auch ohne eine Validierung viele Vorteile der RMM (Tab. 1) genutzt werden und die Probenanzahl, die mit der etablierten Methode ausgewertet werden muss, kann reduziert werden. Frei werdende Ressourcen können z. B. darauf verwendet werden, anhand von Keimzahlbestimmungen auf spezifischen Nährmedien die Mikrobiologie des Reinstwassers besser zu erforschen.

■ LITERATUR

- [1] M. E. J. Bartram, J. Cotruvo, A. G. C. Fricker. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety, 2003.
- [2] M. J. Allen, S. C. Edberg. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water?, 2004.

- [3] L. A. Kulakov, M. B. Mcalister, K. L. Ogden, M. J. Larkin, J. F. O. Hanlon. Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, Jg. 68, Nr. 4, pp. 1548–1555, 2002.
- [4] European Pharmacopoeia 9.1, Monograph 0169 Water for injections, Nr. 1, 2017, pp. 4215–4217.
- [5] European Pharmacopoeia, WATER, HIGHLY PURIFIED Aqua valde purificata, Jg. i, Nr. 1, pp. 4342–4344, 2009.
- [6] D. J. Reasoner, E. E. Geldreich. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.*, Jg. 49, Nr. 1, pp. 1–7, 1985.
- [7] A. Cundell, et al. Novel Concept for Online Water Bioburden Analysis: Key Considerations, Applications, and Business Benefits for Microbiological Risk Reduction, *Am. Pharm. Rev.*, 2013.
- [8] Ph. Eur., 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality. *Eur. Pharmacopoeia*, Jg. 9.2, 2017.
- [9] United States Pharmacopoeia. Second Supplement to USP 38–NF 33 <1223> Alternative Microbiological Methods, 2015.
- [10] T. Ramamurthy, A. Ghosh, G. P. Pazhani, S. Shinoda. Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front. Public Heal.*, Jg. 2, Nr. July, pp. 1–9, 2014.
- [11] EMA European Medicines Agency. Questions and answers on production of water for injections by nondistillation methods reverse osmosis and biofilms and control strategies. *Jg. 44*, Nr. August, pp. 1–13, 2017.
- [12] F. Hammes, M. Berney, Y. Wang, M. Vital, O. Köster, T. Egli. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.*, Jg. 42, Nr. 1–2, pp. 269–277, 2008.
- [13] S. Köttsch, S. Alisch, T. Egli. Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben. Bundesamt für Gesundh. BAG, p. 47, 2012.
- [14] M. D. Besmer, et al. Laboratory-scale simulation and real-time tracking of a microbial contamination event and subsequent shock-chlorination in drinking water. *Front. Microbiol.*, Jg. 8, Nr. OCT, pp. 1–11, 2017.
- [15] Bundeskanzlei. Der Bundesrat – Das Portal der Schweizer Regierung. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.admin.ch/gov/de/start/dokumentation/medienmitteilungen.msg-id-47549.html>
- [16] J. Albright. An Overview on PDA Technical Report No. 33, 2014.
- [17] F. F. Thiele. Evaluation of Antiscalant Suitability for the Production of Cold WFI. University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland, 2017.
- [18] A. Minzenmay. Membranbasierte WFI-Erzeugung. *Pharm. Ind.*, Jg. 80, Nr. 1, pp. 115–126, 2018.

Der Link wurde zuletzt am 15. Okt. 2018 abgerufen.

Korrespondenz:

Felix Thiele
BWT AQUA AG
Hauptstr. 192
4147 Aesch (Schweiz)
e-mail: Felix.Thiele@bwt-aqua.ch