

Michael Rieth

Pharmazeutische Mikrobiologie

Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene
Zweite, aktualisierte und ergänzte Auflage



Michael Rieth

**Pharmazeutische
Mikrobiologie**

Michael Rieth

Pharmazeutische Mikrobiologie

Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene

2., aktualisierte und ergänzte Auflage

WILEY-VCH
Verlag GmbH & Co. KGaA

Autor**Michael Rieth**

Merck KGaA
LS-QRB Biological Materials
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Deutschland

Titelbild

Veronika Emendörfer/VERO
www.veronika-emendoerfer.de

2. Auflage 2017

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2017 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

Umschlaggestaltung Adam Design, Weinheim, Deutschland

Satz le-tex publishing services GmbH, Leipzig, Deutschland

Print ISBN 978-3-527-34335-5

ePDF ISBN 978-3-527-81052-9

ePub ISBN 978-3-527-81050-5

Mobi ISBN 978-3-527-81051-2

oBook ISBN 978-3-527-81049-9

Gedruckt auf säurefreiem Papier.

„Qualität ist kein Zufall; sie ist immer das Ergebnis angestrengten Denkens.“

John Ruskin (1819–1900), englischer Philosoph und Schriftsteller

Inhaltsverzeichnis

Vorwort zur zweiten Auflage XIII

Vorwort zur ersten Auflage XV

Abkürzungen XVII

- 1 Einführung in die Mikrobiologie** 1
 - 1.1 Historisches 2
 - 1.2 Bedeutung 3
 - 1.3 Mikroorganismengruppen 4
 - 1.4 Die Bakterienzelle 11
 - 1.4.1 Bakterienmorphologie 12
 - 1.4.2 Bakterienphysiologie 13
 - 1.5 Taxonomie der Mikroorganismen 18
 - 1.5.1 Klassifikation 18
 - 1.5.2 Nomenklatur 23
 - 1.6 Medizinische Mikrobiologie 23
 - 1.6.1 Infektionsrouten 23
 - Literatur 27

- 2 Rahmenbedingungen für den Betrieb mikrobiologischer Laboratorien** 31
 - 2.1 Gesetze und technische Regelwerke 31
 - 2.2 Medizinische Betreuung der Mitarbeiter 36
 - 2.3 Betriebsbeschreibung für mikrobiologische Laboratorien 39
 - 2.4 Einrichtung mikrobiologischer Laboratorien 41
 - 2.4.1 Benötigte Geräte/Ausrüstung 41
 - 2.5 Nährmedien 43
 - 2.5.1 Flüssige Nährmedien (Bouillons) 43
 - 2.5.2 Feste Nährböden 44
 - 2.5.3 Selektive Nährmedien 47
 - 2.5.4 Nährmedien mit chromogenen Substraten 47
 - 2.6 Rezepturen 52

- 2.6.1 Eigene Herstellung 78
- 2.6.2 Einkauf 78
- Literatur 79

- 3 Kalibrierung und Qualifizierung der Geräte 81**
- 3.1 Waage 84
- 3.2 pH-Meter 85
- 3.3 Kolbenhubpipetten 85
- 3.4 Stoppuhr 85
- 3.5 Geräte zur Erreichung bestimmter Temperaturen 86
- 3.5.1 Thermometer 86
- 3.5.2 Brutschrank 87
- 3.5.3 KÜhlschrank/KÜhltruhe 89
- 3.5.4 HeiÙluftsterilisator 89
- 3.5.5 Autoklav 90
- 3.6 Clean Bench 91
- 3.7 Air Sampler 92
- 3.8 Partikelzähler 93
- 3.9 Messgerät zur Bestimmung der Wasseraktivität 96
- 3.10 Fotometer/Reader 97
- 3.11 Tube Reader für Endotoxinbestimmungen 97
- 3.12 Fluoreszenzreader für Endotoxinbestimmungen 99
- Literatur 99

- 4 Stammhaltung 101**
- 4.1 Bezug 101
- 4.2 Versand 105
- 4.3 Lagerung 106
- 4.4 Kultivierung 106
- Literatur 108

- 5 Betriebshygiene 109**
- 5.1 Hygiene 109
- 5.1.1 Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV) 110
- 5.1.2 Was ist das Ziel der Betriebshygiene? 111
- 5.1.3 Personalhygiene 111
- 5.1.4 Aufnahme eines Hygienekatasters 111
- 5.2 Mikrobiologische Grundlagen zur Hygiene 112
- 5.2.1 Kontaminationsquellen während der Herstellung 113
- 5.2.2 Einflussfaktoren der mikrobiellen Reinheit 115
- 5.3 HygienemaÙnahmen 115
- 5.4 Sterilisation, Desinfektion und aseptische Herstellung 127
- 5.4.1 Sterilisation 127
- 5.4.2 Desinfektion 128
- 5.4.3 Asepsis 134

- 5.4.4 Entwesung 135
- 5.4.5 Pasteurisierung 135
- 5.4.6 Konservierung 135
- 5.5 Hygieneplan für mikrobiologische Laboratorien 135
- 5.6 Schädlingsbekämpfung (*Pest Control*) 138
- 5.7 Hygienebeauftragte 141
- 5.8 Durchführung von Hygieneschulungen 141
- Literatur 145

- 6 Umgebungsmonitoring 147**
- 6.1 Methoden 147
- 6.1.1 Prüfung der Raumluft 148
- 6.1.2 Prüfung von Oberflächen 149
- 6.1.3 Prüfung der Mitarbeiter 150
- 6.2 Mikrobiologisches Monitoring im Sterilitätstest-Isolator 152
- 6.2.1 Beispiel für einen Isolator 153
- 6.3 Physikalisches Monitoring in der Sterilproduktion 156
- 6.4 Physikalischer Betrieb 159
- 6.5 Auswertung der Mikroorganismen 161
- 6.6 Register der Mikroorganismen 162
- 6.6.1 Gram(+)-Bakterien 162
- 6.6.2 Gram(-)-Bakterien 166
- 6.6.3 Partiiell säurefeste Stäbchen 171
- 6.6.4 Hefen 171
- 6.6.5 Pilze 172
- Literatur 173

- 7 Qualitätskontrolle 175**
- 7.1 Arzneibuchmethoden (*Compendial Methods*) 175
- 7.1.1 Bestimmung von TAMC/TYMC und von spezifizierten Mikroorganismen 177
- 7.1.2 Prüfung auf Sterilität 180
- 7.1.3 Nachweis von fiebererzeugenden Substanzen 182
- 7.1.4 Prüfung auf ausreichende Konservierung 205
- 7.1.5 Bestimmung von Antibiotikaaktivitäten 210
- 7.1.6 Bestimmung von Mykoplasmen 211
- 7.1.7 Prüfung auf Mykobakterien 214
- 7.1.8 Auswertung von Bioindikatoren 215
- 7.2 Nichtarzneibuchmethoden (*Non-compendial Methods*) 218
- 7.2.1 Bestimmung von Vitaminkonzentrationen 218
- 7.2.2 Bestimmung von 1,3- β -D-Glucanen 224
- 7.2.3 Prüfung von Packmitteln 226
- 7.2.4 Nachweis probiotischer Bakterien 229
- 7.2.5 Mikroskopische Zellgrößenmessung 231

7.2.6	Bioburden-Bestimmung von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln	232
7.2.7	Inokulationsversuche	233
7.3	Tests unter Verwendung von Tiermodellen	235
7.3.1	Kaninchen: Prüfung auf Pyrogene – Ph. Eur. 2.6.8	236
7.3.2	Ratte: Allen-Doisy-Test	237
7.3.3	Maus (<i>Mus musculus</i>): Prüfung auf anomale Toxizität – Ph. Eur. 2.6.9	238
7.3.4	Meerschweinchen (<i>Cavia aperea</i>): Prüfung auf Histamin – Ph. Eur. 2.6.10	238
7.4	Zellkulturmethoden	239
7.4.1	Betriebsbeschreibung eines Zellkulturlabors	240
7.4.2	Passagierung von Zellen	242
7.4.3	Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl in der Zählkammer	243
7.5	Validierung der Arzneibuchmethoden	244
7.5.1	Prüfung auf Sterilität	244
7.5.2	Prüfung auf TAMC/TYMC und spezifizierte Mikroorganismen	247
7.5.3	Prüfung auf Endotoxine	256
7.5.4	Bestimmung von Antibiotikakonzentrationen	268
	Literatur	274
8	Prozessvalidierungen	277
8.1	Nährmedienabfüllung (<i>Media Fill</i>)	278
8.1.1	<i>Media Fill Fail</i>	283
8.1.2	Neue Entwicklungen bei den <i>Media-fill</i> -Bouillons	284
8.2	Entpyrogenisierung	285
8.2.1	Entpyrogenisierungstunnel	287
8.3	Validierung der Sterilisation mit trockener Hitze	288
8.4	Validierung der Sterilisation mittels feuchter Hitze (Autoklav)	290
8.5	Validierung der Sterilfiltration	291
8.5.1	Validierung des Filtertyps	292
8.5.2	Validierung des Filtrationssystems	292
8.5.3	Integritätsprüfung von Membranfiltern	293
8.6	Container-Closure-Integrity-Test	294
8.7	Reinigungsvalidierung	298
8.7.1	Mikrobiologische Methoden in der Reinigungsvalidierung	300
	Literatur	301
9	Mikrobiologische Untersuchung von Wasser	303
9.1	Probennahme	305
9.2	Probentransport	306
9.3	Verwendung der verschiedenen Wasserqualitäten	311
9.4	Gereinigtes Wasser (<i>Aqua purificata</i> , AP)	311
9.5	Hochgereinigtes Wasser (HPW)	312

- 9.6 Wasser für Injektionszwecke (Wfi) 313
- 9.6.1 Rouging/Blacking 313
- 9.7 Wasser zum Verdünnen konzentrierter Hämodialyselösungen 314
- 9.8 Wasser zur Herstellung von Extrakten 314
- 9.9 Trinkwasser 316
- 9.10 Legionellen 318
- Literatur 321

- 10 Mikrobiologische Schnellmethoden (*Rapid Microbiological Methods*) 323**
- 10.1 Bestimmung über den ATP-Gehalt 324
- 10.2 Bestimmung über den Einbau von Fluoreszenzmarkern 327
- 10.2.1 Scan RDI™ (AES-Chemunex-bioMerieux) 327
- 10.2.2 Milliflex® Quantum (Merck) 328
- 10.3 Durchflusszytometrie 329
- Literatur 331

- 11 Automation im mikrobiologischen Labor 333**
- 11.1 Färbeautomaten 333
- 11.2 Geräte zur Zählung der Kolonien (KBE) 334
- 11.3 Nährmedienabfüllautomat 334
- 11.4 Automation des Endotoxintests 335
- Literatur 335

- 12 Qualitätssicherung 337**
- 12.1 Aufbau eines SOP-Systems 337
- 12.2 Schulungen 339
- 12.3 Audits und Inspektionen 340
- 12.3.1 Verhalten bei Audits 341
- 12.3.2 Selbstinspektionen 342
- 12.3.3 Behörden-Audits 343
- 12.3.4 Kunden-Audits 344
- 12.3.5 Lieferanten-Audits 344
- 12.3.6 Weitere Audits 344
- 12.4 Vorgehensweise bei OOS- und OOE-Ergebnissen 346
- 12.4.1 Prüfung auf Endotoxine 349
- 12.4.2 Prüfung auf TAMC und TYMC 350
- 12.4.3 Prüfung auf Sterilität 351
- 12.4.4 Prüfung auf Pyrogene 352
- Literatur 353

- 13 Identifizierung von Mikroorganismen 355**
- 13.1 Wachstumskurve 355
- 13.2 Generationszeit 356
- 13.3 Herstellung von Reinkulturen 356

13.4	Sensorische und makroskopische Merkmale	357
13.5	Mikroskopische Untersuchung	357
13.5.1	Mikroskope	357
13.5.2	Mikroskopische Präparate	360
13.6	Färbungen	361
13.6.1	Farblösungen	362
13.7	Prinzip der „bunten Reihe“	364
13.8	Immunologische Verfahren	366
13.9	PCR	367
13.10	Gaschromatografie (FAME)	368
13.11	FT-IR-Spektroskopie	368
13.12	MALDI-TOF	369
	Literatur	370
14	Reinigung, Sterilisation, Dekontamination und Entsorgung	371
14.1	Reinigung	371
14.2	Sterilisation	372
14.2.1	Trockene Hitze (Heißluftsterilisator)	372
14.2.2	Feuchte Hitze (Autoklav)	372
14.2.3	Strahlung	372
14.2.4	Gase	373
14.2.5	Kinetik der Keimtötung	373
14.2.6	Bowie-Dick-Test	374
14.2.7	Risikoanalyse für Autoklaven	374
14.3	Laborreinigung und -desinfektion	377
14.3.1	Qualifizierung einer Laborspülmaschine	379
14.3.2	Validierung	379
14.4	Entsorgung infektiösen Abfalls	380
14.5	Desinfektionsmaßnahmen bei Havarien	380
	Literatur	381
15	Prüfungen im Lohnauftrag (Outsourcing)	383
	Literatur	384
	Mikrobiologische Netzwerke	385
	Literatur	387
	Adressen	389
	Fachliteratur	397
	Glossar	409
	Stichwortverzeichnis	411

Vorwort zur zweiten Auflage

Für die zweite Auflage der „Pharmazeutischen Mikrobiologie“ werden die momentan aktuellen Themen „*low endotoxin recovery*“ und „Maskierung/Demas-
kierung“ in das Kapitel über den Endotoxintest aufgenommen. Wo immer mög-
lich, werden die Bezüge zu den neuen Ausgaben der Arzneibücher Ph. Eur. 9 und
USP 40/NF 35 hergestellt. Die Kapitel über den *media fill* und über das Wasser
sind aktualisiert, das Kapitel über den Konservierungsmittelbelastungstest ist er-
gänzt und der Bezug zur ISO-Norm hergestellt. Die Literaturverzeichnisse sind
fortgeführt, Literatur vor dem Jahre 2000 ist, sofern möglich, fortgelassen wor-
den. Ferner erhöht sich die Anzahl der Abbildungen deutlich, die Fotos werden
überwiegend in Farbe gedruckt. Viele Bilder von Bakterien (Mikroskopaufnah-
men und Abbildungen von Kolonien auf der Petrischale) hat mir Herr Dr. Armin
Quentmeier/TU Dortmund zur Verfügung gestellt; weitere Fotos stammen von
Herrn Dr. Michael Lohmeyer/Mikrobiologisches Labor Dr. Lohmeyer, Münster,
und vom Labor L + S AG, Bad Bocklet. Allen sei herzlich gedankt!

Schließlich sind die Druckfehler korrigiert. Hier danke ich auch Herrn Dr. Mar-
cel Goverde für seine Hinweise.

Das neue Titelbild gestaltet wiederum die Darmstädter Künstlerin Veronika
Emendörfer/VERO, der ich herzlich danke.

Darmstadt, im Dezember 2016

Michael Rieth

Vorwort zur ersten Auflage

In dem vorliegenden Buch werden die Aufgaben und Tätigkeiten der in den mikrobiologischen Laboren der pharmazeutischen Qualitätssicherung arbeitenden Biologielaboranten und Mikrobiologen beschrieben. Schwerpunkte sind die Methoden der Qualitätskontrollprüfungen einschließlich ihrer Validierungen, die Qualifizierungen und Kalibrierungen der dazu benötigten Geräte und Messinstrumente, das Umgebungsmonitoring in der Pharma- und Chemieproduktion sowie die Betriebshygiene. Eine derartige Zusammenfassung fehlte bisher in der deutschsprachigen Fachliteratur. Vorgestellt werden in erster Linie bakteriologische Methoden und Verfahren, jedoch werden auch Verweise auf Zellkulturmethoden und Tiermodelle gegeben. Moderne Techniken, Schlagwort „*rapid microbiological methods*“ werden ebenfalls vorgestellt. Vor allem bei Verfahren mit langen Inkubationszeiten wie beim Steriltest und der Prüfung auf Mykobakterien und Mykoplasmen werden kürzere Analysenzeiten benötigt. Die Zukunft wird zeigen, ob diese Verfahren die klassischen Kultivierungstechniken, die größtenteils auf Robert Koch und andere Bakteriologen des späten 19. Jahrhunderts zurückgehen, dauerhaft ersetzen können.

Herzlich danke ich folgenden Kolleginnen und Kollegen für die Überlassung von Fotos und Abbildungen: Daniela Grabis (Merck KGaA), Monika Lamoratta (Lanxess Deutschland GmbH, Leverkusen), Peter Hilgendorf (Daiichi Sankyo Europe GmbH, Pfaffenhofen), Matthias Nagel (Hochschule Bremerhaven), Armin Quentmeier (Universität Dortmund) und Manfred Rohde (Helmholtz-Zentrum für Infektionskrankheiten, Braunschweig). Barbara Gerten (Merck KGaA) danke ich für wertvolle Anregungen und Literaturhinweise.

Ganz besonders danke ich der Künstlerin Veronika Emendörfer/VERO für das Titelbild.

Darmstadt, im Januar 2012

Michael Rieth

Abkürzungen

AL	Aktionslimit (Aktionslevel)
AMG	Arzneimittelgesetz
AMWHV	Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung
AP	Aqua purificata
API	analytical process index
at	Atmosphäre
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
a_w	Wasseraktivität
BBS	Beauftragter für Biologische Sicherheit
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BG	Berufsgenossenschaft
BG RCI	Berufsgenossenschaft Rohstoffe und Chemische Industrie
BiostoffV	Biostoffverordnung
BLV	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BMwA	Bundesamt für wirtschaftliche Angelegenheiten (Österreich)
BP	British Pharmacopeia oder bubble point
BPLS	Brilliantgrün Phenolrot Laktose Saccharose Nährmedium
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CCIT	container closure integrity test
CCOS	Culture Collection of Switzerland
CDC	Centers for Disease Control and Protection
CDCP	Centers for Disease Control and Prevention
CFDA	5(6)-Carboxy-Fluorescein-Diacetat
CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
cft	cubic feet
CIP	Collection de l'Institut Pasteur oder cleaning in place
CLED	Cystein-Lactose-Elektrolyt-defizientes Nährmedium
cm	Zentimeter
CPM	Curriculum für pharmazeutische Mikrobiologie

CSA	Casein-Sojamehlpepton-Agar (= TSA)
CSB	Casein-Sojamehlpepton-Bouillon (= TSB)
d	Tag oder Durchmesser
Da	Dalton, Einheit der relativen molaren Masse, 1 Da = $1,66018 \times 10^{-24}$ g
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAkKS	Deutsche Akkreditierungsstelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEHS	Diethylhexylsebacinsäure
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
DGFM	Deutsche Gesellschaft für Mykologie e. V.
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V.
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
DIN	Deutsche Industrienorm
DKD	Deutscher Kalibrierdienst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP	Diocetylphthalat
DQS	Deutsche Gesellschaft zur Zertifizierung von Managementsystemen
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAM	Eidgenössisches Amt des Messwesens (Schweiz)
ECCO	European Culture Collections Organization
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Endotoxineinheiten
EEU	endotoxin equivalent unit
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELC	endotoxin limit concentration
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EtOH	Ethanol
EU	endotoxin unit (1 EU = 1 EE = 1 IU = 1 IE)
FAME	fatty acid methyl ester
FDA	Food and Drug Administration
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GenTG	Gentechnikgesetz
GLP	good laboratory practice
GMP	good manufacturing practice
GSF	Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
GVPC	Glycin-, Vancomycin-, Polymixin-, Cycloheximidagar

h	Stunde
HEPA	high efficiency particulate airfilter
HPW	highly purified water
HRP	horseraddish peroxidase
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionskrankheiten GmbH
IDA	International Depository Authority
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IPA	Isopropylalkohol
IPT	<i>In-vitro</i> -Pyrogen-Test
IQ	installation qualification
ISO	International Standardization Organization
IU	Internationale Einheiten
IVSS	Internationale Vereinigung für Soziale Sicherheit
JP	Japanische Pharmakopöe
KBE	Koloniebildende Einheiten (engl. CFU, colony forming units)
λ	Lysatempfindlichkeit Lambda
l	Liter
LAL	Limulus Amoebocyten Lysat
LER	low endotoxin recovery
LF	laminar flow
LMX	Laurylsulfat MUG X-Galaktopyranosid
LPS	Lipopolysaccharid
LRW	LAL-Reagenz-Wasser (Ph. Eur.: Wasser zur BEP) oder limulus reagent water
LTA	lipoteichoic acid (Lipoteichonsäure)
MALDI/TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight
MAT	Monozytenaktivierungstest
m-CP	modifizierter Cellobiose-Polymixin B-Agar
min	Minute
MPG	Medizinproduktegesetz
MRI	Max-Rubner-Institut
MRS	Lactobacillus-Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe
MVD	maximum valid dilution
NAT	Amplifikation von Nukleinsäuren
NCTC	National Collection of Type Cultures
NCYC	National Collection of Yeast Cultures
OB	Objekträger
OOC	out of calibration
OD	optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
ÖKD	Österreichischer Kalibrierdienst
OF	Oxidation/Fermentation
ONGP	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
OOE	out of expectation

OOL	out of limit/out of level
OOS	out of specification
OOT	out of trend
PAO	Polyalphaolefine
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Pseudoselagar oder Polymerasekettenreaktion
PDA	Parenteral Drug Association
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
Ph. Eur.	Europäische Pharmakopöe
pNA	<i>p</i> -Nitroanilin
POD	Peroxidase
PPC, PPK	Produktpositivkontrolle
PSA	persönliche Schutzausrüstung
PVP	Polyvinylpyrrolidon (= Povidon)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PTB	Physikalisch Technische Bundesanstalt
RCM	reinforced clostridial medium
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIA	Radioimmunoassay
RKI	Robert-Koch-Institut
RLU	relative light unit oder relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RRK	Reinraumklasse
s	Sekunde
SAL	sterility assurance level
SARS	severe acute respiratory syndrome
SAS	Swiss Accreditation Service
SDA	Sabouraud-Dextrose-Agar
SIM	Sulfid- und Indolbildung, Motilität
SOP	standard operation procedure (Standardarbeitsanweisung)
TAMC	total aerobic microbial count
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TierSeuchErV	Tierseuchenerregerverordnung
TMB	Tetramethylbenzidin
TRBA	Technische Regeln Biologische Arbeitsstoffe
TrinkwasserV	Trinkwasserverordnung
TSA	tryptic soybean agar
TSB	tryptic soybean bouillon
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TÜV	Technischer Überwachungsverein
TVO	(deutsche) Trinkwasserverordnung
TYMC	total yeast and mould count
UF	Ultrafiltration
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPU	Weltpostunion

USP	United States Pharmacopeia
UVV	Unfallverhütungsvorschrift
VAAM	Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie
VAH	Verband Angewandte Hygiene
VBG	Verordnung der Berufsgenossenschaft
VBNC	viable but non-culturable
VE	vollentsalzt
VfA	Verband forschender Arzneimittelhersteller e. V.
VHP	vaporized hydrogen peroxide (gasförmiges Wasserstoffperoxid)
VI	Vorbeugende Instandhaltung
VRBA	violet red bile agar
VRBD	violet red bile dextrose (Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Dextrose)
WFCC	World Federation for Culture Collections
Wfi	Wasser für Injektionszwecke
WL	Warnlimit
WHO	World Health Organization
WST	working standard
XLD	Xylose-Lysin-Deoxycholat-Agar
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
ZLG	Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten

1

Einführung in die Mikrobiologie

Zur Einführung in die Welt der Mikrobiologie und Hygiene soll das Gedicht „Überall Bakterien!“ von Alexander Moszkowski stehen, geschrieben im Berliner Dialekt und erschienen in der populären Zeitschrift „Fliegende Blätter“ in Berlin im Jahre 1887:

„Nee, ick sag schon! von Bakterien
Hat man früher nischt jewußt,
Da war's Essen noch 'ne Freude
Und det Trinken war 'ne Lust;
Aber seit man die Bazillen
Und dergleichen Zeugs erfund,
Is der Mensch total jelifiert,
Allens is jetzt unjesund.

Les' ick da, det äußerst jiftig
Heutzutag Vanillen-Eis;
Früher aß man's mit Verjnügen
Jeden Sommer massenweiß;
Heute is selbst die Vanille
Vom Bazillenherd bedroht,
Schmecken dut se auszeichnet,
Aber nachher is man dot.

Jrüne Aale, sonst det Beste
Wo der Mensch nur haben kann,
Sind nu ooch nich zu jebrauchen,
Seit der Fischbazillus dran;
Ißt se eener mit Verjnügen
An der Spree zum Abendbrot,
Liejt er jleich in letzten Zügen, –
Zehn Minuten später: dot.

Krebse, rechte scheene, jroße!
Wie jesund det früher war!
Heute jibt es Krebsbazillen
In dem Oderkrebs sogar;
Hat man sechs Stück ufjeprepelt,
Denkt man jleich: Schockschwerenot,
Warum is mich denn so übel?
Nächsten Morgen is man dot.

Ooch det Atmen is jefährlich:
Wenn ick gut dir raten kann.
Mitmensch, atme nich zu ville.
Sieh dir erst die Luft mal an;
Kommst de in so'n Pilzjewimmel,
Hilft dir keen Karbol und Jod,
Ziehste in den janzen Schimmel,
Fällst um un biste dot.

Holste dir 'nen netten Schmöker
Aus der Leihbibliapotheke,
Kriegste gleich 'n Schock Milliarden
Von Mikroben uf'n Weg;
Kommste uf de vierte Seite,
Wirste im Jesichte rot,
Uf der fünften kriegste's Fieber,
Bei der sechsten biste dot.

Det ick mit de Hochbahn rutsche
 Kommt mir niemals in den Sinn;
 Nee, in die Bazillenkutsche
 Da kriegt mir keen Deibel rin!
 Steigste in fidel und munter,
 Pletzlich spürste Atemnot,
 Fährste bis zum Zoo hinunter
 Steigste aus und biste dot.

Nee, ick sag'schon! Von dem Leben
 Hat man jarnischt, wie Verdruß,
 Weil man die verfluchten Dinger
 Immerzu verschlucken muß!
 Alle Dage muß man lesen,
 Wie det Kleinzeug uns bedroht,
 Und wir jroßen Lebewesen
 Fallen um – schwapp – musedot!“

1.1

Historisches

Nur wenige Jahre nach den ersten Beschreibungen und Isolierungen von Mikroorganismen durch Louis Pasteur, Robert Koch, Gerhard Hansen und anderen war der Öffentlichkeit schon eine wesentliche Eigenschaft dieser meist einzelligen Kleinstlebewesen bekannt: Sie sind ubiquitär verbreitet, d. h. überall! Auch dass sie im Körper von Mensch und Tier Fieber erzeugen oder Krankheiten hervorrufen können, teilweise mit Todesfolge, war bekannt, ebenso schon Desinfektionsmaßnahmen wie der Einsatz der erwähnten Agenzien Karbolsäure und Jod. Auch der Name „Bakterien“ ist in dem Gedicht korrekt wiedergegeben. Noch 1906 wird in der 8. Auflage des „Lehrbuchs der Botanik für Hochschulen“ von Eduard Straßburger *et al.* neben anderen Bezeichnungen von Spaltpilzen (Schizomycetes) geschrieben, die Cyanobakterien werden als Spaltalgen bezeichnet [1].

Der Mensch macht sich die Leistungen der Mikroorganismen seit Jahrtausenden zunutze, ohne jedoch sehr lange Zeit von ihrer Existenz zu wissen. Die Sumerer brauten bereits vor 5000 Jahren ein bierähnliches Getränk, und die Assyrer ließen vor ungefähr 3500 Jahren Traubensaft zu Wein vergären.

Der erste Mensch, der Mikroorganismen mit eigenen Augen sah, war wohl der holländische Tuchhändler Antony van Leeuwenhoek (1632–1723). Er experimentierte mit selbstgebauten, einlinsigen Mikroskopen, mit denen er Vergrößerungen bis 270-fach und Auflösungen bis 1,5 µm erreichte. 1675 untersuchte er einen Aufguss von Pfefferkörnern und entdeckte winzige „Tierchen“. Weitere dieser damals „*animalcula*“ genannten kleinen Lebewesen entdeckte er im Zahnbelag. Darüber erstellte van Leeuwenhoek Zeichnungen, die er 1683 per Brief an die Royal Society nach London schickte [2].

Dem französischen Chemiker Louis Pasteur (1822–1895) gelangen gleich mehrere bahnbrechende Erkenntnisse auf dem Feld der Mikrobiologie. Er widerlegte experimentell die Urzeugungshypothese, erklärte das Wesen der Fermentation am Beispiel der alkoholischen Gärung und der Milchsäuregärung, entwickelte Methoden zur Desinfektion und Sterilisation und führte Verfahren zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten durch Impfung ein (Beispiel Tollwutimpfung 1885).

Der norwegische Arzt Gerhard Hansen (1841–1912) entdeckte 1873 mikroskopisch den Erreger der Lepra, *Mycobacterium leprae*, als eines der ersten Bakterien,

die als Krankheitserreger erkannt wurden [3]. Dieses Bakterium ist bis heute in Nährmedien nicht kultivierbar. Die Diagnose geschieht mit dem Mikroskop an Biopsiematerial oder Geschabsel der Nasenschleimhaut. Die Vermehrung dieser Mykobakterien gelingt nur in der Pfote von Mäusen und im Gürteltier (*Armadillo*). Erregerspezifische DNA lässt sich mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisen.

Der deutsche Arzt Robert Koch (1843–1910) bewies 1876 am Beispiel des Milzbrandenerregers *Bacillus anthracis*, dass Mikroorganismen die Verursacher von Infektionskrankheiten sind. Er stellte vier Postulate auf:

1. Bakterien müssen im infizierten Organismus nachweisbar sein.
2. Diese Bakterien müssen isoliert und in Reinkultur gebracht werden.
3. Durch Infektion mit diesen isolierten Bakterien wird im gesunden Organismus die Krankheit wieder hervorgerufen.
4. Der gleiche Infektionserreger ist erneut aus dem Wirt isolierbar.

Koch entwickelte Nährmedien, z. B. Fleischextraktbouillon, die er anfänglich mit Gelatine verfestigte, später mit Agar-Agar. Das Kochsche Plattengussverfahren, bis zum heutigen Tage in allen bakteriologischen Laboren angewandt, geht auf ihn zurück.

Mikroorganismen werden in zwei eigenen taxonomischen Domänen zusammengefasst (Bacteria und Archaea) und so von der Domäne Eukarya (Pilze, Tiere und Pflanzen) abgehoben. Aufgrund des Zellaufbaus der Mikroorganismen werden sie in Prokaryonten (Bacteria und Archaea; griech. *bakteria* = Stab; griech. *archaios* = alt, ursprünglich) und Eukaryonten (Pilze, Hefen, Algen, Protozoen) unterteilt.

1.2

Bedeutung

Die medizinische Mikrobiologie befasst sich mit der Erforschung der für Mensch und Tier bedeutungsvollen Krankheitserreger, deren Lebensgewohnheiten und Auswirkungen auf den menschlichen bzw. tierischen Organismus; sie beschäftigt sich somit vorwiegend mit den *obligat pathogenen* (= in jedem Fall krankmachenden) und den *fakultativ pathogenen* (= unter Umständen krankmachenden) Mikroorganismen, d. h. mit Keimen, die durch Zellzerstörung oder durch Abgabe giftiger Stoffwechselprodukte als gefährlich oder als „Schädlinge“ anzusehen sind. Mikroorganismen sind aber im Allgemeinen viel eher als „Nützlinge“ zu bezeichnen; ein biologisches Gleichgewicht ohne Mikroorganismen ist überhaupt nicht möglich. Sie sorgen durch die *Mineralisation von organischer Substanz* (z. B. pflanzlichem Material) für eine Wiedergewinnung von Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel, Phosphor usw., die dann erneut den Pflanzen zur Verfügung stehen (*Stoffkreisläufe*). Im Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier kommen den Mikroorganismen wichtige Funktionen bei *Aufschluss* und *Verdauung* der Nahrung zu. Auch Haut und Schleimhäute der Menschen sind besiedelt. Zur Ver-

deutlichung der Größenordnungen: Ein Mensch besteht aus ca. 10^{13} Zellen. Im Magen-Darm-Trakt leben ca. 10^{14} und auf der Haut ca. 10^{12} Mikroorganismen, die zusammen ca. 1,25 kg wiegen [4]. Damit beherbergt der menschliche Körper mehr Mikroorganismen als er selbst an eigenen Zellen verfügt.

Mikroorganismen finden Anwendung in der *Lebensmittelindustrie*. Beispiele dafür sind:

- Hefen bei der Fabrikation von Brot, Bier, Sake und Wein,
- Milchsäurebakterien bei der Herstellung von Joghurt, Kefir, Sauerkraut, Salami,
- Essigsäurebakterien für die Zubereitung von Essig,
- Schimmelpilze bei der Käseproduktion (Gorgonzola, Roquefort usw.) und für die Aufbereitung von Sojabohnen (in Ostasien).

Mikroorganismen werden eingesetzt zur Gewinnung von:

- Vitaminen,
- Aminosäuren,
- Hormonen,
- Steroiden,
- Enzymen, z. B. Amylasen (Stärkespaltung), Proteasen (Verdauung, Ledergerbung),
- Lipasen (Fettspaltung), Pektinasen (Fruchtsaftklärung),
- Antibiotika,
- Alkoholen (Ethanol, Butanol, Butandiol, Glycerin usw.) und
- weiteren Wirkstoffen, die zum Teil auch durch genetisch veränderte Mikroorganismen produziert werden (z. B. Insulin).

Mikroorganismen sind bei der Aufbereitung von Abwasser und der Müllkompostierung unerlässlich.

1.3

Mikroorganismengruppen

Eine Übersicht über die verschiedenen Gruppierungen von Mikroorganismen und über weitere Erreger von Infektionskrankheiten vermittelt Tab. 1.1. Mikroorganismen sind mit bloßem Auge nicht sichtbar; für ihre Beobachtung benötigt man ein Lichtmikroskop, im Falle der Viren – bis auf ganz wenige Ausnahmen – ein noch stärker vergrößerndes Elektronenmikroskop.

Die mittlere Größe von Bakterien liegt zwischen 0,3 und 10 μm . Der Durchmesser von Kokken, die zur Hautflora des Menschen gehören, beträgt ca. 1 μm . Denkt man sich 500 Kokken dieser Größe aneinandergereiht, so würde der Durchmesser des Punktes am Satzende erreicht. Ein weiterer Größenvergleich: Ein Kopfhaar ist ca. 40–120 μm , im Mittel 80 μm , dick (siehe Tab. 1.2). Das menschliche Auge kann Gegenstände bis ca. 25 μm erkennen (Auflösungsvermögen).

Tab. 1.1 Gruppen von Mikroorganismen und biologischen Agenzien.

Subzelluläre biologische Objekte	Meist einzellige Lebewesen (Mikroorganismen)
Prionen	Prokaryonten:
Viroide	Eubakterien
Bakteriophagen	Chlamydien
Viren	Rickettsien
	Mykoplasmen
	Archaeen
	Eukaryonten:
	Pilze, Hefen, Algen, Protozoen

Tab. 1.2 Größenordnungen von Partikeln und von Zellen.

Zelle bzw. Partikel	Größe
Eizelle (Vogel)	Im Zentimeter-Bereich (Straußenei: $d = 15 \text{ cm}$)
Eizelle (Mensch)	$200 \text{ }\mu\text{m}$
Menschliches Haar	$d = 40\text{--}120 \text{ }\mu\text{m}$, durchschnittlich $80 \text{ }\mu\text{m}$
Menschliche und tierische Zellen	$20\text{--}30 \text{ }\mu\text{m}$
Menschlicher Erythrozyt	$7,5 \text{ }\mu\text{m}$
Menschliche Samenzelle	$6,5 \text{ }\mu\text{m}$ lang
Pollen	$7\text{--}100 \text{ }\mu\text{m}$
Staub	$0,1\text{--}100 \text{ }\mu\text{m}$
Aerosol beim Niesen	$10\text{--}300 \text{ }\mu\text{m}$
Protozoen	$5\text{--}150 \text{ }\mu\text{m}$
Pilze	$5\text{--}10 \text{ }\mu\text{m}$
Bakterien	$0,3\text{--}10 \text{ }\mu\text{m}$
<i>Nanobacterium equitum</i> (Archaeon)	$0,4 \text{ }\mu\text{m}$
Mykoplasmen	$0,3\text{--}0,8 \text{ }\mu\text{m}$
Chlamydien	$0,3\text{--}1,0 \text{ }\mu\text{m}$
Rickettsien	$0,5\text{--}1,0 \text{ }\mu\text{m}$
Viren	$0,016\text{--}2,0 \text{ }\mu\text{m}$
Viroide	$2 \times 40 \text{ nm}$
Makromoleküle	$1\text{--}10 \text{ nm}$
Prionen	$< 5 \text{ nm}$
Atome	$0,1 \text{ nm}$

d = Durchmesser.

Die Welt der Mikroorganismen besteht aus den folgenden Gruppierungen (wobei es sich bei den folgenden ersten drei Gruppierungen nicht im eigentlichen Sinn um Lebewesen handelt, sondern um biologische Agenzien).

Prionen

Infektiöse Prionen PrP^{Sc} sind fehlgefaltete Formen eines kleinen (molare Masse ca. 30 000 Da) zellulären Glycoproteins. Die Fehlfaltung findet beim Rind zwischen den Aminosäuren 121 und 230 statt und ist einem Proteaseverdau nicht mehr zugänglich [5]. Den Namen leitete Stanley Prusiner von „*proteinaceous infectious particle*“ ab [6]. PrP^{Sc} verursacht Erkrankungen bei Schafen und Ziegen (engl. *scrapie*, dt. Traberkrankheit), Rindern bzw. Katzen (bovine bzw. feline spongiforme Enzephalopathie = BSE bzw. FSE), Nerzen, Hirschen und Huftieren. Auch der Mensch kann infiziert werden (Kuru, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom). Die Inkubationszeiten können viele Jahre dauern. Im Verlauf dieser Erkrankungen zerfällt das Hirngewebe schwammartig (= spongiform). BSE trat gegen Ende der 1980er-Jahre im größeren Maßstab erstmals in Großbritannien auf, während Scrapie bereits seit mehr als 260 Jahren bekannt ist [7]. Vermutlich wurden die Prionen über unzureichend erhitztes Tiermehl, das PrP^{Sc} aus an Scrapie infizierten Schafen enthielt und das an Rinder verfüttert wurde, übertragen.

Viroide

Viroide sind zirkuläre, einsträngige RNA-Moleküle von niedriger molarer Masse (ca. 12×10^4 Da, ca. 360 Nukleotide). Die RNA ist „nackt“, d. h. nicht von Protein umhüllt. Viroide verursachen Pflanzenkrankheiten, z. B. die Spindelknollensucht der Kartoffel (*potato spindle tuber viroid*).

Viren

Viren (lat. *virus* = Gift, Schleim) sind überwiegend ultramikroskopische, obligate Zellparasiten, die nur entweder DNA (z. B. Pockenvirus, *Herpes simplex*) oder RNA (z. B. Grippe-, Schnupfen-, Tollwutviren) enthalten, keine Enzymsysteme zur Energiegewinnung und keine Systeme zur Proteinsynthese aufweisen und infizierte Wirtszellen zur Synthese der Virusbausteine veranlassen. Viren bestehen mindestens aus einem nukleinsäurehaltigen Innenkörper und einem Proteinhülle, Kapsid genannt. Sie können behüllt, d. h. mit einer Lipiddoppelschicht umgeben sein (wie die Krankheitserreger von Pocken, Herpes, Masern, Grippe, Tollwut, AIDS und SARS) oder unbehüllt sein (z. B. Erreger von Polio, Hepatitis A, Schnupfen und Maul- und Klauenseuche). Das Polio-Virus lässt sich mit der chemischen Summenformel $C_{332652}H_{492388}N_{98245}O_{131196}P_{7501}S_{2340}$ charakterisieren [8]. Am 9.12.1979 erklärte die WHO die Welt als pockenfrei.

Die Größe der Viren variiert zwischen 20 nm (Picornaviren, Arboviren) und 2000 nm (Pflanzenviren wie das Citrus-Tristeza-Virus). Viren, die Bakterien befallen, heißen Bakteriophagen. Molekularbiologisch gut untersucht sind die T-Phagen (Coli-Phagen); ihre Größe beträgt 70 nm × 200 nm.

2003 wurden große Viren in Amöben gefunden; sie wurden Mimiviren genannt. Mit Größen bis 800 nm sind sie im Lichtmikroskop sichtbar [8]. Der Nachweis von Viren geschieht mithilfe von Gewebekulturen, Tierversuchen, Eikulturverfahren, PCR und immunologischen Methoden. Bekannt sind zurzeit ungefähr 1500 Viren, von denen etwas mehr als 200 humanpathogen sind [9].