

**HOCHSCHULE
MITTWEIDA**
UNIVERSITY OF
APPLIED SCIENCES



BACHELORARBEIT

Frau Daniela Taraba

Validierung GMP-pflichtiger Vorgänge und Methoden

Mittweida, 2013

Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik

BACHELORARBEIT

Validierung GMP-pflichtiger Vorgänge und Methoden

Autor:

Frau Daniela Taraba

Studiengang:

Biotechnologie / Bioinformatik

Seminargruppe:

BI09w2-B

Erstprüfer (Hochschule Mittweida):

Herr Prof. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer (CUP Laboratorien):

Frau Dr. Kathleen Haase

Einreichung:

Mittweida, Februar, 2013

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2013

BACHELORREPORT

**Validation of GMP-relevant processes and
methods**

author:

Ms. Daniela Taraba

course of studies:

Biotechnology / Bioinformatics

seminar group:

BI09w2-B

first examiner:

Mr. Prof. Röbbbe Wünschiers

second examiner:

Ms. Dr. Kathleen Haase

submission:

Mittweida, February, 2013

defense/ evaluation:

Mittweida, 2013

Biografische Beschreibung:

Taraba, Daniela:

Validierung GMP-pflichtiger Vorgänge und Methoden.

– 2013. Hauptteil – S. 86 Verzeichnisse – S. 19 – Anhang S. 21

Teil 1: Validierung mikrobiologischer Methoden anhand dreier Prüfmuster im GMP-pflichtigen Bereich

Teil 2: Validierung eines Excel-Arbeitsblattes zur mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika im GMP-pflichtigen Bereich

Mittweida, HOCHSCHULE MITTWEIDA-UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES,

Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, 2013

Referat:

Im Teil 1 der vorliegenden Arbeit werden drei Prüfmuster auf ihre Gesamtkeimzahl (Alle koloniebildenden Einheiten, zuzüglich Hefen und Schimmelpilze) und spezifizierte Mikroorganismen validiert. Dabei werden die Parameter Richtigkeit, Präzision, Selektivität, Robustheit und die Bestimmungsgrenze überprüft. Nach Erstellung eines Validierungsplans findet, die auf das Produkt angepasste, Durchführung statt. Ergebnisse und Bewertungen werden in einem Validierungsbericht zusammengefasst. Für alle drei Prüfmuster konnten, bei Anwendung der individuellen Methode, die vorgegebenen Testorganismen nachgewiesen und das Verfahren bestätigt werden. Somit können die Methoden in der Routine angewendet werden.

Teil 2 beschreibt den Vorgang einer Excel-Validierung für das Arbeitsblatt zur „*mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika*“. Es wird ebenfalls ein Validierungsplan erstellt. Ergebnisse und Auswertungen werden in einem Bericht festgehalten. Ein Excel-Arbeitsblatt dient der optimalen Erfassung von Daten und deren Auswertungen für den Routinebetrieb, ohne die Qualität der Ergebnisse zu beeinträchtigen. Mit der Validierung konnte dies bestätigt werden. Verwendete Formeln erfüllen die Vorgaben. Die Musterberechnung anhand dreier potentieller Proben stimmt mit den Ergebnissen des Excel-Arbeitsblatts überein. Alle Zellen, bis auf grün markierte Eingabezellen, wurden gesperrt. Die farbliche Unterscheidung der Zellen erfolgte nach Funktionalität und erfüllt die angestrebte Signalwirkung.

DANKSAGUNG

Diese Zeilen möchte ich nutzen, um meinen Dank zum Ausdruck zu bringen.

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Hochschulbetreuer, Herrn Prof. Dr. R. Wünschiers, sowie meiner Betreuerin Frau Dr. K. Haase (Laborleitung CUP), für ihre ausgiebige Unterstützung bedanken. Durch stetige konstruktive Kritik verhalfen sie mir zu einer durchdachten Arbeit. Dank der hervorragenden fachlichen Kenntnisse von Frau Dr. Haase konnte sie mich in meiner Recherche unterstützen und mir zu neuen Erkenntnissen verhelfen. Ohne die umfassende Datenbasis, die mir Herr Prof. Dr. Wünschiers und Kollegen, in den letzten Jahren vermittelt haben, wäre es mir nicht möglich gewesen, eine derart erfolgreiche Arbeit abzugeben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Katharina Gerth, Nicole Jüttner, Marika Progscha und Sven Päßler, die mich im Laufe meiner praktischen Arbeit stets unterstützt haben und viel Geduld aufbrachten, mir ihr Wissen verständlich zu erklären. Außerdem geht mein Dank an Frau Severin Werner, die mit konstruktiver Kritik und ausgiebigen Gesprächen meine Leistung eingeschätzt hat und mir zahlreiche Tipps für die Zukunft vermitteln konnte.

Ganz besonderer Dank geht jedoch an meine Familie. Die nie nur den geringsten Zweifel an mir hegen und mich sowohl finanziell, als auch emotional unterstützt haben. Bereits in Zeiten des Abiturs hat mich meine Familie stets dazu bewegt über meine Grenzen hinauszugehen. Auch den dunkelsten Momenten konnte ich dank euch immer mit einem Lächeln entgegen treten. Euch diese Arbeit zu widmen ist das Mindestmaß an Dankbarkeit, das ich euch entgegen bringen kann. Ohne euch wäre ich niemals der Mensch geworden, der ich jetzt bin. Vielen Dank dafür.

Nicht zu Letzt gilt mein Dank meinem Freund, Christopher Schütz, der nicht nur mein größter Fan, sondern auch mein größter Kritiker ist. Ohne sein literarisches „Know-How“ hätte ich meinen Schreibstil nicht optimieren können. Stundenlanges gegenlesen, Rechtschreibfehler korrigieren und inhaltliche Diskussionen harrete er geduldig aus und beendete jede Sitzung mit einem höflichen Lächeln. In Momenten der Verzweiflung fand er immer einen Weg mich neu zu motivieren.

Vielen Dank für eure und Ihre Unterstützung.

„Wer noch nie einen Fehler gemacht hat, hat sich noch nie an etwas Neuem versucht...“

[Albert Einstein]

VORWORT

Der nachstehende Text wurde von Daniela Taraba, Biotechnologie und Bioinformatik Studentin der Hochschule Mittweida – University Of Applied Sciences, unter Leitung von Fr. Dr. K. Haase, Laborleiterin der Abteilung Mikrobiologie der „CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH“ und Prof. Dr. R. Wünschiers, Professor der Hochschule Mittweida, verfasst.

Validierungen sind Verfahren zur Dokumentation und Beweisführung von Ergebnissen, die wiederlegen, dass ein Prozess oder eine Methode dauerhaft den definierten Grenzwerten nachkommen. Somit erfolgt eine Untersuchung auf Richtigkeit und Zuverlässigkeit. Gesetzlich wird gefordert, dass ausschließlich ausgiebig validierte Verfahren in der Routine verwendet werden [Axmann et al, 2008].

Vor allem im pharmazeutischen Bereich kommt die Validierung als fester Bestandteil des Qualitätsmanagements zur Anwendung, da die Ergebnisse eine direkte Auswirkung auf die Patienten haben. Produkte und Prozesse besitzen verschiedene Eigenschaften und Spezifikationen, die während der Qualitätskontrolle validiert, dokumentiert und nach den Vorgaben der „Guten Herstellungspraxis“ (GMP) durchgeführt werden müssen [EU-GMP-Leitfaden, Teil 1].

In der vorliegenden Arbeit „Validierung GMP-pflichtiger Vorgänge und Methoden“ werden zwei Typen von Validierungen im pharmazeutischen Bereich vorgestellt.

Teil 1 stellt den Ablauf und die Dokumentation der Ergebnisse für die Validierung mikrobiologischer Methoden, anhand von drei ausgewählten Prüfmustern (Arzneimitteln), dar. Diese werden auf Richtigkeit und Präzision validiert, indem die Eignung der zu prüfenden Methode sichergestellt wird.

Teil 2 umfasst die Validierung eines computergestützten Systems anhand eines Excel-Arbeitsblatts zur „mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika“. Diese Validierung erfolgt zur besseren Erfassung, Strukturierung und Auswertung von Rohdaten mit Berechnungssoftware [Ph. Eur. 2.6.12 / Ph. Eur. 5.3].

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....
Vorwort.....
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Formelverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Symbolverzeichnis	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 GMP-konforme Validierung von mikrobiologischen Methoden und Excel-Anwendungen	2
1.1.1 Validierung und Qualifizierung.....	2
1.1.2 Gesetzliche Rahmenbedingungen und Regularien zur Sicherung der GMP-konformen Durchführung.....	4
1.1.3 Risikoanalyse nach der FMEA-Methode	5
1.1.4 Planung, Durchführung und Auswertung von Validierungen	7
1.2 Elemente einer Validierung	9
1.2.1 Analytische Kenngrößen zur Validierung mikrobiologischer Methoden	9
1.2.2 Statistische Kenngrößen zur Validierung computergestützter Systeme.....	11
Teil 1	
2 Zielstellung Teil 1.....	17
3 Material	18
3.1 Geräte und Materialien	18
3.2 Teststämme	18
3.3 Medien	19
4 Durchführung	20
4.1 Regularien.....	20
4.2 Produktspezifische Spezifikationen	20
4.4 Risikoanalyse nach der FMEA-Methode.....	21
4.5 Vorbereitung der Methoden	22
4.5.1 Vorbereitung der Testorganismen	22
4.5.2 Bioburden.....	24
4.6 Prüfmuster 1.....	24
4.6.1 Probenvorbereitung Prüfmuster 1	25
4.6.2 Bestimmung TAMC und TYMC für Prüfmuster 1.....	25
4.6.3 Spezifizierte Mikroorganismen Prüfmuster 1	26

4.7	Prüfmuster 2.....	27
4.7.1	Probenvorbereitung Prüfmuster 2.....	27
4.7.2	Bestimmung TAMC und TYMC Prüfmuster 2.....	27
4.7.3	Spezifizierte Mikroorganismen Prüfmuster 2.....	28
4.8	Prüfmuster 3.....	28
4.8.1	Probenvorbereitung Prüfmuster 3.....	29
4.8.2	Bestimmung TAMC und TYMC Prüfmuster 3.....	29
4.8.3	Spezifizierte Mikroorganismen Prüfmuster 3.....	29
4.9	Reidentifizierung der Testorganismen.....	30
4.9.1	Reidentifizierung <i>Aspergillus brasiliensis</i> und <i>Candida albicans</i>	30
4.9.2	Reidentifizierung von <i>Salmonella typhimurium</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
4.9.3	Reidentifizierung mit API-Steifen.....	30
5	Ergebnisse.....	32
5.1	Risikoanalyse.....	32
5.2	Ergebnisse der Vorbereitung der Testorganismen.....	34
5.3	Bioburden.....	34
5.4	Prüfmuster 1.....	35
5.4.1	Bestimmung TAMC Prüfmuster 1.....	35
5.4.2	Ergebnisse der Bestimmung TYMC Prüfmuster 1.....	37
5.4.3	Spezifizierte Mikroorganismen.....	38
5.5	Prüfmuster 2.....	40
5.5.1	Bestimmung TAMC Prüfmuster 2.....	40
5.5.2	Bestimmung TYMC Prüfmuster 2.....	42
5.5.3	Spezifizierte Mikroorganismen.....	43
5.6	Prüfmuster 3.....	45
5.6.1	Bestimmung TAMC Prüfmuster 3.....	45
5.6.2	Bestimmung TYMC Prüfmuster 3.....	47
5.6.3	Spezifizierte Mikroorganismen.....	48
5.7	Reidentifizierung der Testorganismen.....	52
5.7.1	Reidentifizierung von <i>Aspergillus brasiliensis</i> und <i>Candida albicans</i>	52
5.7.2	Reidentifizierung von <i>Salmonella typhimurium</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
5.7.3	Reidentifizierung mit API-Streifen.....	52
6	Auswertung und Diskussion.....	55
6.1	Risikoanalyse.....	55
6.2	Auswertung der Vorbereitung der Testorganismen.....	55
6.3	Vergleich der Prüfmuster.....	55
6.3.1	Zusammensetzung.....	56
6.3.2	Bioburden.....	56
6.3.3	Bestimmung TAMC und TYMC.....	57

6.3.4	Spezifizierte Mikroorganismen	59
6.4	Reidentifizierung der Testorganismen	63
6.4.1	Reidentifizierung von <i>Aspergillus brasiliensis</i> und <i>Candida albicans</i>	63
6.4.2	Reidentifizierung von <i>Salmonella typhimurium</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
6.4.3	Reidentifizierung mit API-Streifen	63
7	Zusammenfassung und Ausblick der Validierung mikrobiologischer Methoden	64

Teil 2

8	Zielstellung Teil 2	66
9	Durchführung	67
9.1	Regularien	67
9.2	Spezifikationen	67
9.3	Risikoanalyse nach der FMEA-Methode	67
9.4	Programmaufbau	68
9.5	Methoden	69
9.5.1	Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln, Erläuterung der Beziehungen zwischen den Formeln	69
9.5.2	Musterberechnung mit Hand	69
9.5.3	Sperrung aller Zellen außer den Eingabezellen und farbliche Unterscheidung der Eingabe- und Ausgabefelder	69
10	Ergebnisse	70
10.1	Risikoanalyse	70
10.2	Programmaufbau	71
10.3	Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln, Erläuterung der Beziehungen zwischen den Formeln	73
10.4	Musterberechnung mit Hand	76
10.5	Sperrung aller Zellen außer den Eingabezellen und farbliche Unterscheidung der Eingabe- und Ausgabefelder	79
10.5.1	Sperrung aller Zellen außer der Eingabezellen	79
10.5.2	Farbliche Unterscheidung der Ein- und Ausgabezellen	80
11	Auswertung und Diskussion	81
11.1	Risikoanalyse	81
11.2	Programmaufbau	81
11.3	Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln	82
11.4	Musterberechnung mit Hand	82
11.5	Sperrung aller Zellen außer den Eingabezellen und farbliche Unterscheidung der Eingabe- und Ausgabefelder	83
12	Zusammenfassung und Ausblick der Validierung computergestützter Programme	84

Summary	86
Literaturverzeichnis	XIII
Anhangsverzeichnis	XIX
Anhang-Teil 1	A-1
Anhang-Teil 2	A-12
Erklärung auf Selbstständigkeit	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammenhang Qualifizierung und Validierung [PIC/S PI 006-1].....	3
Abbildung 2: Durchführung Validierung Schema [SOP CUP ORG 11]	7
Abbildung 3: Steigungsverhältnismodell als Dosis-Wirkungs-Diagramm [Ph. Eur. 5.3].....	12

Teil 1

Abbildung 4: Verdünnungsreihe Schema.....	23
Abbildung 5: Negativreaktion API 20 E zum Zeitpunkt 0 [SOP CUP GMP MIB 08].....	52
Abbildung 6: Ergebnis der Reidentifizierung von <i>E. coli</i> mit API 20 E nach Inkubation	52
Abbildung 7: Ergebnis der Reidentifizierung von <i>Bacillus subtilis</i> mit API 50 CHB [SOP CUP GMP MIB 08]	53
Abbildung 8: Negativkontrolle API Staph zum Zeitpunkt 0 [SOP CUP GMP MIB 08]	54
Abbildung 9: Ergebnis der Reidentifizierung von <i>Staphylococcus aureus</i> mit API Staph nach Inkubation	54

Teil 2

Abbildung 10: Registrierkarten der Excel-Anwendung.....	68
Abbildung 11: Visual-Basic-Editor	68

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Freiheitsgrade für SSreg, SSschn, SSlin, SSbeh [Ph. Eur. 5.3].....	13
Tabelle 2: Restfehler [Ph. Eur. 5.3].....	14
Teil 1	
Tabelle 3: Spezifikationen Prüfmuster 1 [Ph. Eur. 5.1.4]	20
Tabelle 4: Spezifikationen Prüfmuster 2 [Ph. Eur. 5.1.8]	21
Tabelle 5: Spezifikationen Prüfmuster 3 [Ph. Eur. 5.1.8]	21
Tabelle 6: Bewertungsmaßstab der Risikoanalyse nach FMEA Teil 1 [SOP CUP VALP 241/ SOP CUP VALP 231/ SOP CUP VALP 244]	21
Tabelle 7: Volumina für die Testorganismen am Beispiel Prüfmuster 3	23
Tabelle 8: Prüfpunktliste Risikoanalyse Teil 1 [SOP CUP VALP 241/ SOP CUP VALP 231/ SOP CUP VALP 244].....	32
Tabelle 9: Verdünnungsreihe am Beispiel Prüfmuster 3.....	34
Tabelle 10: Bioburden.....	34
Tabelle 11: Ergebnisse der Bestimmung auf TAMC Prüfmuster 1	35
Tabelle 12: Ergebnisse der Bestimmung auf TYMC Prüfmuster 1	37
Tabelle 13: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Prüfmuster 1	38
Tabelle 14: Ergebnisse LOQ für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Prüfmuster 1.....	38
Tabelle 15: Ergebnisse RoRef Test 1 und Test 2 für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Prüfmuster 1.....	38
Tabelle 16: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für <i>Staphylococcus aureus</i> Prüfmuster 1	39
Tabelle 17: Ergebnisse LOQ für <i>Staphylococcus aureus</i> Prüfmuster 1.....	39
Tabelle 18: Ergebnisse RoRef für <i>Staphylococcus aureus</i> Prüfmuster 1	39
Tabelle 19: Ergebnisse der Bestimmung auf TAMC Prüfmuster 2	40
Tabelle 20: Ergebnisse der Bestimmung auf TYMC Prüfmuster 2	42
Tabelle 21: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für <i>Escherichia coli</i> Prüfmuster 2	43
Tabelle 22: Ergebnisse LOQ für <i>Escherichia coli</i> Prüfmuster 2	43
Tabelle 23: Ergebnisse RoRef für <i>Escherichia coli</i> Prüfmuster 2	43
Tabelle 24: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für <i>Salmonella typhimurium</i> Prüfmuster 2	44
Tabelle 25: Ergebnisse LOQ für <i>Salmonella typhimurium</i> Prüfmuster 2.....	44
Tabelle 26: Ergebnisse RoRef für <i>Salmonella typhimurium</i> Prüfmuster 2	44
Tabelle 27: Ergebnisse der Bestimmung auf TAMC Prüfmuster 3	45
Tabelle 28: Ergebnisse der Bestimmung auf TYMC Prüfmuster 3	47
Tabelle 29: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für <i>Escherichia coli</i> Prüfmuster 3	48
Tabelle 30: Ergebnisse LOQ für <i>Escherichia coli</i> Prüfmuster 3	48
Tabelle 31: Ergebnisse RoRef für <i>Escherichia coli</i> Prüfmuster 3	48
Tabelle 32: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für <i>Salmonella typhimurium</i> Prüfmuster 3	49
Tabelle 33: Ergebnisse LOQ für <i>Salmonella typhimurium</i> Prüfmuster 3.....	49

Tabelle 34: Ergebnisse RoRef für <i>Salmonella typhimurium</i> Prüfmuster 3	49
Tabelle 35: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien Test 1 und Test 2 qualitativ Prüfmuster 3	50
Tabelle 36: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien LOQ qualitativ Prüfmuster 3	50
Tabelle 37: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien qualitativ RoRef Prüfmuster 3	50
Tabelle 38: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien quantitativ Prüfmuster 3	51
Tabelle 39: Ergebnisse der Reidentifizierung von <i>Aspergillus brasiliensis</i> und <i>Candida albicans</i>	52
Tabelle 40: Vergleich der Prüfmuster	55
Tabelle 41: Quantitative Bestimmung galletoleranter gramnegativer Organismen [Ph. Eur. 2.6.13]	62
Tabelle 42: Auswertung qualitativer Nachweis galletoleranter Bakterien	62
Tabelle 43: Auswertung APIweb	63

Teil 2

Tabelle 44: Bewertungsmaßstab der Risikoanalyse nach FMEA Teil 2 [SOP CUP VAL 132]	67
Tabelle 45: Prüfpunktliste Risikoanalyse Teil 2 [SOP CUP VAL 132]	70
Tabelle 46: Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln	73
Tabelle 47: Musterberechnung mit Hand im Vergleich zum Excel-Sheet Beispiel 1	76
Tabelle 48: Musterberechnung mit Hand im Vergleich zum Excel-Sheet Beispiel 2	77
Tabelle 49: Musterberechnung mit Hand im Vergleich zum Excel-Sheet Beispiel 3	78

FORMELVERZEICHNIS

Formel 1: Wiederfindungsrate [Ph. Eur. 2.6.12]	9
Formel 2: Faktor Präzision [Ph. Eur. 2.6.12].....	10
Formel 3: Wirkung [Ph. Eur. 5.3].....	12
Formel 4: Ermittlung Gesamtsumme je Substanz (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3].....	12
Formel 5: Ermittlung Lineares Produkt (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3].....	12
Formel 6: Ermittlung Achsenabschnitt (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]	12
Formel 7: Ermittlung Steigung (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]	12
Formel 8: Ermittlung Behandlungswert (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 9: Ermittlung Nichtlinearität (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 10: Berechnung von H_b zur Ermittlung der Varianzanalyse [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 11: Berechnung H_i zur Ermittlung der Varianzanalyse [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 12: Berechnung von a (Achsenabschnitt) [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 13: Berechnung von K (Korrekturterm) [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 14: Regression SS_{reg} [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 15: Schnittpunkt SS_{schn} [Ph. Eur. 5.3].....	13
Formel 16: Nichtlinearität SS_{lin} [Ph. Eur. 5.3].....	13
Formel 17: Behandlung SS_{beh} [Ph. Eur. 5.3]	13
Formel 18: Restfehler SS_{rest} [Ph. Eur. 5.3].....	14
Formel 19: Gesamt SS_{ges} [Ph. Eur. 5.3].....	14
Formel 20: Berechnung gemeinsamer Achsenabschnitte [Ph. Eur. 5.3]	15
Formel 21: Berechnung Steigung (am Beispiel der Referenzsubstanz) [Ph. Eur. 5.3]	15
Formel 22: Berechnung Wirkungsverhältnis [Ph. Eur. 5.3].....	15
Formel 23: Berechnung Vertrauensintervall [Ph. Eur. 5.3].....	15
Formel 24: Berechnung Variationskoeffizient V_1 [Ph. Eur. 5.3]	15
Formel 25: Berechnung Vertrauenskoeffizient V_2 [Ph. Eur. 5.3].....	15
Formel 26: Berechnung von C (statistische Größe zur Berechnung des Vertrauensintervalls) [Ph. Eur. 5.3].....	15
Formel 27: Berechnung des Korrekturterms K' [Ph. Eur. 5.3].....	15

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
API (Abkürzungen liegen in Tabelle E, F und G im Anhang vor)	Analytical Profile Index
ATCC	Amercian Typ Cultur Collection
BA	<i>Bacillus subtilis</i>
Bak.	Bakterien
BPLS-Agar	Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar
Ca	<i>Candida albicans</i>
CASO-A.	Casein Sojamehl Pepton Agar
CASO-B.	Casein Sojamehl Pepton Bouillon
Cet-A.	Cetrimid-Agar
CHB-Medium	Charcoal Horse Blood – Medium
CUP	Chemisches Labor für Umwelt- und Produktanalytik
DAR	Deutscher Akkreditierungsrat
DIN	Deutsches Institut für Normung
Ec / E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Enterohämorrhagische Escherichia coli</i>
EU (Früher EG)	European Union
FDA	Food and Drug Admistration (amerikanische Gesundheitsbehörde)
FMEA	Failur Mode and Effects Analysis
GmbH	Gesellschaft mit bedingter Haftung
GMP	Good Manufacturing Practice (Gute Herstellungspraxis)
Gram(+)/Gram(-)	Grampositiv/Gramnegativ
GXP	Bezeichnung für alle Richtlinien der „Guten Arbeitspraxis“
H	Fehlerwahrscheinlichkeit (FMEA-Risikoanalyse)
ICH	International Conference on Harmonisation
ISO	Internationale Organisation für Normung
KBE	Koloniebildende Einheit
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantitation)
MCA	MacConkey Agar
MCB	MacConkey Bouillon
MKP-A.	Mannitolsalz-Phenolrot-Agar
NCPB	Natriumchlorid-Pepton-Pufferlösung

NCPB+10% Tween	Natriumchlorid-Pepton-Pufferlösung mit Tween 80 (10 %ige Lösung)
n.g.	Nicht geprüft
n.n.	Nicht nachgewiesen
nm	Nanometer (Einheit für Wellenlänge)
NM	Codebezeichnung für Nährmedium
MIB	Codebezeichnung für Mikrobiologie
Mossel-B.	Mossel-Bouillon
MS-Excel	Microsoft Excel
ORG	Codebezeichnung für organisatorischen Bereich
PAT	Process Analytical Technologies
PDF	Portable Document Format
Ph. Eur.	Europäisches Arzneimittelbuch
PIC/S PI	Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme (Inspektionsleitfaden)
Psa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QA/QS	Qualitätssicherung
Q9	Qualitätsmanagement (ICH-Leitfaden)
Q10	pharmazeutisches Qualitätssystem (ICH-Leitfaden)
RoRef	Robustheitstest
RPZ	Risikoprioritätszahl (FMEA-Risikoanalyse)
RVS-B.	Rappaport und Vassiliadis Bouillon
S	Schwere des Fehlers (FMEA-Risikoanalyse)
Sa	<i>Salmonella typhimurium</i>
SAB-A.	Sabouraud Dextrose Agar
SAB + CA – Agar	Sabouraud Dextrose Agar mit Chloramphenicol
Sheet	Bezeichnung für Excel-Arbeitsblatt
SOP	Standard Operating Procedure (Standardarbeitsanweisung)
Sta	<i>Staphylococcus aureus</i>
STE	Test auf Keimfreiheit der Nährmedien
TAMC	Total Aerobic Microbial Count
TDA-Reagenz	Tryptophandesaminase-Reagenz
TP	Technischer Prüfpunkt
TYMC	Total Yeast and Mould Count
V	Validierung (FMEA-Risikoanalyse)
VAL	Validierung

VALB	Validierungsbericht
VALP	Validierungsplan
VP (1 und 2)	Polypeptide (Zusatzreagenz API-Streifen)
VRBD-A.	Kristallviolett-Galle-Glukose-Agar
W	Wahrscheinlichkeit den Fehler zu erkennen (FMEA-Risikoanalyse)
Wdhl.	Wiederholung
WEP	Wachstumseignungsprüfung
WHO	World Health Organisation
XLD-A.	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
Xlsx	Excel-Spreadsheet (Excel-Vorlage)
Xlt	Mustervorlage MS-Excel

SYMBOLVERZEICHNIS

A	Mittleres Abweichungsquadrat des Restfehlers (in SOP mit s bezeichnet)
a/a'	Achsenabschnitt der linearen Regression
as/at	Gemeinsamer Achsenabschnitt
bs/bt	Steigung für Standard bzw. Probe
b's/b't	Steigung des Standards bzw. Probe für Vertrauensgrenze
BW	Blindwert
C	Statistische Größe für Vertrauensgrenze
d	Anzahl der Dosen ohne Blindwert
FG	Freiheitsgrad
Gs/Gt	Behandlungswert
h	Anzahl der Prüfsubstanzen
HG/Hi	Faktor für Varianzanalyse
Js/Jt	Nichtlinearität
K/K'	Korrekturterm
Ls/Lt	Lineares Produkt
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Wiederholungen für jede Behandlung
PK	Positivkontrolle/n
PP	Parallelproben
Ps/Pt	Gesamtsumme je Substrat
R	Wert für t-Test für FG des SS_{rest} (in SOP = t)
R'T	Wirkungsverhältnis
SS_{beh}	Behandlung (Varianzursache)
SS_{ges}	Gesamt (Varianzursache)
SS_{lin}	Nichtlinearität (Varianzursache)
SS_{reg}	Regression (Varianzursache)
SS_{rest}	Restfehler (Varianzursache)
SS_{schn}	Schnittpunkt (Varianzursache)
s/t	Standard/Testsubstanz
S/T	Standard/Testsubstanz
V1/V2	Variationskoeffizienten
x	Wirkung bei Dosis x
y	Einzelwirkung der Extinktion x bei Dosis x
y'	0,18025 (gemäß der Ph. Eur. 5.3)

1 EINLEITUNG

In der „CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH“ ist die Einhaltung der Qualitätsstandards der Schlüssel zum Erfolg. CUP sind ein privates Auftragslabor, das chemische und mikrobiologische Untersuchungen im Arzneimittel- und Trinkwasserbereich und in der Lebensmittel- und Konsumgüterindustrie durchführt. Gegründet wurde das Auftragslabor 1991 als „Chemisches Labor für Umwelt- und Produktanalytik“, durch die Diplom Chemikerin Doris Freitag. 1995 erfolgte anschließend die Akkreditierung durch den „Deutschen Akkreditierungsrat (DAR)“. Zwei Jahre darauf wurde die Tochterfirma „Institut für Chemie und Mikrobiologie“ gegründet. 2011 erfolgte der Neubau mit anschließender Akkreditierung des heutigen Labors „CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH“ am Standort Radeberg [URL-1].

Der Vorgang der Validierung unterstützt die Qualität von Arzneimitteln mit helfendem Charakter und gehört zu den wichtigsten Aufgaben der „CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH“. Es ist grundlegend die Qualität jeder Methode sicherzustellen, da Abweichungen direkte Auswirkung auf den Zustand des Verbrauchers haben können. In dem EU-GMP-Leitfaden (European Union – Good Manufacturing Practice; vor Einführung des Lissabonvertrags auch EG-GMP-Leitfaden) werden Richtlinien und Regularien aufgestellt, die den Umgang mit Arzneimitteln und Wirkstoffen in der Kosmetik-, Lebensmittel- und Pharmaindustrie regeln bzw. Vorlagen zur Validierung geben, die das Qualitätssystem unterstützen. Somit sind Vorgänge wie Qualifizierung und Validierung erforderlich, um die Produktqualität aufrecht zu erhalten [EU-GMP-Leitfaden, Teil 1].

Gemäß der ISO (Internationalen Organisation für Normung) 17025: 1999 (6) wird der Vorgang einer Validierung wie folgt beschrieben: Eine Validierung ist „die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden“ [Metas, 2005]. Es kann erst dann von einem „zuverlässigen Analyseverfahren“ gesprochen werden, wenn die Qualität dieses Verfahrens ermittelt, verbessert, dokumentiert ist und „zu jedem Zeitpunkt der Routinearbeit eingehalten wird“ [Herbold, 2000].

Die aus einer Validierung hervorgehenden Ergebnisse bilden die Grundlage „zur Gewährleistung der Zuverlässigkeit und Rückverfolgbarkeit“ der Daten einer Prüfmethode. Validierungen mikrobiologischer Methoden sind fester Bestandteil des Qualitätsmanagements. Es erfolgt eine Bestätigung des „Analyseverfahrens“ bei gegebener Aufgabenstellung, alle Spezifikationen für die individuelle Anwendung, zu erfüllen [Leiterer, 2008].

Die spezielle Zielstellung ergibt sich aus der spezifischen Aufgabenstellung für die zu validierenden Produkte. Allgemein wird das Ziel des Validierungsvorgangs auf die „Validierung der mikrobiologischen Keimgehaltsbestimmung von Produkt 1, Produkt 2 und Produkt 3“ festgelegt. Weiterhin erfolgt der Nachweis spezifischer Mikroorganismen entsprechend der produkteigenen Spezifikationen. Somit wird nachvollziehbar überprüft, dass die spezifische Aufgabenstellung erfüllt werden kann. Der Validierungsvorgang wird dabei detailliert dokumentiert. Umfang und Aufwand richten sich nach dem zu validierenden Produkten, um eine möglichst genaue Aussage treffen zu können [Metas, 2005].

Die Validierung mikrobiologischer Methoden erfordert eine ausführliche Dokumentation der Durchführung und Ergebnisse. Dies zeichnet die Qualität dieses Prozesses aus. Protokolle und Berichte sind ein Muss für das Qualitätsmanagement [Blumenthal, 2002].

Die Unterstützung „*einmaliger und wiederholter Prozesse*“ durch MS-Excel-Anwendung ist ein Beispiel der Virtualisierung der Ergebnisse verschiedener Methoden. Inhalt bildet vor allem die „*Datensammlung, Berechnung, Diagrammdarstellung und die Dokumentation umfangreichen Zahlenmaterials*“, auf Grundlage automatisierter Vorgänge. Oft wird das Anwendungsspektrum von MS-Excel (Microsoft-Excel) unterschätzt. Komponenten wie „*Komplexität, Umfang und Automatisierungsgrad*“ werden nicht vollständig ausgeschöpft, wodurch die Anwendung an „*Nutzwert*“ verliert. Liegt ein GMP-pflichtiger Vorgang vor, so muss, in Anlehnung an die GMP-Regelwerke, gewährleistet sein, dass ausschließlich „*regelkonform*“ erstellte und überprüfte pharmazeutische Präparate freigegeben werden. Werden „*GMP-kritische Bewertungen*“ durchgeführt, so muss ein routinierter, fehlerfreier Umgang mit den Zahlen während der Validierungstätigkeit erfolgen. Aufgrund mangelnder Kenntnisse in diesem Bereich, ist eine Risikobewertung unabwendbar. Diese Risikobewertung bildet die Grundlage für den komplexen Validierungsprozess im IT-Bereich [Trantow, Teil 1, 2010].

1.1 GMP-konforme Validierung von mikrobiologischen Methoden und Excel-Anwendungen

Die GMP-Richtlinien (Good Manufacturing Practice) sind vor allem auf die Produktqualität im pharmazeutischen Bereich ausgelegt. In den 60er Jahren wurde das Regelwerk vornehmlich für die Herstellung von tierischen und humanen Medikamenten angewendet. Im Wandel der Zeit wurden die Anhänge an die Herstellung von Arzneimitteln angepasst, mit Schwerpunkt auf die Anforderungen an Räumlichkeiten, Ausrüstung, Hygiene, Dokumentation und Prüfung. Bestandteil dieser Kontrolle im Bereich Qualität, sind Qualifizierungen und Validierungen [EU-GMP-Leitfaden, Anhang 15].

Die folgenden Kapitel beleuchten den Vorgang der Validierung im Bereich der mikrobiologischen Methoden und Excel-Anwendungen. Dabei wird explizit auf die Planung einer Validierung, deren Dokumentation, sowie auf das Risikomanagement eingegangen.

1.1.1 Validierung und Qualifizierung

Vorgänge der Validierung und Qualifizierung bilden eine wichtige Grundlage zur Sicherung der Qualität im Auftragslabor der „*CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH*“.

Entscheidungen, Veränderungen und variable Faktoren, die die Produktqualität beeinflussen können, müssen überprüft werden. Räumlichkeiten, Geräte und Ausrüstungen werden dabei qualifiziert. Verfahren, Methoden und Vorgänge validiert. Beide Überprüfungsmöglichkeiten zeichnen sich durch detaillierte und nachvollziehbare Dokumentation aus. Ziel ist es, sowohl bei der Validierung als auch bei einer Qualifizierung, nachzuweisen, dass alle kritischen Parameter unter Kontrolle gehalten werden. Oft verlaufen Qualifizierung und Validierung Hand in Hand. Ohne qualifizierte Ausrüstung und

Räumlichkeiten kann eine Validierung nicht, unter optimalen standardisierten Bedingungen mit stabilen Parametern, ablaufen. Beide Prozesse müssen regelmäßig durchgeführt werden und unterliegen strengen Vorschriften [PIC/S PI 006-1 / EU-GMP-Leitfaden, Teil 1].

In Abbildung 1 wird der Zusammenhang zwischen Qualifizierung und Validierung optisch dargestellt. Qualifizierungen sind mehrstufige Prozesse, die aus Designqualifizierung („*Dokumentierter Nachweis, dass der Prozess für den Verwendungszweck geeignet ist*“), Installationsqualifizierung („*Dokumentierter Nachweis, dass die Systeme den Herstellerempfehlungen entsprechen*“) und Funktionsqualifizierung („*Dokumentierter Nachweis, dass das System vorschriftgemäß funktioniert*“) zusammengesetzt werden [Die Definition erfolgt nach dem Inspektionsleitfaden PIC/C PI 006-1 und Aide mémoire, 2004].

Die Validierung bezeichnet, nach der SOP CUP ORG 11, einen „*dokumentierten Nachweis, der mit definierter Zuverlässigkeit eine Bewertung von qualitativen Merkmalen eines Produktes ermöglicht*“ [SOP CUP ORG 11].

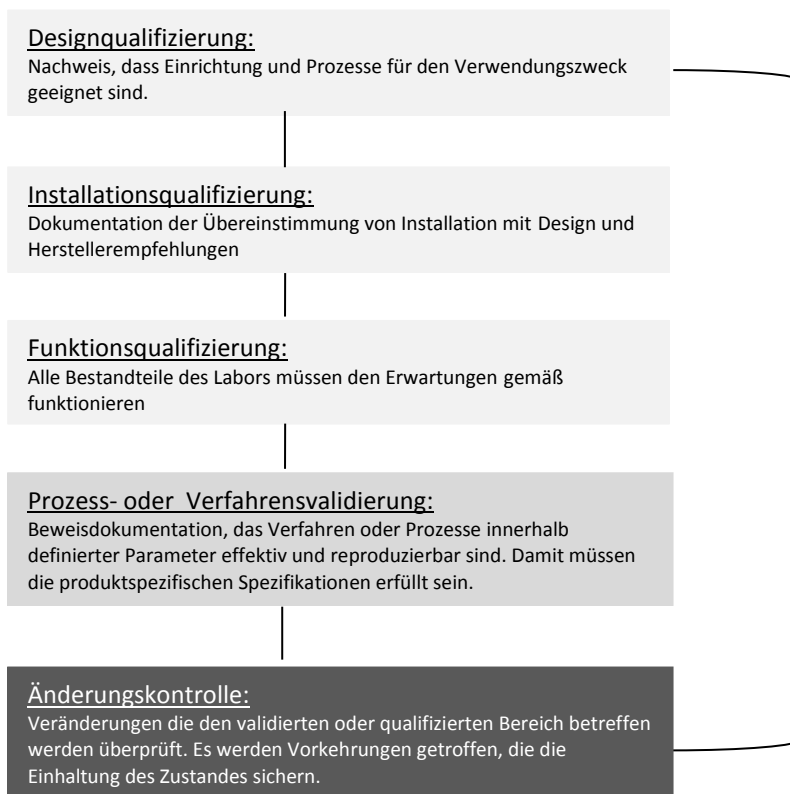


Abbildung 1: Zusammenhang Qualifizierung und Validierung [PIC/S PI 006-1]

Die Abbildung 1 stellt den Zusammenhang zwischen Qualifizierung und Validierung dar. Dabei wird deutlich, dass eine Validierung nur optimal erfolgen kann, wenn alle Qualifizierungen nachweisbare Korrektheit von Ausrüstung und Räumlichkeiten ergeben [PIC/S PI 006-1].

1.1.2 Gesetzliche Rahmenbedingungen und Regularien zur Sicherung der GMP-konformen Durchführung

Validierungen sind an strenge Vorschriften gebunden, die in die Planung und Berichtserstattung einbezogen werden müssen. Die Regularien unterscheiden sich für die zwei bearbeiteten Validierungen, wie im Folgenden dargestellt.

Rechtliche Grundlagen zur Validierung mikrobiologischer Methoden im GMP-pflichten Bereich:

Die Verfahrensgrundlage für die Validierung mikrobiologischer Methoden der untersuchten Prüfmuster, entspricht der aktuellen Version der Ph. Eur. (Europäisches Arzneimittelbuch) Kapitel 2.6.12 (Anweisung für Zählung von Mikroorganismen) bzw. 2.6.13 (Anweisung zum Test auf spezifizierte Mikroorganismen). Grenzwerte für die Proben werden in der aktuellen Version der Ph. Eur. Kapitel 5.1.4 bzw. 5.1.8 niedergeschrieben [Ph. Eur. 2.6.12 und 2.6.13].

Der Annex 15 (Anhang 15) des EU-GMP-Leitfadens befasst sich mit Inhalten betreffend „*Qualifizierung und Validierung*“. Während der Herstellung und Kontrolle von Arzneimitteln werden Prinzipien angewendet, die qualifiziert und validiert werden. Die Validierung dient der Kontrolle kritischer Aspekte. Eine ausführliche Dokumentation des Ablaufs und der Ergebnisse sind gefordert. Der EU-GMP-Leitfaden Annex 15 liegt als Grundlage für die Durchführung der Validierung vor. Dabei werden alle gesetzlichen Gegebenheiten für die Aufstellung der Planung und Berichtserstattung festgelegt [EU-GMP-Leitfaden, Anhang 15].

Aide mémoire ist der deutsche Inspektionsleitfaden für „*Qualifizierungen und Validierungen in pharmazeutischer Herstellung und Qualitätskontrolle*“. Er beinhaltet die Grundprinzipien und Begriffe die im Zusammenhang mit der Validierung und Qualifizierung stehen [Aide mémoire, 2004].

Die PIC/S PI 006-1 (Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme) enthalten die Empfehlungen zur Erstellung eines Validierungsmasterplans, Installations- und Funktionsqualifizierungsvorschriften, Vorschriften zur Validierung nicht steriler Prozesse, sowie Reinigungsvalidierungen [PIC/S PI 006-1].

Zudem wird die Vorschrift SOP CUP ORG 11 „*Validierung mikrobiologischer Methoden*“ zur Rate gezogen. Diese ist eine Standardarbeitsanweisung und beinhaltet die Grundlagen zur Erstellung des Validierungsplans und –berichts, auf Basis der aufgeführten Gesetzgebungen [SOP CUP ORG 11].

Rechtliche Grundlagen zur Validierung computergestützter Systeme im GMP-pflichten Bereich:

Die Regularien zur GMP-konformen Durchführung der Excel-Validierung beruhen auf folgenden Richtlinien:

Es wird die Validierung eines Excel-Arbeitsblatts zur „*mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika*“ durchgeführt. Dazu wird die Standardarbeitsanweisung SOP CUP GMP MIB 51 („*Mikrobielle Wertbestimmung von Gentamycinsulfat*“) herangezogen, welche die praktischen Aspekte zur Methode enthält und die Formeln zur Berechnung zusammenfasst, die auf Grundlage der Ph. Eur. Kapitel 5.3 anzuwenden sind [SOP CUP GMP MIB 51].

Die Ph. Eur. Kapitel 5.3 beschäftigt sich mit der „*Statistischen Auswertung der Ergebnisse biologischer Wertbestimmungen und Reinheitsprüfungen*“. In diesem Kapitel des europäischen Arzneimittelbuchs werden die Elemente zur Berechnung des Steigungsverhältnismodells aufgelistet [Ph. Eur. 5.3].

Der Annex 11 (Anhang 11) des EU-GMP-Leitfadens wird als gesetzliche Grundlage für die ordnungsgemäße Durchführung der Excel-Validierung herangezogen. Dieser Anhang beschäftigt sich mit „*Computergestützten Systemen*“. In einer Welt in der die technische Entwicklung wöchentliche Fortschritte macht, müssen Regularien für die Anwendung computergestützter Systeme aufgestellt werden, um allgemein gültige Anforderungen zu schaffen. Heute sind diese Systeme Bestandteil der GMP-pflichtigen Vorgänge. Bei den Systemen handelt es sich um eine Kombination aus Software- und Hardwarekomponenten, die nur gemeinsam den spezifischen Funktionen nachkommen können. Dabei werden jegliche Anwendungen validiert und die Infrastruktur qualifiziert. Ersetzt die computerisierte Anwendung einen manuellen Prozess, müssen Reduktionen der „*Produktqualität, Produktkontrolle und Qualitätssicherheit*“ vermieden werden. Der Annex 11 fordert, dass sich das „*Gesamtrisiko nicht erhöhen darf*“ [EU-GMP-Leitfaden, Anhang 11].

1.1.3 Risikoanalyse nach der FMEA-Methode

Zur Erstellung der Risikoanalyse, für die Validierung mikrobiologischer Methoden und des Excel-Arbeitsblatts, wird auf die FMEA-Methode zurückgegriffen. Es handelt sich um eine „*methodische Vorgehensweise*“, die die kritischen Faktoren eines Prozesses analysiert. FMEA steht für „*Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse*“. Diese bezieht sich auf ein analytisches Verfahren im Bereich Qualitätsmanagement, zur Erkennung von potentiellen Schwachstellen. Es wird eine vorausschauende Fehlererkennung durchgeführt, indem potentielle Fehlerquellen und mögliche Risiken ausgestellt werden. Als Bewertungsmaßstab liegt dieser Methode eine Fünfpunktabstufung zu Grunde. Nachfolgend werden die potentiellen Fehlerquellen bei der Validierung mikrobiologischer Methoden und computergestützter Systeme aufgeführt, Maßnahmen in die Durchführung eingebunden und Spezifikationen festgelegt [Aide mémoire, 2004].

Das Risikomanagement für Validierungen mikrobiologischer Methoden im GMP-pflichtigen Bereich legt sich auf folgende Punkte fest [SOP CUP VALP 241/ SOP CUP VALP 231/ SOP CUP VALP 244]:

- Mikrobielle Eigenschaft und Aggregatzustand der Probe, welche Auswirkungen auf die Löslichkeit des Produktes oder den Nachweis der Mikroorganismen haben können
- Schädigung des Organismus durch äußere Einflüsse (Luftfeuchte, Temperatur, Reagenzien)
- Unsterile Nähr- und Selektivmedien, die das Ergebnisse aufgrund einer Kontamination verfälschen
- Defekte Geräte, liefern keine stabilen Bedingungen
- Grundkontamination des Produkts (Mikroorganismen lassen sich nicht eindeutig nachweisen)
- Lagerungsschwierigkeiten, die Auswirkung auf den Stoffwechsel der Testorganismen haben

Das Risikomanagement für Validierungen computergestützter Systeme im GMP-pflichtigen Bereich legt sich auf folgende Schwerpunkte fest:

Jeder Fehler der Excel-Anwendung bildet einen Fehler bei der Ergebniswiedergabe. Ohne passende Kenntnisse kann die Kritikalität des Systems nicht erkannt werden [Trantow et al, Teil 1, 2010].

Es folgt eine Auflistung der, mit dem MS-Excel Programm verbundenen, Risiken [Trantow et al, Teil 1, 2010]:

- Produktqualität / -sicherheit
- Datensicherung
- Datenintegrität
- Genauigkeits- und Rundungsproblematik
- Beschränkung der Zahlenverarbeitung auf 16 Ziffern
- Ober- und Untergrenze müssen bei der Installation berücksichtigt werden
- Die Speicherung ist nur bedingt kontrollierbar
- Formelfehler
- Fehlerhafte Zellenbezüge
- Zu komplexe Excel-Anwendungen können nicht ausreichend beherrscht werden
- Veraltete Versionen können zu Fehlern in der Durchführung führen
- Durch Anwender hervorgerufene Fehler

Sobald die Risiken in einem Fünfpunkteprogramm bewertet wurden und die Validierung erfolgt ist, muss der Standard den GMP-Anforderungen dauerhaft gerecht werden [Trantow et al, Teil 1, 2010].

Allgemeine Kontrollmaßnahmen beziehen sich auf folgende Maßnahmen [Trantow et al, Teil 3, 2010]:

- Formel sollten geschützt werden
- Die Richtigkeit des Systems muss regelmäßig kontrolliert und die Version aktuell gehalten werden
- Schutzmaßnahmen für die Eingabe von Daten des falschen Typs

Der fokussierte Überblick, über die Risiken und Maßnahmen, bilden die Voraussetzung für die mögliche Umsetzung in der Routine [Trantow et al, Teil 3, 2010].

1.1.4 Planung, Durchführung und Auswertung von Validierungen

Validierungen bilden die Grundvoraussetzung für die Einführung neuer Verfahren in der Routinearbeit der „CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH“. Die Durchführung unterliegt den Vorschriften des EU-GMP-Leitfadens und der Ph. Eur. (Europäisches Arzneimittelbuch). Die Einhaltung gesetzlicher Forderungen steht im Fokus. Schwerpunkt liegt in der Nutzung des Risikomanagements und den sich darauf ergebenden Vorteilen [ICH, Q9].

In Abbildung 2 wird der allgemeine Ablauf einer Validierung schemenhaft dargestellt. Dabei stehen der Validierungsplan und dessen Freigabe an erster Stelle. Nach Bestätigung dieses Dokuments kann die Validierung stattfinden, deren Ergebnisse in einem Bericht festgehalten werden [SOP CUP ORG 11].

Durchführung Validierung

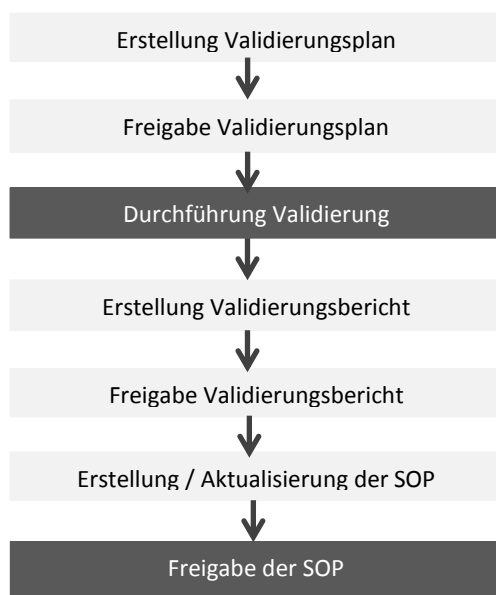


Abbildung 2: Durchführung Validierung Schema [SOP CUP ORG 11]

In der Abbildung wird der Vorgang der Validierung schematisch dargestellt. Am Anfang steht der Validierungsplan, der Freigegeben werden müssen. Erst dann erfolgt die Durchführung der Validierung mit anschließender Berichtsanzfertigung [SOP CUP ORG 11].

Validierungen verlangen eine sorgfältige Vorbereitung und Planung der Einzelschritte des Verfahrens. Die in Abbildung 2 dargestellten Dokumente (Validierungsplan und Validierungsbericht) werden im Folgenden detailliert beschrieben.

Validierungsplan

Der Validierungsplan stellt das Herangehen an die Aufgabenstellung in allen Details dar und bietet einen Überblick über den Vorgang, die Struktur, inhaltliche Schwerpunkte und Durchführung [PIC/S PI 006-1].

Zusammengefasst enthält er folgende Aspekte [Gemäß der Aide mémoire, 2004]:

- Beschreibung der Kenngrößen und Identifikation des Verfahrens
- Probematerialbeschreibung
- Spezifikationen
- Auflistung von Geräten, Teststämmen und Nährmedien
- Verfahrensbeschreibung einschließlich Risikoanalyse
- Messprinzipien bzw. Berechnungen
- Akzeptanzkriterien
- Umfang des Validierungsberichts wird vorgeschrieben

Die Validierungspläne für die Prüfmuster 1, 2 und 3 werden in der SOP CUP VALP 241, SOP CUP VALP 231 und SOP CUP VALP 244 (Standardarbeitsanweisungen der CUP GmbH für den Validierungsplan) geregelt und bilden die Grundlage der Verfahrensdurchführung. Erst nach Freigabe durch die QA/QS (Qualitätssicherung) und Inkraftsetzung durch die Geschäftsführung, erfolgte die Durchführung der Validierung. Die Form der Dokumente entspricht der Norm der „CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH“ [Aide mémoire, 2004].

Validierungsbericht:

Ein Validierungsbericht wird nach den Vorgaben des Validierungsplans erstellt. Nachträgliche Änderungen müssen beschrieben und begründet werden. Die Ergebnisse aus dem Validierungsprotokoll (betriebsinternes Dokument zur Protokollierung der Rohdaten) werden aufgeführt und bewertet. Der Validierungsbericht beinhaltet folgende Punkte [Aide mémoire, 2004]:

- Name des Bearbeitenden, Datum der Erstellung, Zeitintervall der Durchführung
- Berechnungen
- Angabe der Ergebnisse und Bewertung
- Genehmigung erteilt durch die Laborleitung, Freigabe durch die QA/QS und Inkraftsetzung durch Geschäftsführung

In den Dokumenten SOP CUP VALB 241, SOP CUP VALB 231 und SOP CUP VALB 244 (Standardarbeitsanweisungen der CUP GmbH für den Validierungsbericht) wird der Validierungsbericht geregelt. Die Dokumentation von Ergebnissen und Auswertung besitzt bei jeder Validierung besondere Priorität.

1.2 Elemente einer Validierung

Jede Validierung setzt sich aus verschiedenen Elementen zusammen. Validierungen mikrobiologischer Methoden greifen auf analytische Kenngrößen zurück. Validierungen computergestützter Systeme verwenden Bestandteile der statistischen Kenngrößen. Hier liegt der bedeutendste Unterschied zwischen den Verfahren in der Biologie und Bioinformatik [Aide mémoire, 2004].

Im Folgenden werden analytische und statistische Kenngrößen dargestellt und definiert. Bei den statistischen Berechnungselementen wird auf Formeln und Funktionen, gemäß den Richtlinien der Ph. Eur. Kapitel 5.3, näher eingegangen.

1.2.1 Analytische Kenngrößen zur Validierung mikrobiologischer Methoden

Die nachstehenden Kenngrößen sind die zu testenden Faktoren, während der Validierung mikrobiologischer Methoden.

Richtigkeit:

„Die Richtigkeit beschreibt das Maß der Übereinstimmung eines Ergebnisses mit dem entsprechenden wahren Wert“ [SOP CUP ORG 11].

Dabei werden Referenzstämme mit definierten Keimzahlen verwendet. Es erfolgt eine Unterscheidung der Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung [Metas, 2005].

Methode zur quantitativen Keimbestimmung nach Ph. Eur. 2.6.12.:

Formel 1: Wiederfindungsrate [Ph. Eur. 2.6.12]

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Mittelwert Probe}}{\text{Mittelwert Kontrolle}} * 100$$

Die Wiederfindungsrate aller verwendeten Teststämme muss mindestens 50 % betragen. Die Berechnung kann der Formel 1 entnommen werden.

Methode zur qualitativen Bestimmung von spezifischen Keimen nach Ph. Eur. 2.6.13.:

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Produkt- und Kontrollansätze müssen gleich sein.

Präzision und Wiederholungspräzision:

„Die Präzision gibt an, wie gut die Einzelwerte einer Serie von Bestimmungen des gleichen Musters übereinstimmen (Streuung)“ [SOP CUP ORG 11].

Das heißt die Abweichung von Mittelwert wird beschrieben. Man unterteilt die Präzision in die Wiederholungspräzision, wobei ein Vergleich der Resultate unter selbigen Bedingungen stattfindet. Die Definition lautet wie folgt: *„Die Wiederholungspräzision ist ein Maß für die Übereinstimmung von Resultaten aus mehrfach durchgeführten Tests“* [SOP CUP ORG 11].

Methode zur quantitativen Keimzahlbestimmung nach Ph. Eur. 2.6.12.:**Formel 2: Faktor Präzision [Ph. Eur. 2.6.12]**

$$\text{Faktor Präzision} = \frac{\text{Anzahl der KBE (koloniebildende Einheiten) der stärker bewachsenen Platte}}{\text{Anzahl der KBE (koloniebildende Einheiten) der schwächer bewachsenen Platte}}$$

Dabei darf der Faktor nicht größer als 2 sein. Der Formel 2 kann die entsprechende Berechnung entnommen werden.

Wiederholungspräzision: Die Parameter Richtigkeit, Präzision und Selektivität müssen sowohl bei Test 1 als auch bei Test 2 (Wiederholungsprüfung) übereinstimmen.

Methode zur qualitativen Bestimmung von spezifischen Keimen nach Ph. Eur. 2.6.13.:

Beide Ergebnisse der Prüfung müssen das gleiche Resultat erbringen.

Selektivität:

„Die Selektivität ist die Fähigkeit der Methode, die zu messende Komponente eindeutig in Gegenwart des Produktes zu erfassen“ [SOP CUP ORG 11].

Methode zur quantitativen Keimzahlbestimmung nach Ph. Eur. 2.6.12.:

Der berechnete Wert der Wiederfindungsrate der verwendeten Teststämme muss mindestens bei 50 % liegen. Die Ergebnisse müssen den Anforderungen der „Richtigkeit“ entsprechen. Im Anschluss erfolgt die Reidentifizierung der Testorganismen [SOP CUP ORG 11].

Methode zur qualitativen Bestimmung von spezifischen Keimen nach Ph. Eur. 2.6.13.:

Die Resultate der Untersuchungen müssen zum gleichen Ergebnis führen. Es findet ebenfalls eine Reidentifizierung der Testorganismen statt [SOP CUP ORG 11].

Robustheit:

„Die Robustheit ist ein Maß dafür, dass kleine Veränderungen in den Parametern der Methode das Ergebnis nicht beeinflusst“ [SOP CUP ORG 11].

Die Robustheit wird als Indikator für Zuverlässigkeit einer Methode eingesetzt. Mikroorganismen liegen in pharmazeutischen Produkten häufig geschädigt vor, da es zu Änderungen des physiologischen Stoffwechsels kommt. Während des Robustheitstests werden diese geschädigten Mikroorganismen zum Nachweis für Kontaminaten verwendet. Die Resultate müssen den Anforderungen der Richtigkeit folgen. Veränderungen, die Einfluss auf die Robustheit haben können, beziehen sich vor allem auf [SOP CUP VALP 241/ SOP CUP VALP 231/ SOP CUP VALP 244]:

- Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit
- Lösungsmittel und Reagenzien
- Inkubationsbedingungen und Stoffwechseleränderungen
- Änderungen der Zusammensetzung zwischen Probe und Reagenz [SOP CUP ORG 11].

Bestimmungsgrenze (LOQ):

Die kleinste Konzentration der zu messenden Substanz wird als Bestimmungsgrenze angesehen. Diese kann mit einer definierten Präzision quantitativ bestimmt werden. Sowohl für die qualitative als auch für die quantitative Untersuchung werden Referenzstämme mit ca. 10 KBE / Ansatz verwendet. Die Resultate müssen ebenfalls den Anforderungen der Richtigkeit nachkommen [SOP CUP ORG 11].

1.2.2 Statistische Kenngrößen zur Validierung computergestützter Systeme

Folgende Berechnungen werden als Grundlage für die Validierung des Excel-Arbeitsblatts herangezogen. Die Berechnungen liegen dem Steigungsverhältnismodell entsprechend Kapitel 5.3 der Ph. Eur. zu Grunde. Zudem befindet sich eine Auflistung der Variablen mit Definition im Anhang Teil 2 und im Symbolverzeichnis.

Die Validierung erfolgt auf Basis der Berechnung zur „*mikrobiellen Wertbestimmung für Gentamycinsulfat*“, gemäß der Standardarbeitsanweisung SOP CUP MP MIB 51. Die Methode hat das Ziel den Gehalt von Antibiotika in einer unbekannt Probe zu ermitteln. Dazu erfolgt der Vergleich des Wachstums eines Testkeims in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen (Dosis) des Antibiotikums. Die Bestimmung findet über die Ermittlung der optischen Dichte (Extinktion) statt. Verglichen wird der Standard (Gehalt Antibiotika bekannt) mit der Probe (Gehalt Antibiotika unbekannt) [SOP CUP GMP MIB 51].

Grundlage der Berechnung: Steigungsverhältnismodell

Die Berechnungen beruhen auf dem „*Steigungsverhältnismodell*“ für die mikrobiologische Wertbestimmung, in dem die Konzentration der Probe unter der Konzentration des Standards liegt. Das Steigungsverhältnismodell bildet eine lineare Funktion zwischen Dosis und Wirkung (Dosis-Wirkungs-Diagramm). Die Bildung einer Geraden ist die erste einzuhaltende Bedingung. Zudem müssen Standardsubstanz und Testsubstanz (Probe) die y-Achse in einem gemeinsamen Punkt schneiden [Ph. Eur. 5.3].

Abbildung 3 stellt skizzenhaft das Dosis-Wirkungs-Diagramm dar. Auf der x-Achse wird die Dosis und auf der y-Achse die Wirkung aufgetragen. Die Wirkungswerte werden als Punkte auf den Geraden dargestellt. Die Geraden stellen die berechnete Beziehung zwischen Dosis und Wirkung der Standard- und Testsubstanz grafisch dar. Dabei gilt die Annahme, dass die Nulldosis der Schnittpunkt ist. Grundlage bildet die Hypothese, dass vermutete Wirkung und wahre Wirkung nahe beieinander liegen und die Verdünnungen zwischen Standardsubstanz und Testsubstanz gleich sind [Ph. Eur. 5.3].

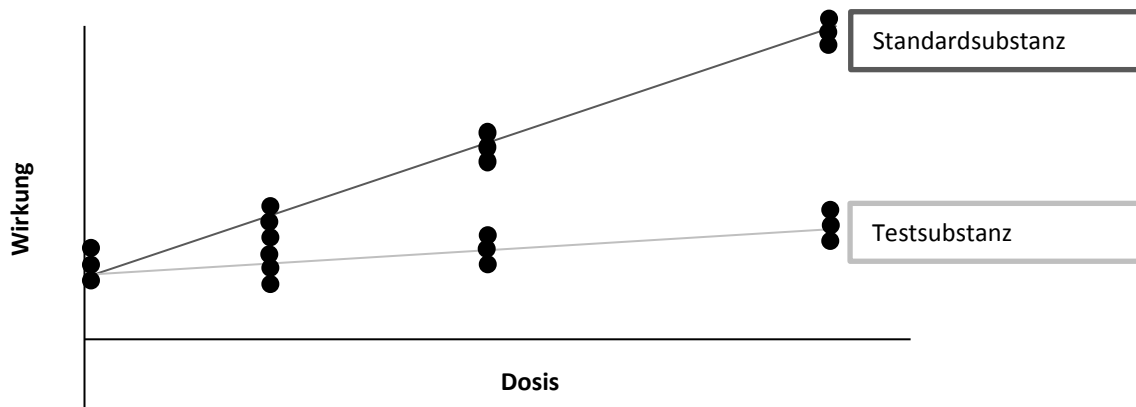


Abbildung 3: Steigungsverhältnismodell als Dosis-Wirkungs-Diagramm [Ph. Eur. 5.3]

Das Steigungsverhältnismodell zeigt auf der x-Achse die Dosis mit steigender Konzentration. Die y-Achse gibt Auskunft über die Wirkung. Die schwarzen Punkte stellen die Wirkungswerte jeder Behandlung dar [Ph. Eur. 5.3].

Berechnung der Extinktion und Wirkung unter Einbezug des Blindwertes (BW) [Ph. Eur. 5.3]:

Zur Berechnung der Wirkung unter Einbezug des Blindwertes (Negativkontrolle aus Bakteriensuspension und Puffer zum Zeitpunkt 0 ohne Gentamycinsulfat) tritt der „hd-Plan“ in Kraft. Der hd-Plan wird angewendet, wenn drei Dosen (Konzentrationen) und zwei Blindwerte je Behandlung bevorzugt eingesetzt werden. Theoretisch liegt dieser Wert bei null. Durch zufällige und systematische Fehlerquellen weicht dieser jedoch von diesem Nennwert ab. Die Gleichung zur Berechnung wird in Formel 3 dargestellt [Ph. Eur. 5.3].

Formel 3: Wirkung [Ph. Eur. 5.3]

$$\text{Wirkung} = \frac{\text{Mittelwert der Positivkontrollen} - \text{Blindwert}}{\text{Mittelwert der 3 Parallelproben} - \text{Blindwert}}$$

Varianzanalyse [Ph. Eur. 5.3]:

Die Varianzanalyse ist ein statistisches Verfahren zur Bestimmung der Signifikanz der Werte einer Variablen. Für das Steigungsverhältnismodell nach dem hd-Plan gemäß den Richtlinien der Ph. Eur. 5.3 werden die Formeln 4 bis 13 verwendet [SOP CUP GMP MIB 51].

Formel 4: Ermittlung Gesamtsumme je Substanz (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]

$$P_s = S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_x$$

Formel 5: Ermittlung Lineares Produkt (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]

$$L_s = 1 \cdot S_1 + 2 \cdot S_2 + 3 \cdot S_3 + \dots + x \cdot S_x$$

Formel 6: Ermittlung Achsenabschnitt (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]

$$a_s = (4 \cdot d + 2) \cdot P_s - 6 \cdot L_s$$

Formel 7: Ermittlung Steigung (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]

$$b_s = 2 \cdot L_s - (d + 1) \cdot P_s$$

Formel 8: Ermittlung Behandlungswert (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]

$$G_s = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + \dots$$

Formel 9: Ermittlung Nichtlinearität (am Beispiel: Standard (S)) [Ph. Eur. 5.3]

$$J_s = G_s - (P_s^2/d) - (3 * b_s^2/d^3 - d)$$

Formel 10: Berechnung von H_b zur Ermittlung der Varianzanalyse [Ph. Eur. 5.3]

$$H_b = \frac{n * h * d^2 - n * h * d}{h * d^2 - h * d + 4 * d + 2}$$

Formel 11: Berechnung H_i zur Ermittlung der Varianzanalyse [Ph. Eur. 5.3]

$$H_i = \frac{n}{4d^3 - 2d^2 - 2 * d}$$

Formel 12: Berechnung von a (Achsenabschnitt) [Ph. Eur. 5.3]

$$a = a_s + a_t / (h * (d^2 - d))$$

Formel 13: Berechnung von K (Korrekturterm) [Ph. Eur. 5.3]

$$K = \frac{n * (P_s + P_t)^2}{h * d}$$

Berechnung der Summe der Abweichungsquadrate und Freiheitsgrade (Siehe Tabelle 1)

[Ph. Eur. 5.3]:

Formel 14: Regression SS_{reg} [Ph. Eur. 5.3]

$$SS_{reg} = SS_{beh} - SS_{schn} - SS_{lin}$$

Formel 15: Schnittpunkt SS_{schn} [Ph. Eur. 5.3]

$$SS_{schn} = H_i * ((a_s^2 + a_t^2) - h (d^2 - d)^2 * a^2)$$

Formel 16: Nichtlinearität SS_{lin} [Ph. Eur. 5.3]

$$SS_{lin} = n (J_s + J_T)$$

Formel 17: Behandlung SS_{beh} [Ph. Eur. 5.3]

$$SS_{beh} = n * (G_s + G_T) - K$$

Tabelle 1 fasst die Freiheitsgrade und Gleichungen für die Formeln 14 bis 17 zusammen.

Tabelle 1: Freiheitsgrade für SS_{reg}, SS_{schn}, SS_{lin}, SS_{beh} [Ph. Eur. 5.3]

Varianzursache	Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate
Regression	h	$SS_{reg} = SS_{beh} - SS_{schn} - SS_{lin}$
Schnittpunkt	h-1	$SS_{schn} = H_i * ((a_s^2 + a_t^2) - h (d^2 - d)^2 * a^2)$
Nichtlinearität	h*(d-2)	$SS_{lin} = n (J_s + J_T)$
Behandlungen	h*d -1	$SS_{beh} = n * (G_s + G_T) - K$

Die Bedeutung der Varianzursachen, Freiheitsgrade und Abweichungsquadrate bildet kein Bestandteil dieser Arbeit und werden nicht weiter ausgeführt. Lediglich die Formeln werden für die Aufstellung der Excel-Arbeitsblätter verwendet und angepasst.

Von der Gesamtvariation der Wirkungswerte werden folgende Variationsursachen abgezogen, um den Restfehler zu berechnen (Siehe Formel 18 und 19).

Formel 18: Restfehler SS_{rest} [Ph. Eur. 5.3]

$$SS_{rest} = SS_{ges} - SS_{beh}$$

Formel 19: Gesamt SS_{ges} [Ph. Eur. 5.3]

$$SS_{ges} = \sum (y - y')^2$$

In Tabelle 2 werden die Formeln 18 und 19 zusammengefasst und den dazugehörigen Freiheitsgraden zugeordnet.

Tabelle 2: Restfehler [Ph. Eur. 5.3]

Varianzursache	Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate
Restfehler	$(h*d) * (n-1)$	$SS_{rest} = SS_{ges} - SS_{beh}$
Gesamt	$(n*h*d)-1$	$SS_{ges} = \sum (y - y')^2$

Die Signifikanz der Werte wird anhand des F-Tests überprüft. Dabei wird beurteilt ob sich die Standardabweichungen zweier Messwertreihen signifikant (bezeichnend) unterscheiden. Signifikanz von Variablen bedeutet, dass deren Auftreten nicht zufällig ist [Ph. Eur. 5.3].

Prüfung auf Gültigkeit [Ph. Eur. 5.3]:

Ergebnisse der Wertbestimmung sind statistisch valide, wenn die Varianzanalyse folgende Bedingungen erfüllt [SOP CUP GMP MIB 51]:

A: Streuung aufgrund der Blindwerte ist nicht signifikant (entfällt bei hd-Plan)

B: Streuung bezüglich des Achsenabschnittes ist nicht signifikant

C: Streuung der Nichtlinearität ist nicht signifikant [Ph. Eur. 5.3]

Die Gültigkeit ist dann erfüllt, sobald B und C erfüllt sind. Das heißt die errechneten Werte sind größer als der in der Tabelle festgehaltene t-Wert. Gemäß der Ph. Eur. Kapitel 5.3 entspricht dieser einem Wert von 2,086 für $p=0,05$ (Wahrscheinlichkeit für Signifikanz) und einem Freiheitsgrad (FG) von 20 für den Restfehler. Der t-Test gibt, gleich dem F-Test, Auskunft über die Signifikanz ausgewählter Werte. Der mathematische Hintergrund des t-Tests und F-Tests bildet keinen Bestandteil dieser Arbeit und wird nicht weiter beleuchtet [Ph. Eur. 5.3].

Berechnung Wirkungsverhältnis mit Vertrauensgrenze [Ph. Eur. 5.3]:

In den Formeln 20 bis 27 werden die Gleichungen zur Berechnung des Wirkungsverhältnisses mit Vertrauensintervall aufgeführt. Das Vertrauensintervall weist auf die „Präzision der Lage eines Parameters“ hin. Es wird festgelegt in welchem Bereich die wahren Werte (Messwert abzüglich systematischen und zufälligen Messfehler) liegen [ULR-2].

Formel 20: Berechnung gemeinsamer Achsenabschnitte [Ph. Eur. 5.3]

$$a' = a$$

Formel 21: Berechnung Steigung (am Beispiel der Referenzsubstanz) [Ph. Eur. 5.3]

$$b' = (6 * L_s - 3 * d * (d+1) * a') / (2 * d^3 + 3 * d^2 + d)$$

Zur Berechnung der Steigung für die Testsubstanz wird L_s durch L_t ersetzt.

Formel 22: Berechnung Wirkungsverhältnis [Ph. Eur. 5.3]

$$R'_T = b'_{\text{Testsubstanz}} / b'_{\text{Standardssubstanz}}$$

Das Vertrauensintervall wird nach folgenden Formeln berechnet:

Formel 23: Berechnung Vertrauensintervall [Ph. Eur. 5.3]

$$= C * R'_T * K \pm \text{Wurzel} ((C-1) * (C * R'^2_T + 1) + K' * (K - 2 * C * R'_T))$$

Formel 24: Berechnung Variationskoeffizient V1 [Ph. Eur. 5.3]

$$V1 = (6 / (n * d * (2 * d + 1))) * (((1/d + 1) + (3/h * (d-1))))$$

Formel 25: Berechnung Vertrauenskoeffizient V2 [Ph. Eur. 5.3]

$$V2 = 3 * (d + 1) / (3 * (d + 1) + h * (d - 1))$$

$V1$ und $V2$ sind die Varianzkoeffizienten für die Berechnung des Vertrauensintervalls. Sie sind abhängig von der Varianz und der Kovarianz des Zählers und Nenners des Wirkverhältnisses (R'_T) [Ph. Eur. 5.3].

Formel 26: Berechnung von C (statistische Größe zur Berechnung des Vertrauensintervalls) [Ph. Eur. 5.3]

$$C = bs^2 / (bs^2 - A^2 * R^2 * V1)$$

Formel 27: Berechnung des Korrekturterms K' [Ph. Eur. 5.3]

$$K' = (C - 1) * V2$$

Die Definitionen der Variablen können dem Symbolverzeichnis entnommen oder mit der Tabelle H im Anhang Teil 2 verglichen werden. Die Bedeutung der Formeln wird nicht Bestandteil der Arbeit sein. Die Formeln entstammen der Ph. Eur. 5.3 und werden entsprechend der Arbeitsmappen des Excel-Arbeitsblatts angepasst, um den Vorgaben zu entsprechen.

Die Software zur Erstellung der Arbeitsmappen: MS-Excel

Die Software in dem das Arbeitsblatt erstellt wurde, bezieht sich auf Microsoft Excel 2010. Bei Microsoft Excel handelt es sich um das populärste Programm zur Kalkulation von Tabellen. Excel macht umfangreiche Berechnungen mit Formeln und Funktionen möglich, welche sich in Diagrammen oder Tabellen problemlos darstellen lassen. Tabellen oder Inhalte können individuell gesperrt oder freigegeben werden. Ein Excel-Arbeitsblatt besteht aus einer Auflistung von Spalten und Zellen [URL-3]. Diese können über „Zellenbezugssysteme“ aufgerufen werden, indem die Zellen und Spalten eindeutig durch Zahlen und Buchstaben benannt werden. Ein Programmpunkt sind „relative“ (z.B. B30) und „absolute“ (z.B. \$B\$30) Bezugssysteme, die das Übertragen der Gleichung auf weitere Zellen möglich machen. Es ist möglich statt der Werte, die Formeln in den Tabellen anzeigen zu lassen oder die Werte auf ein gewisses Format festzulegen (Datum, Währung, Zahl), um Eingabefehler zu vermeiden. Excel besitzt außerdem eine Vielzahl von fertigen Funktionen. Die „Enddatei“ wird als Vorlage im „xlsx“-Format (Excel-Spreadsheet) abgespeichert [URL-4].



Teil 1

Frau Daniela Taraba

**Validierung mikrobiologischer
Methoden anhand dreier
Prüfmuster im GMP-pflichtigen
Bereich**

Mittweida, 2013

2 ZIELSTELLUNG TEIL 1

Zur besseren Übersicht werden die nachfolgenden Kapitel in zwei Teile gegliedert. Der erste Teil der Arbeit stellt den Validierungsvorgang mikrobiologischer Methoden anhand dreier Prüfmuster dar. Teil 2 beleuchtet die computergestützten Validierungen in Form einer Excel-Validierung für die „*mikrobielle Wertbestimmung von Antibiotika*“.

Ziel der Bachelorarbeit im Teil 1, angefertigt in Kooperation mit der „*CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH*“, ist die Entwicklung einer Probenvorbereitung und Optimierung der Methode mit anschließender Validierung, für die quantitativen und qualitativen Untersuchungen anhand dreier Prüfmuster (Arzneimittel) verschiedener Zusammensetzung und Beschaffenheit. Die Validierung dient dabei der Überprüfung und Bewertung der Qualität der Methode im GMP-pflichtigen Bereich. Richtigkeit und Präzision des Verfahrens liefern dabei Informationen über mögliche Probleme, die vor Aufnahme der Methode in den Routinebetrieb, untersucht werden müssen. Dazu werden die Gesamtkeimzahlen bestimmt (TAMC/TYMC) und die spezifischen Mikroorganismen, den Spezifikationen des Produktes entsprechend, validiert. Untersucht werden die folgenden Parameter:

- Richtigkeit
- Präzision
- Wiederholpräzision
- Robustheit (RoRef)
- Selektivität
- Bestimmungsgrenze (LOQ)

3 MATERIAL

3.1 Geräte und Materialien

Folgende Geräte werden für die mikrobiologische Validierung eingesetzt:

Brutschrank	Binder, Deutschland
Dampfsterilisator	H+P Deutschland, Deutschland
Dampfsterilisator	Tuttnauer, USA
Heißluftsterilisator	Binder, Deutschland
Koloniezählgerät	Hama, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Kojair, Finnland
Waage	Sartorius, Deutschland
Wasserbad	Medingen WZZ, Deutschland

Folgende Materialien werden für die mikrobiologische Validierung verwendet:

Deckgläschen
 Kulturröhrchen
 Objektträger
 Petrischalen
 Pipetten
 Zählstift
 Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)

3.2 Teststämme

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 (Glycerinkultur)

Bacillus subtilis ATCC 6633 (Glycerinkultur)

Candida albicans ATCC 10231

Escherichia coli ATCC 8739

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Staphylococcus aureus ATCC 6538

3.3 Medien

Flüssigmedien / Bouillons:

Acetamid-Bouillon
CASO-Bouillon (1 fache CASO-B.)
CHB-Medium
MacConkey Bouillon
Mossel-Bouillon
NCPB (1 fache NCPB-Lösung)
NCPB + Tween 80 (10 % Lösung)
Tryptophan-Bouillon
RVS-Bouillon
STAPH-Medium

Festmedien / Agar:

BPLS-Agar
CASO-Agar
Cetrimid-Agar
MacConkey Agar
MKP-Agar
Sabouraud-Agar
Sabouraud mit Chloramphenicol Agar.
XLD-Agar

Reagenzien:

Immersionsöl
James-Reagenz
Nessler-Reagenz
Paraffinöl
Physiologische Kochsalzlösung
TDA-Reagenz
Tween 80
VP 1 und VP 2 – Reagenzien

API-Streifen:

API 50 CHB für *Bacillus subtilis*
API 20 E für *Escherichia coli*
API Staph für *Staphylococcus aureus*

4 DURCHFÜHRUNG

4.1 Regularien

Folgende Regularien werden bei der Validierung mikrobiologischer Methoden einbezogen:

- **SOP CUP GMP MIB 06** „Herstellung von Nährmedien“
- **SOP CUP GMP MIB 08** „Identifizierung von Referenzstämmen und unbekanntem Mikroorganismen“
- **SOP CUP GMP MIB 10** „Qualitätskontrolle der Nährmedien“
- **SOP CUP GMP MIB 44** „Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Keimgehaltsbestimmung (Ph. Eur. 2.6.12)“
- **SOP CUP GMP MIB 45** „Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Nachweis spezifischer Mikroorganismen (Ph. Eur. 2.6.13)“
- **Ph. Eur. 2.6.31** „Microbiological examination of herbal medicinal products for oral use under revision“
- **SOP CUP ORG 11** „Validierung mikrobiologischer Methoden“

4.2 Produktspezifische Spezifikationen

Im folgenden Text werden die Proben mit Prüfmuster 1, 2 und 3 benannt. Bei den Prüfmustern handelt es sich um Arzneimittel, die in verschiedenen Bereichen (Siehe Tabelle 3 – 5) angewendet werden und somit individuelle Prüfanforderungen aufweisen.

Für jede Produktgruppe liegen definierte Spezifikationen vor, die mit den Ergebnissen verglichen werden und die Durchführung beeinflussen. Grenzwerte oder Spezifikationen beschreiben das entsprechende Prüfmuster. Dabei werden Merkmale und Eigenschaften des Produkts charakterisiert und entsprechend geprüft. Für die Methode wird der Grenzwert als Referenz angesehen. Die Ergebnisse dürfen maximal um den Faktor Präzision 2,0 von denen der Kontrolle abweichen. Dieser Wert ist einer Wiederfindungsrate, gemäß des Parameters Richtigkeit, von 50 % gleichgesetzt. Die Tabellen 3 bis 5 geben die Grenzwerte für die jeweiligen Prüfmuster an [SOP CUP VAL 241/ SOP CUP VAL 231/ SOP CUP VAL 244].

Die Zuordnung der Spezifikation erfolgte gemäß der Ph. Eur. Kapitel 5.1.4 und 5.1.8.

Tabelle 3: Spezifikationen Prüfmuster 1 [Ph. Eur. 5.1.4]

Prüfmuster	Kategorie	Grenzwerte		Prüfung auf				
		TAMC	TYMC	Ec	Sa	Gram(-) galletoleerante Bak.	Sta	Psa
1	kutane Anwendung, Anwendung in der Mundhöhle und am Zahnfleisch	10 ² KBE/g	10 ¹ KBE/g	n.g.	n.g.	n.g.	n.n.	n.n.

Tabelle 4: Spezifikationen Prüfmuster 2 [Ph. Eur. 5.1.8]

Prüf- muster	Kategorie	Grenzwerte		Prüfung auf				
		TAMC	TYMC	Ec	Sa	Gram(-) galletol erante Bak.	Sta	Psa
2	pflanzliche Arzneimittel; Produkte, die vor Verabreichung mit kochendem Wasser versetzt werden	10 ⁷ KBE/g	10 ⁵ KBE/g	10 ³ KBE/g	n.n./25 KBE/g	n.g.	n.g.	n.g.

Tabelle 5: Spezifikationen Prüfmuster 3 [Ph. Eur. 5.1.8]

Prüf- muster	Kategorie	Grenzwerte		Prüfung auf				
		TAMC	TYMC	Ec	Sa	Gram(-) galletol erante Bak.	Sta	Psa
3	pflanzliche Arzneimittel; Produkte, die vor Verabreichung nicht mit kochendem Wasser versetzt werden	10 ⁵ KBE/g	10 ⁴ KBE/g	n.n/g	n.n./25 KBE/g	10 ⁴ /g	n.g.	n.g.

Die Grenzwerte beeinflussen die Verdünnungsstufe des Prüfmusters während der Durchführung, dabei spielt auch die Kategorie (Siehe Tabelle 3 – 5) des Produktes eine Rolle. Festgelegt werden diese in der Ph. Eur. Kapitel 5.1.8 und 5.1.4. Die Kategorien dienen der korrekten Durchführung und Erstellung der angemessenen Methode.

4.4 Risikoanalyse nach der FMEA-Methode

Die Risikoanalyse für die Validierung erfolgt nach der „FMEA-Methode“. Ziel dieser Bewertung ist es, alle kritische Parameter zu veranschaulichen und zu charakterisieren. Die Methode beinhaltet drei Kriterien die in einem Fünfpunktabstufungsprogramm bewertet wurden (Siehe Tabelle 6). Der Risikofaktor bzw. die Risikoprioritätszahl (RPZ) ergibt sich durch die Multiplikation der Punkte [SOP CUP VALP 241/ SOP CUP VALP 231/ SOP CUP VALP 244].

Tabelle 6: Bewertungsmaßstab der Risikoanalyse nach FMEA Teil 1 [SOP CUP VALP 241/ SOP CUP VALP 231/ SOP CUP VALP 244]

Bewertungspunkte	1	2	3	4	5
H: Fehlerhäufigkeit	niedrig		→		hoch
S: Schwere des Fehlers	gering		→		schwer
W: Wahrscheinlichkeit den Fehler zu erkennen	hoch		→		niedrig

Berechnung:

Entsprechend der angewendeten Methoden wurden relevante Prüfpunkte aufgestellt, denen ein potenzieller Fehler zugeordnet wurde. Diese Fehlerquellen wurden in Anlehnung an die FMEA-Methode mit einem Fünfpunktabstufungsprogramm bewertet. Dabei erfolgte die Unterscheidung der, in Tabelle 6 aufgeführten, Kriterien (Bewertungspunkte). Die Punkte der Kriterien pro Fehler werden multipliziert und ergeben damit die Risikoprioritätszahl (RPZ). Bei einem Ergebnis < 30 (Wert wird betriebsintern festgelegt) wurde der Fehler als technischer Prüfpunkt (TP) deklariert und nicht in die Validierung (V) einbezogen. Bei einem RPZ > 30 fand die Einbeziehung des Parameters in die Validierung statt.

4.5 Vorbereitung der Methoden

4.5.1 Vorbereitung der Testorganismen

Vor Beginn des Validierungsprozesses mussten frische Bakterienkulturen (Übernachkulturen) hergestellt werden, da sich die Organismen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden mussten. Das heißt die Bakterien besitzen einen angepassten Stoffwechsel. Charakteristisch für diese Wachstumsphase ist eine konstante Generationszeit. Um die optimale Anzahl der koloniebildenden Einheiten zu ermitteln wurden Verdünnungsreihen wie folgt angelegt [Schlegel, 2006]:

Es wurden aus einer konzentrierten Ausgangslösung (Übernachkultur) Verdünnung von 10^{-1} bis 10^{-6} hergestellt. Für folgende Testorganismen wurde eine Übernachkultur angelegt:

- *Candida albicans* (Ca)
- *Escherichia coli* (Ec)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Psa)
- *Salmonella typhimurium* (Sa)
- *Staphylococcus aureus* (Sta)

Für *Aspergillus brasiliensis* (Ab) und *Bacillus subtilis* (Ba) wurde die Verdünnungsreihe aus einer Glycerinkultur erstellt, da beide Organismen ausgespart zu verwenden sind.

Aus der physiologischen Kochsalzlösung (Lösungsmittel) wurden jeweils 4,5 ml in die Zentrifugenröhrchen pipettiert. Aus der Ausgangslösung (Übernachkultur) wurden 500 µl in die Lösung 1 (10^{-1}) pipettiert. Aus Lösung 1 wurden 500 µl in die Lösung 2 (10^{-2}) gegeben. Dieses Pipettierschema erfolgte bis zur 10^{-6} Verdünnung (Endvolumen 5 ml). Für Ab und Ba wurden 100 µl der Glycerinkultur in 900 µl physiologische Kochsalzlösung gegeben. Dies entspricht einer 1:10 Verdünnung (10^{-1}) und wurde als Ausgangslösung verwendet. Dabei fand die Verdünnung nach dem Schema gleich der Übernachkultur statt. Zur Verdeutlichung werden die Schemen in Abbildung 4 dargestellt. Entsprechend dieses Schemas wurden die Verdünnungsreihen aller Prüfmuster angelegt.

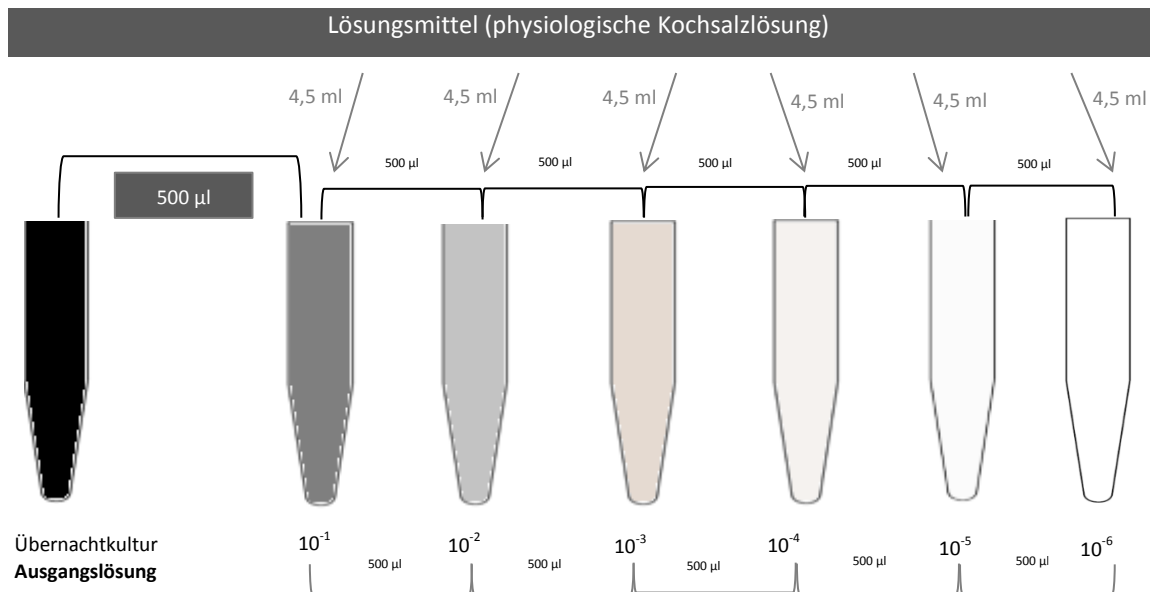


Abbildung 4: Verdünnungsreihe Schema

Die Abbildung zeigt schemenhaft die Aufstellung einer Verdünnungsreihe. 10⁻¹ Lösung stellt für Ab und Ba die Ausgangslösung dar (unter Bereich). Für die restlichen Organismen wurde eine Übernachtskultur angelegt.

Gemäß der Ergebnisse erfolgte die Animpfung mit entsprechendem Volumen (Siehe Tabelle 7) [Schlegel, 2006].

Tabelle 7: Volumina für die Testorganismen am Beispiel Prüfmuster 3

Testorganismus	Volumina Test 1 / Test 2	Volumina LOQ	Volumina RoRef
Ab	15 µl aus 10 ⁻⁵	5 µl aus 10 ⁻⁵	15 µl aus 10 ⁻⁵
Ba	20 µl / 10 µl aus 10 ⁻⁵	10 µl aus 10 ⁻⁶	20 µl aus 10 ⁻⁵
Ca	5 µl aus 10 ⁻²	15 µl aus 10 ⁻⁴	5 µl aus 10 ⁻²
Ec	10 µl aus 10 ⁻⁵	10 µl aus 10 ⁻⁶	10 µl aus 10 ⁻⁵
Psa	60 µl / 70 µl aus 10 ⁻⁶	10 µl aus 10 ⁻⁶	60 µl aus 10 ⁻⁶
Sa	100 µl aus 10 ⁻⁶	10 µl aus 10 ⁻⁶	100 µl aus 10 ⁻⁶
Sta	60 µl aus 10 ⁻⁶	10 µl aus 10 ⁻⁶	60 µl aus 10 ⁻⁶
Galletolerante Gram(-) EC	20 µl aus 10 ⁻⁴	5 µl aus 10 ⁻⁴	20 µl aus 10 ⁻⁴
Galletolerante Gram(-) Psa	20 µl aus 10 ⁻⁴	5 µl aus 10 ⁻⁴	20 µl aus 10 ⁻⁴

Anhand der KBE / Platte für die jeweilige Verdünnungsstufe des entsprechenden Testorganismus, wurden die einzusetzenden Volumina ermittelt. Für den Test 1, Test 2 und RoRef (Robustheitstest) wurden dieselben Volumina, entsprechend < 100 KBE / Ansatz, eingesetzt. Der Unterschied zwischen Test 1 bzw. 2 und RoRef ergibt sich aus der „frische“ der Kultur. Die Testorganismen für die Überprüfung auf RoRef weisen einen geschwächten Stoffwechsel auf, da diese 8 Tage bei 2 – 8 °C gelagert wurden. Für den Test auf die Bestimmungsgrenze LOQ wurde die Verdünnungsstufe gewählt, die < 10 KBE / Ansatz entsprechen. Die Volumina wurden entsprechend für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl, aber auch für den Nachweis der spezifizierten Mikroorganismen, im gleichen Maß, verwendet.

Für den Nachweis auf galletolerante gramnegative Mikroorganismen wurden die Volumina gewählt die ≥ 1000 KBE / Ansatz entsprechen. Dieses Volumen wurde für den Test 1, Test 2 und RoRef eingesetzt. Für den Test auf LOQ wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten auf ≥ 200 KBE / Ansatz reduziert. Es erfolgte die Auswahl einer höheren KBE, da die Suspension vorinkubiert und eine entsprechende Verdünnungsreihe angesetzt wurde.

4.5.2 Bioburden

Die Untersuchung auf Bioburden (Grundkontamination) diente der Bestimmung der Ausgangskeimzahl (Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen im Produkt) vor Beginn der Prüfungen [URL-5].

Anhand der Ergebnisse fand die Ermittlung der passenden Probenverdünnungen für die fortlaufenden Tests statt. Dabei wurde die Verdünnung mit der wenigsten Grundkontamination gewählt, die innerhalb der vorgegebenen Grenzwerte liegt. Die Proben wurden entsprechend ihrer Probenvorbereitung angesetzt. Es erfolgte eine Verdünnung der Probenlösung 1:10, 1:100, 1:1000 und 1: 10 000. Jeweils 1 ml der entsprechend Lösung wurde ausplattiert und mit CASO-Agar bzw. SAB-Agar übergossen (Doppelbestimmung). Die Inkubation erfolgte für 24 – 48 h bei ca. 32 bzw. 22 °C. Anschließend wurden die Platten ausgezählt und bewertet.

4.6 Prüfmuster 1

Bei dem Prüfmuster 1 handelte es sich um eine halbfeste Vaselinealbe mit 10 % Salicylsäure zur kutanen Anwendung (Anwendung auf der Haut). Dementsprechend wurde das Produkt der Kategorie, wie im Kapitel 4.2 Tabelle 3 aufgeführten, zugeteilt und die Spezifikationen erstellt. Die Probenvorbereitung und die Überprüfung auf TAMC bzw. TYMC erfolgten gemäß den Vorlagen der Ph. Eur. 2.6.12. Für TAMC wurde „*die Gesamtheit der vermehrungsfähigen aeroben Mikroorganismen (Lebewesen, die elementaren Sauerstoff für ihren Stoffwechsel verwerten. Darunter zählen ebenso fakultativ anerobe Mikroorganismen)*“ nachgewiesen [Ph. Eur. 2.6.12]. Bei dem Nachweis auf TYMC wurde „*die Gesamtheit der vermehrungsfähigen Hefen und Schimmelpilze*“ ermittelt [Ph. Eur. 2.6.12]. Aufgrund der Eigenschaft und Kategorie des Produktes wurde auf die Überprüfung des Bioburden verzichtet. Die Überprüfung auf TAMC und TYMC fand quantitativ statt. Das heißt, die Ergebnisse werden als Zahlenwerte dargestellt und Eigenschaften werde in numerische Resultate formatiert [Ph. Eur. 2.6.13].

Im Folgenden werden die spezifizierten Mikroorganismen für das Prüfmuster 1 aufgelistet, die auf die im Kapitel 1 dargestellten analytischen Kenngrößen, mit Hilfe eines qualitativen Nachweises getestet wurden. Bei einem qualitativen Nachweis wird die Entscheidung zwischen auftreten und nicht auftreten eines definierten Zustands getroffen [Ph. Eur. 2.6.13].

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

4.6.1 Probenvorbereitung Prüfmuster 1

Für die Probenvorbereitung des Prüfmusters 1 wurden 10 g des Produktes eingewogen und mit 90 g Natriumchlorid-Pepton-Pufferlösung + 10 % Tween 80 (NCPB + 10 % Tween, pH 7,0) auf 100 g aufgefüllt. Die Probensuspension entspricht einer 1:10 Verdünnung.

Aufgrund von Vortests konnte eine Hemmwirkung des Produktes bestätigt werden. Dies ist der Grund für das eingesetzte NCPB + 10 % Tween, da dieses der antimikrobiellen Wirkung des Produktes entgegen wirkt.

Da es sich bei dem Produkt um eine fetthaltige und schwer lösliche Salbe handelt, wurde die Suspension zusätzlich für maximal 30 min bei ca. 42 °C erwärmt, um den Lösungsprozess zu beschleunigen. Für die Weiterverarbeitung erfolgte die Homogenisierung der Probensuspension.

4.6.2 Bestimmung TAMC und TYMC für Prüfmuster 1

Das eingewogene Prüfmuster 1 und die Kontrollprobe (NCPB + 10 % Tween ohne Produkt) wurden mit einem passenden Volumen an Mikroorganismen (≤ 100 KBE / Ansatz) versetzt. Für jeden Teststamm erfolgte eine extra Prüfung, dabei wurden folgenden Mikroorganismen für TAMC und TYMC nachgewiesen:

TAMC (Kulturmedium: CASO-Agar):

- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

TYMC (Kulturmedium: SAB-Agar):

- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- *Candida albicans* ATCC 10231

Die mit Mikroorganismen versetzten Prüflösungen wurden nach der Gussplattenmethode in der 1:10 (TAMC) bzw. 1:100 (TYMC) Verdünnung untersucht. Die Untersuchung erfolgte als Doppelbestimmung.

Für die Prüfung auf TAMC wurde 1 ml der 1:10 Lösung bzw. der Kontrollprobe auf eine vorbereitete Petrischale pipettiert und mit 15 – 20 ml ca. 45 °C warmen CASO-Agar überschichtet und geschwenkt. Nach Abkühlung des Agars erfolgte die Inkubation bei 30 – 35 °C für 5 Tage.

Für TYMC wurden 10 ml der 1:100 Lösung und die Kontrollprobe in die vorbereiteten Petrischalen pipettiert und mit ca. 25 ml verflüssigtem SAB-Agar mit einer Maximaltemperatur von 45 °C übergossen und homogenisiert. Die Inkubation erfolgte 7 Tage bei 20 – 25 °C.

Zudem wurde eine Negativkontrolle bereitgestellt. Als Lösung diente NCPB + 10 % Tween. Die Prüfung des Produktes fand auf Grundlage der Richtlinien des europäischen Arzneimittelbuchs Kapitel 2.6.12 und 2.6.13 statt.

Nachweis der Bestimmungsgrenze LOQ:

Bei dem Nachweis der Bestimmungsgrenze LOQ wurde mit der kleinsten quantitativ und qualitativ nachzuweisenden Konzentration angeimpft. Probelösung und Positivkontrollen wurden mit der entsprechenden Menge der Testorganismen versetzt, welche sich in einer Größenordnung von ≤ 10 KBE /Ansatz verhalten.

Nachweis Robustheit (RoRef):

Probelösung und Positivkontrollen wurden mit der entsprechenden Menge des Testorganismus versetzt, welche in der Regel ≤ 100 KBE / Ansatz enthalten. Die Testorganismen besitzen einen geschwächten Stoffwechsel (8 Tage alt, Lagerung bei 2 – 8 °C). Es erfolgt der Vergleich mit dem Test 1 (frische Kulturen).

4.6.3 Spezifizierte Mikroorganismen Prüfmuster 1

Für das Prüfmuster 1 erfolgte der Nachweis spezifizierter Mikroorganismen wie folgt:

Nachweis auf *Pseudomonas aeruginosa*:

Es erfolgte die Einwaage von 10 ml der 1:10 verdünnten Probe, welche auf 100 ml mit 1-facher CASO-B. aufgefüllt, vermischt und homogenisiert wurde. Als Kontrollansatz wurde NCPB + 10 % Tween anstelle des Produktes eingesetzt. Die Beimpfung mit Mikroorganismen erfolgt mit einem geeigneten Volumen an *Pseudomonas aeruginosa*. Die Inkubation wurde auf 18 – 24 h bei 30 – 35 °C festgelegt.

Die geschwenkte Probensuspension wurde anschließend auf Cetrimid-Agar überführt und für weitere 18 – 24 h bei 30 – 35 °C bebrütet [Gemäß den Vorschriften der Ph. Eur. 2.6.13].

Nachweis auf *Staphylococcus aureus*:

Für den Nachweis auf *Staphylococcus aureus* wurden 10 ml der 1:10 Verdünnung mit 90 ml CASO-B. aufgefüllt, vermischt und homogenisiert. Kontrollansatz bildet NCPB + 10 % Tween. Der Ansatz wurde mit einem geeigneten Volumen an *Staphylococcus aureus* versetzt. Die Bebrütung fand bei 30 – 35 °C für 18 – 24 h statt. Aus der geschüttelten Probensuspension wurde eine Subkultur (Mikroorganismenkultur die bereits von einer vorhandenen Kultur abstammt) auf MKP-Agar angelegt und für 18 – 48 h bei 30 – 35 °C inkubiert [Gemäß den Vorschriften der Ph. Eur. 2.6.13].

Die KBE / Ansatz entsprechen den Vorgaben der Bestimmung auf TAMC und TYMC.

4.7 Prüfmuster 2

Als Prüfmuster 2 lag ein Monotee aus Blatt/Blüte/Krautdrogen mit antimikrobieller Eigenschaft (Die Vermehrungsfähigkeit von Mikroorganismen wird reduziert) vor. Es handelt sich um ein pflanzliches Arzneimittel zur oralen Anwendung und wird vor Verabreichung mit kochendem Wasser versetzt. Dementsprechend wurde es in die Kategorie gemäß der Tabelle 4 im Kapitel 4.2 eingeteilt und die dargestellten Spezifikationen zugeordnet. Die Probenvorbereitung und Überprüfung auf TAMC bzw. TYMC erfolgten nach den Vorgaben der Ph. Eur. 2.6.12 in Einbezug des Kapitels 2.6.31. Da es sich bei dem Prüfmuster um ein Naturprodukt handelt, konnte auf eine Überprüfung der Grundkontamination (Bioburden) nicht verzichtet werden (Siehe Kapitel 4.5.2). Folgende spezifizierte Mikroorganismen wurden wie folgt auf, die im Kapitel 1 dargestellten, analytischen Kenngrößen getestet:

- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*

4.7.1 Probenvorbereitung Prüfmuster 2

10 g des Produktes des Prüfmusters 2 wurden mit 90 ml NCPB vermischt und homogenisiert, sodass eine 1:10 Verdünnung entstanden ist. Es ist, aufgrund der Grundkontamination (Bioburden), eine weitere Verdünnung der Produktlösung erforderlich, um die angeimpften Keime eindeutig nachweisen zu können und ein korrektes Ergebnis zu erbringen. Für die Weiterverarbeitung wurde somit für TAMC und TYMC eine 1:100 Verdünnung verwendet (Verdünnungsmedium NCPB).

4.7.2 Bestimmung TAMC und TYMC Prüfmuster 2

Gemäß Prüfmuster 1 erfolgte die Bestimmung auf TAMC und TYMC für das Prüfmuster 2. Es wurden selbige Mikroorganismen nachgewiesen. Als Kulturmedium zur Überprüfung von TYMC wurde Sabouraud-Agar mit Chloramphenicol (SAB+CA-Agar) verwendet, um der Grundkontamination entgegen zu wirken. Die mit Mikroorganismen versetzten Prüflösungen 2 wurden nach der Gussplattenmethode in der 1:100 Verdünnung untersucht. Die Untersuchung erfolgte immer als Doppelbestimmung.

Für die Prüfung auf TAMC und TYMC wurde 1 ml der 1:100 Lösung bzw. der Kontrollprobe auf eine vorbereitete Petrischale pipettiert und mit 15 – 20 ml ca. 45 °C warmen CASO-Agar bzw. SAB+CA-Agar überschichtet und geschwenkt. Nach Abkühlung des Agars erfolgte die Inkubation bei 30 – 35 °C für 5 Tage (TAMC) und bei 20 – 25 °C für 7 Tage (TYMC).

Zudem wurde eine Negativkontrolle (NCPB) bereitgestellt. Die Durchführung erfolgte gemäß der Ph. Eur. 2.6.12.

Der Nachweis auf die Bestimmungsgrenze und Robustheit erfolgte gleich der Durchführung des Prüfmusters 1.

4.7.3 Spezifizierte Mikroorganismen Prüfmuster 2

Prüfmuster 2 wurde zusätzlich auf folgende spezifizierte Mikroorganismen untersucht:

Nachweis auf *Escherichia coli*:

10 ml der angesetzten Probenverdünnung (1:10 Verdünnung) wurden in 100 ml CASO-B. überführt und homogenisiert. Als Kontrollansatz wurde NCPB anstelle des Produktes eingesetzt. Eine Negativkontrolle mit NCPB und ohne angeimpfte Mikroorganismen wurde mitgeführt. Der Ansatz wurde mit einem geeigneten Volumen an *Escherichia coli* versetzt. Die Inkubation der Suspension erfolgte für 18 – 24 h bei 30 – 35 °C. Aus der geschüttelten Probensuspension wurde 1 ml entnommen, in 100 ml MCB überführt und für 1 – 2 Tage bei 42 – 44 °C bebrütet. Aus dieser Suspension wurde eine Subkultur auf MCA angelegt, welche weitere 18 – 72 h bei 30 – 35 °C inkubiert wurde [Gemäß den Vorschriften der Ph. Eur. 2.6.13].

Nachweis auf *Salmonellen typhimurium*:

25 g des Prüfmusters 2 wurde mit 225 ml CASO-B. aufgefüllt, vermischt und homogenisiert. Der Ansatz wurde mit einem geeigneten Volumen einer *Salmonella spp.* versetzt. Nach Homogenisierung der Probensuspension erfolgte die Inkubation für 24 h bei 30 – 35 °C. 0,1 ml der Suspension wurden in 10 ml RVS-Bouillon überführt und 18 – 24 h bei 30 – 35 °C bebrütet. Anschließend fand die Anlegung einer Subkultur auf XLD-Agar statt, welche für 18 – 48 h bei 30 – 35 °C inkubiert wurde [Gemäß den Vorschriften der Ph. Eur. 2.6.13].

Es wurden die KBE / Ansatz entsprechend der Probenvorbereitung eingesetzt.

4.8 Prüfmuster 3

Als drittes Prüfmuster lag ein Monotee aus Furch/Samendrogen ohne antimikrobiellen Eigenschaft zur Untersuchung vor. Dabei handelt es sich um ein pflanzliches Arzneimittel zur oralen Anwendung, welches vor Verabreichung nicht mit kochendem Wasser versetzt wird. Entsprechend dieser Eigenschaften wurde das Prüfmuster in die Kategorie gemäß der Tabelle 5 Kapitel 4.2 eingeteilt und die Spezifikationen zugeordnet. Die Probenvorbereitung und Überprüfung auf TAMC bzw. TYMC erfolgten nach den Vorgaben der Ph. Eur. 2.6.12 in Einbezug des Kapitels 2.6.31. Da es sich bei dem Prüfmuster um ein Naturprodukt handelt, konnte auf eine Überprüfung der Grundkontamination (Bioburden) nicht verzichtet werden (Siehe Kapitel 4.5.2). Folgende spezifizierte Mikroorganismen wurden wie folgt auf, die im Kapitel 1 dargestellten, analytischen Kenngrößen getestet:

- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*
- *Galletolerante gramnegative Bakterien*

4.8.1 Probenvorbereitung Prüfmuster 3

10 g des Produktes des Prüfmusters 3 wurden mit 90 ml NCPB vermischt und homogenisiert, sodass eine 1:10 Verdünnung entstanden ist. Es ist, aufgrund der Grundkontamination, eine weitere Verdünnung der Produktlösung erforderlich, um die angeimpften Keime eindeutig nachweisen zu können und ein korrektes Ergebnis zu erbringen. Für die Weiterverarbeitung wurde somit für TAMC und TYMC eine 1:1000 Verdünnung verwendet.

4.8.2 Bestimmung TAMC und TYMC Prüfmuster 3

Gemäß Prüfmuster 2 erfolgte die Bestimmung auf TAMC und TYMC für das Prüfmuster 3. Es wurden selbige Mikroorganismen nachgewiesen. Als Kulturmedium zur Überprüfung von TYMC wurde ebenfalls Sabouraud-Agar mit Chloramphenicol (SAB+CA-Agar) verwendet, um der Grundkontamination entgegen zu wirken. Die mit Mikroorganismen versetzten Prüflösungen wurden nach der Gussplattenmethode in der 1:1000 Verdünnung untersucht. Die Untersuchung erfolgte immer als Doppelbestimmung.

Für die Prüfung auf TAMC und TYMC wurde 1 ml der 1:1000 Lösung bzw. der Kontrollprobe auf eine vorbereitete Petrischale pipettiert und mit 15 – 20 ml ca. 45 °C warmen CASO-Agar bzw. SAB+CA-Agar überschichtet und geschwenkt. Nach Abkühlung des Agars erfolgte die Inkubation bei 30 – 35 °C für 5 Tage (TAMC) und bei 20 – 25 °C für 7 Tage (TYMC). Zudem wurde eine Negativkontrolle bereitgestellt. Als Lösung diente NCPB [Gemäß den Vorschriften der Ph. Eur. 2.6.12].

LOQ und RoRef wurden gleich Prüfmuster 1 und 2 nachgewiesen.

4.8.3 Spezifizierte Mikroorganismen Prüfmuster 3

Prüfmuster 3 wurde zusätzlich auf folgende spezifizierte Mikroorganismen untersucht:

Nachweis auf *Escherichia coli* und *Salmonellen typhimurium*:

Der Nachweis von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* erfolgte gleich dem Prüfmuster 2.

Die Ansätze für *E. coli* und *Salmonella* wurden mit KBE / Ansatz entsprechend der Probenvorbereitung angeimpft.

Nachweis auf galletolerante gramnegative Bakterien:

10 g des Prüfmusters 3 wurden mit CASO-B. auf 100 g aufgefüllt. Der Ansatz wurde jeweils mit einem geeigneten Volumen an *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* versetzt. Die Konzentration der Stämme lag bei ≥ 1000 KBE pro Ansatz (für LOQ ca. 200 KBE). Die Inkubation des Ansatzes fand zwischen 20 und 25 °C (Raumtemperatur) für 2 – 5 h statt. Zur Weiterverarbeitung wurde der Ansatz homogenisiert. 10 ml, 1 ml, 0,1 ml, 0,01 und 0,001 ml des Ansatzes wurden überführt und mit Mossier-Bouillon auf 100 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde 48 h bei ca. 32 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde jeder Ansatz der Subkulturen auf VRBD-A. ausgestrichen und weitere 24 h bei 32 °C inkubiert. Es fand sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Bestimmung statt. Der 10 ml Ansatz wurde ausschließlich für die qualitative Untersuchung verwendet. Die weiteren Ansätze wurden für den quantitativen Nachweis ausgewertet [Gemäß den Vorschriften der Ph. Eur. 2.6.13].

4.9 Reidentifizierung der Testorganismen

Mit der Durchführung der Reidentifizierung der Testorganismen, für jede der drei Methoden, konnte die Überprüfung der Prüfmuster 1, 2 und 3 abgeschlossen werden. Eine Reidentifizierung ist der Nachweis der Organismen durch eine Identitätsprüfung. Dabei wurden die im Folgenden dargestellten Methoden angewendet. Nährmedien zur Identifizierung der angegebenen Mikroorganismen werden in der Ph. Eur. 2.6.13 vorgeschrieben [SOP CUP GMP MIB 08].

4.9.1 Reidentifizierung *Aspergillus brasiliensis* und *Candida albicans*

Die Identifizierung der ausgezählten Mikroorganismen findet mit Hilfe einer mikromorphologischen Untersuchung statt. Dazu wurde aus einer Einzelkolonie des jeweiligen Referenzstammes ein mikroskopisches Lebenspräparat angelegt und mit einem Tropfen steriler physiologischer Kochsalzlösung zu einer trüben Lösung homogenisiert. Es erfolgte die Abdeckung mit einem Deckglas. Das Deckglas wurde mit einem Tropfen Immersionsöl bedeckt. Anschließend erfolgte die Mikroskopie des Präparats bei 1000-facher Vergrößerung [SOP CUP GMP MIB 08].

Folgende Beobachtungen sind dokumentiert worden [SOP CUP GMP MIB 08]:

- Beweglichkeit
- Makromorphologie
- Größe und Form (äußere Erscheinung)
- Besonderheiten (Sporen, Verdickungen, Polkörper)

Die Durchführung erfolgte gemäß der Standardarbeitsanweisung „SOP CUP GMP MIB 08“, die auf Grundlage der DIN 58959-6 und der aktuellen Version des europäischen Arzneimittelbuchs (Ph. Eur.) erstellt worden.

4.9.2 Reidentifizierung von *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa*

Salmonella typhimurium wurde auf BPLS-Agar ausgestrichen und für 24 h bei ca. 32 °C inkubiert. Anschließend fand die Auswertung der Kolonien statt.

Die Reidentifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte in Acetamid-B. statt. Dabei wurde der Testorganismus in die Bouillon gegeben und 24 h bei ca. 36 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Nessler-Reagenz.

4.9.3 Reidentifizierung mit API-Streifen

API-Streifen bedienen sich einem biochemischen Nachweisprinzip. In den Mikroröhrchen befinden sich dehydratisierte Reaktionssubstanzen. Diese lösen sich bei Zugabe der Suspension. Dabei fand eine biochemische Reaktion statt, die spontan während der Inkubation oder nach erneuter Zugabe von zusätzlichen Reaktionssubstanzen stattfand [URL-6].

Reidentifizierung *E. coli*:**Mit API 20 E (Identifizierung Gramnegativer, Oxidasenegativer Stäbchen)**

Es wurde eine *E. coli*-Übernachtskultur (24 h bei ca. 36 °C) angelegt. Diese Kultur wurde auf CASO-Agar ausgestrichen und für 24 h bei ca. 36 °C erneut inkubiert. Von der Platte wurden 1 – 2 Einzelkolonien abgenommen und mit 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung vermischt und homogenisiert. Es fand die Beimpfung der Röhren des API-Streifens statt. Zuvor wurde die Inkubationswanne mit Wasser gefüllt, um ein wässriges Milieu zu schaffen. Nach Befüllung der Röhren erfolgte die Überschichtung unterstrichener Felder mit Paraffinöl (für eine anaerobe Inkubation). Die Inkubation fand bei ca. 36 °C für 24 h statt. Nach 24 stündiger Inkubation wurden bestimmte Röhren mit zusätzlichen Testsubstanzen befüllt. Die Reaktion fand innerhalb von 10 min statt. Anschließend erfolgte die Endauswertung der Reidentifizierung (Vorauswertung nach 4 h Inkubation).

Reidentifizierung *Bacillus*:**Mit API 50 CHB (Identifizierung von *Bacillus subtilis* mit CHB-Medium):**

Der auf CASO-A. ausgestrichenen Übernachtskultur (Inkubation 24 h bei 36 °C) wurden Einzelkolonien entnommen und in das CHB-Medium gegebene, sodass eine Mc Farland Standard von 2 (Trübungsstufe einer Lösung, 2 entspricht einer milchigen Trübung) entstanden ist. Es erfolgte die Homogenisierung der Keimsuspension. Die Inkubationswanne wurde befeuchtet und die Kammern des API entsprechend mit der Keimsuspension beimpft. Die Inkubation fand bei 32 °C für 24 h statt. Anschließend erfolgte die erste Auswertung. Nach weiteren 24 h Inkubation fand die Endauswertung statt.

Reidentifizierung *Staphylococcus*:**Mit API Staph (Identifizierung Grampositiver, Katalasepositiver Kokken):**

Die Übernachtskultur des Teststammes wurde auf CASO-A. ausgestrichen und für 24 h bei 36 °C inkubiert. Es fand eine Resuspendierung mit wenigen Einzelkolonien im API Staph Medium statt, sodass ein MC Farland Standard von 0,5 erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Beimpfung der Röhren mit der Keimsuspension. Bestimmte Kammern wurden mit Paraffinöl überschichtet. Nach 24 h bei 36 °C Inkubation fand die Interpretation des API-Streifens statt.

Die Interpretation aller API-Streifen erfolgte anhand des Farbumschlags der Kammern, welcher eine positive Reaktion darstellt. Über das Programm „APIweb“ erfolgte die Auswertung. Der Testorganismus wurde ausgewählt und das Ergebnis der Analyse, in Form eines numerischen siebenstelligen Codes, eingegeben. Dazu wurden die Werte der Kammern addiert. Ungenaue Resultate konnten mit einem „?“ symbolisiert werden. Das Programm glied die Ergebnisse ab und identifizierte den Mikroorganismus [SOP CUP GMP MIB 08].

5 ERGEBNISSE

Bei der Überprüfung der TAMC mit CASO-Agar werden alle nachweisbaren Einheiten auf den Platten gezählt, auch Pilzkolonien. Ebenso die TYMC auf SAB-Agar. Wenn erwartet wurde, dass aufgrund einer besonders hohen Grundkontamination das Akzeptanzkriterium (Spezifikation) überschritten wird, wurde SAB+CA-Agar angewendet (bezogen auf Prüfmuster 2 und 3). Verfahren und Nährmedien wurden gemäß den Vorgaben der Ph. Eur. angewendet [Ph. Eur. 2.6.12].

5.1 Risikoanalyse

Tabelle 8: Prüfpunktliste Risikoanalyse Teil 1 [SOP CUP VALP 241/ SOP CUP VALP 231/ SOP CUP VALP 244]

Prüfgegenstand	Potenzieller Fehler	S	H	W	RPZ	TP/V	Maßnahmen
Produkt	Löst sich nicht oder sehr schlecht, aufgrund der Produkteigenschaft	5	2	1	10	TP	Die Löslichkeit des Produkts wird visuell überprüft.
	Mikrobielle Hemmwirkung des Produkts auf Bakterien und Pilze	5	5	5	125	V	Durch das Einimpfen von Referenzstämmen wird die Wiederfindungsrate bestimmt. (Parameter Richtigkeit)
	Variabilität des Produktes	3	3	5	45	V	Es werden Wiederholungsprüfungen und Doppelbestimmungen durchgeführt. (Parameter Präzision und Wiederholpräzision)
	Die Keime im Produkt sind auf Grund ungünstiger Bedingungen geschädigt	5	5	5	125	V	Die Wiederfindung von vorgeschädigten Mikroorganismen wird untersucht. (Parameter Robustheit)
	Das Produkt ist nur geringfügig mit Keimen kontaminiert	4	5	5	100	V	Es werden zur Prüfung geringe Keimzahlen eingesetzt. (Parameter LOQ)
Eingesetzte Nährmedien	Kein typisches Wachstum von Keimen in den Nährmedien ohne Produkt	3	3	3	27	TP	Die Wachstumseignungsprüfung der eingesetzten Nährmedien muss erfolgreich sein → WEP-Test nach: SOP CUP GMP MIB 10
	Nährmedium nicht steril → falsch positives Ergebnis	3	3	3	27	TP	Medien müssen keimfrei sein → STE-Test nach: SOP CUP GMP MIB 10
Eingesetzte Geräte	Geräte arbeiten nicht einwandfrei	3	3	3	27	TP	Alle eingesetzten Geräte sind qualifiziert und kalibriert.

Weiterführung Tabelle 8:

Prüfgegenstand	Potentieller Fehler	S	H	W	RPZ	TP/ V	Maßnahmen
Referenzstämmen mit definierter Keimzahl	Falsche Keimzahl → falsch positive oder negative Beurteilung der Wachstumsrate	4	1	1	4	TP	Kein qualitätsrelevantes Risiko durch Mitführen einer Kontrollprobe
	Mikroorganismen aus dem Produkt führen zu falschen Ergebnissen	4	3	5	60	V	Reidentifizierung der Stämme nach der Prüfung → Selektivität
Transport der Probe	Die Probe wird während des Transports durch ungünstige Bedingungen geschädigt	5	2	2	20	TP	Der sachgerechte Transport der Probe liegt in der Verantwortung des Auftraggebers.
Lagerung der Probe	Die Probe wird während der Lagerung durch ungünstige Bedingungen geschädigt	5	2	2	20	TP	Die Lagerung erfolgt entsprechend den Anweisungen des Auftraggebers.

Die Prüfgegenstände in Kombination mit der Identifizierung des Fehlers sind die Grundlage zur Bewertung des Risikos. Die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse stellen den Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit des Auftretens (H) und der Schwere des Fehlers (S) dar. Die Resultate der Risikoprioritätszahl werden bewertet und entsprechend in die Validierung (V) einbezogen oder als technischer Prüfpunkt (TP) deklariert.

5.2 Ergebnisse der Vorbereitung der Testorganismen

Tabelle 9: Verdünnungsreihe am Beispiel Prüfmuster 3

Verdünnungsstufen	Ab	Ba	Ca	Ec	Psa	Sa	Sta
10 -2	Nicht auszählbar	Nicht auszählbar	100 KBE / 137 KBE	Nicht auszählbar	Nicht auszählbar	Nicht auszählbar	Nicht auszählbar
10 -4	47 KBE / 33 KBE	448 KBE / 490 KBE	3 KBE / 3 KBE	556 KBE / 564 KBE	526 KBE / 436 KBE	648 KBE / 786 KBE	550 KBE / 466 KBE
10 -6	2 KBE / 3 KBE	9 KBE / 7 KBE	0 KBE / 0 KBE	7 KBE / 9 KBE	7 KBE / 5 KBE	6 KBE / 7 KBE	6 KBE / 7 KBE

Für das Prüfmuster 3 liegen die beispielhaften Auszählungen der Verdünnungsreihe, für die angewendete Methode, in Tabelle 9, vor. Entsprechend der Werte für den einzelnen Testorganismus werden die Volumina zur entsprechenden Animpfung ermittelt. Die Bestimmung erfolgte als Doppelbestimmung.

5.3 Bioburden

Tabelle 10: Bioburden

Produkt	1:10	1:100	1:1000	1:10 000
Prüfmuster 1	-	-	-	-
Prüfmuster 2	TAMC: 5 KBE / 4 KBE TYMC: 2 KBE / 1 KBE	TAMC: 0 KBE / 0 KBE TYMC: 0 KBE / 0 KBE	TAMC: 0 KBE / 0 KBE TYMC: 0 KBE / 0 KBE	TAMC: 0 KBE / 0 KBE TYMC: 0 KBE / 0 KBE
Prüfmuster 3	TAMC: 46 KBE / 64 KBE TYMC: 48 KBE / 25 KBE	TAMC: 8 KBE / 11 KBE TYMC: 10 KBE / 9 KBE	TAMC: 3 KBE / 10 KBE TYMC: 2 KBE / 1 KBE	TAMC: 1 KBE / 0 KBE TYMC: 2 KBE / 1 KBE

Aufgrund der Eigenschaften des Prüfmusters 1 und seiner antimikrobiellen Wirkung, wurde entschieden dieses nicht auf Bioburden zu untersuchen.

Bei den Prüfmuster 2 und 3 handelt es sich um Naturprodukte, deren Grundkontamination als hoch einzuschätzen ist. Die Tabelle 10 bestätigt diese Vermutung. Vor allem Prüfmuster 3 weist eine sehr hohe Grundkontamination der 1:10 Probenverdünnung auf. Bei steigender Verdünnung nimmt die Grundkontamination ab. Prüfmuster 2 weist nur eine geringe Grundkontamination der 1:10 Verdünnung auf.

5.4 Prüfmuster 1

Die vorliegende Ergebniszusammenfassung bezieht sich auf den Validierungsbericht SOP CUP VALB 241. Dabei werden die Ergebnisse der Überprüfung auf TAMC und TYMC tabellarisch aufgeführt.

5.4.1 Bestimmung TAMC Prüfmuster 1

Tabelle 11: Ergebnisse der Bestimmung auf TAMC Prüfmuster 1

Prüfmuster 1 mit einer 1:10 Verdünnung für TAMC					
Prüfung	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
Test 1	Ab	24	29	24	33
		42	34	35	30
	Mittelwert	33	32	30	35
	Faktor Präzision	1,8	1,2	1,5	1,2
	Wiederfindungsrate	103 %		91 %	
	Ba	46	63	18	28
		62	75	15	26
	Mittelwert	54	69	17	27
	Faktor Präzision	1,3	1,2	1,2	1,1
	Wiederfindungsrate	78 %		63 %	
	Ca	37	41	28	49
		39	73	24	26
	Mittelwert	38	57	26	38
	Faktor Präzision	1,1	1,8	1,2	1,9
	Wiederfindungsrate	67 %		87 %	
	Psa	12	15	25	20
		12	10	34	30
	Mittelwert	12	13	30	25
	Faktor Präzision	1,0	1,5	1,4	1,5
	Wiederfindungsrate	92 %		120 %	
Sta	24	52	31	46	
	41	53	22	35	
Mittelwert	33	53	27	41	
Faktor Präzision	1,7	1,0	1,4	1,3	
Wiederfindungsrate	62 %		66 %		
Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0				
LOQ	Ab	6	4		
		4	6		
	Mittelwert	5	5		
	Faktor Präzision	1,5	1,5		
	Wiederfindungsrate	100 %			
	Ba	4	4		
		5	6		
	Mittelwert	5	5		
	Faktor Präzision	1,3	1,5		
	Wiederfindungsrate	100 %			
	Ca	7	5		
		8	8		
	Mittelwert	8	7		
Faktor Präzision	1,1	1,6			
Wiederfindungsrate	114 %				

Weiterführung Tabelle 11:

Prüfmuster 1 mit einer 1:10 Verdünnung für TAMC					
Prüfung	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
LOQ	Psa	10	12		
		9	7		
	Mittelwert	10	10		
	Faktor Präzision	1,1	1,7		
	Wiederfindungsrate	100 %			
	Sta	9	5		
		5	10		
	Mittelwert	7	8		
	Faktor Präzision	1,8	2,0		
	Wiederfindungsrate	88 %			
Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0				
RoRef	Ab	24	29	33	37
		42	34	40	41
	Mittelwert	33	32	37	39
	Faktor Präzision	1,8	1,2	1,2	1,1
	Wiederfindungsrate	103 %		95 %	
	Ba	46	63	65	77
		62	75	52	81
	Mittelwert	54	69	59	79
	Faktor Präzision	1,3	1,2	1,3	1,1
	Wiederfindungsrate	78 %		75 %	
	Ca	37	41	24	19
		39	73	19	22
	Mittelwert	38	57	22	21
	Faktor Präzision	1,1	1,8	1,3	1,2
	Wiederfindungsrate	67 %		105 %	
	Psa	12	15	81	44
		12	10	90	50
	Mittelwert	12	13	86	47
	Faktor Präzision	1,0	1,5	1,1	1,1
	Wiederfindungsrate	92 %		183 %	
	Sta	24	52	3	3
		41	53	2	6
	Mittelwert	33	53	3	5
	Faktor Präzision	1,7	1,0	1,5	2,0
	Wiederfindungsrate	62 %		60 %	
	Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0			

Tabelle 11 können die Ergebnisse zur Untersuchung auf TAMC für das Prüfmuster 1 entnommen werden. Im Test 1 und Test 2 konnten einige Grenzwertannäherungen beobachtet werden. Es liegen keine Überschreitungen der Spezifikationen vor. Es ist eine Wiederfindungsrate von mindestens 62 % für Test 1 und 63 % für Test 2 (Wdhl.) erreicht worden. Der Test auf die Bestimmungsgrenze (LOQ) liefert erwartungsgemäße Ergebnisse. Der Testorganismus *Staphylococcus aureus* (Sta) zeigten einen Präzisionsfaktor von 2,0 zwischen den Platten der Kontrolle und einen Faktor von 1,8 zwischen den Platten der Probe. Die Werte liegen grenzwertig innerhalb der Spezifikationen. Bei der Überprüfung auf Robustheit der Testorganismen nähert sich der Faktor Präzision und die Wiederfindungsrate des Organismus *Staphylococcus aureus* an die Grenzwerte an (Wdhl.).

5.4.2 Ergebnisse der Bestimmung TYMC Prüfmuster 1

Tabelle 12: Ergebnisse der Bestimmung auf TYMC Prüfmuster 1

Prüfmuster 1 mit einer 1:100 Verdünnung für TYMC					
Test	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
Test 1	Ab	25	20	39	24
		26	14	27	20
	Mittelwert	26	22	33	22
	Faktor Präzision	1,1	1,2	1,4	1,2
	Wiederfindungsrate	118 %		150 %	
	Ca	57	27	30	38
		60	38	40	27
	Mittelwert	59	33	35	33
	Faktor Präzision	1,1	1,4	1,3	1,4
	Wiederfindungsrate	179 %		106 %	
Negativkontrolle (SAB-Agar)	0 / 0				
LOQ	Ab	13	15	/	/
		13	11		
	Mittelwert	13	13		
	Faktor Präzision	1,0	1,4		
	Wiederfindungsrate	100 %			
	Ca	8	11		
		13	8		
	Mittelwert	11	10		
	Faktor Präzision	1,6	1,4		
	Wiederfindungsrate	110 %			
Negativkontrolle (SAB-Agar)	0 / 0				
RoRef	Ab	25	20	27	19
		26	14	22	15
	Mittelwert	26	22	25	17
	Faktor Präzision	1,1	1,2	1,2	1,3
	Wiederfindungsrate	118 %		147 %	
	Ca	57	27	30	13
		60	38	28	20
	Mittelwert	59	33	29	17
	Faktor Präzision	1,1	1,4	1,0	1,5
	Wiederfindungsrate	179 %		171 %	
Negativkontrolle (SAB-Agar)	0 / 0				

Bei der Überprüfung auf TYMC können, wie der Tabelle 12 zu entnehmen ist, keine Auffälligkeiten innerhalb der einzelnen Tests nachgewiesen werden. Beim Test auf die Bestimmungsgrenze weist der Testorganismus *Aspergillus brasiliensis* (Ab) in Anwesenheit des Produkts einen optimalen Präzisionsfaktor von 1,0 auf. Die Wiederfindungsrate zwischen Probe und Kontrolle entspricht einem Wert von 100 %. Der Test auf Robustheit der Organismen zeigt ebenfalls einen optimalen Präzisionsfaktor für *Candida albicans* in Anwesenheit des Produkts. Die Werte für die TYMC liegen durchgehend im entsprechenden Bereich.

5.4.3 Spezifizierte Mikroorganismen

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die qualitative Bestimmung der Testorganismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* in Anwesenheit des Prüfmusters 1 dargestellt.

Ergebnisse für den Testorganismus: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tabelle 13: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für *Pseudomonas aeruginosa* Prüfmuster 1

Test-organismus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-B.	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
Cetrimid-Agar	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm

Tabelle 14: Ergebnisse LOQ für *Pseudomonas aeruginosa* Prüfmuster 1

Test-organismus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz LOQ	Kontrolle LOQ
CASO-B.	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
Cetrimid-Agar	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm

Tabelle 15: Ergebnisse RoRef Test 1 und Test 2 für *Pseudomonas aeruginosa* Prüfmuster 1

Test-organismus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-B.	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
Cetrimid-Agar	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm	blaugrüne Kolonien, Fluoreszenz bei 366 nm

Die Tabellen 13 – 15 geben die Ergebnisse für den Nachweis des spezifizierten Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa* wieder. Nach Animpfung des Testorganismus in CASO-B. und entsprechender Inkubation, konnte eine Trübung der Nährbouillon für den Test 1, Test 2, LOQ und RoRef festgestellt werden. Nach Übertragung auf Cetrimid-Agar wurden blaugrüne, fluoreszierende Kolonien nachgewiesen. Die Ergebnisse zwischen Probenansatz und Kontrolle stimmen überein. Zur Visualisierung der Ergebnisse, werden diese im Anhang Teil 1 Tabelle B dargestellt, dabei sind die grünen Kolonien gut zur erkennen.

Ergebnisse für den Testorganismus: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538Tabelle 16: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für *Staphylococcus aureus* Prüfmuster 1

Test-organismus	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-B.	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MKP-Agar	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum

Tabelle 17: Ergebnisse LOQ für *Staphylococcus aureus* Prüfmuster 1

Test-organismus	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz LOQ	Kontrolle LOQ
CASO-B.	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MKP-Agar	Wachstum	Wachstum

Tabelle 18: Ergebnisse RoRef für *Staphylococcus aureus* Prüfmuster 1

Test-organismus	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-B.	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MKP-Agar	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum

Den Tabellen 16 – 18 sind die Ergebnisse des Nachweises auf den spezifizierten Mikroorganismus *Staphylococcus aureus* zu entnehmen. Nach vorgegebener Probenvorbereitung und Animpfung des Testorganismus in CASO-B., wurde eine Trübung der Nährbouillon beobachtet. Nach dem Ausstrich auf MKP-Agar konnte ein Wachstum von Kolonien bestätigt werden. Im Anhang werden die gelblich gewachsenen Kolonien auf einem repräsentativen Foto dokumentiert (Tabelle B, Anhang Teil 1).

5.5 Prüfmuster 2

Die vorliegende Ergebniszusammenfassung bezieht sich auf den Validierungsbericht SOP CUP VALB 231. Dabei werden die Ergebnisse der Überprüfung auf TAMC und TYMC tabellarisch aufgeführt.

5.5.1 Bestimmung TAMC Prüfmuster 2

Tabelle 19: Ergebnisse der Bestimmung auf TAMC Prüfmuster 2

Prüfmuster 2 mit einer 1:100 Verdünnung für TAMC					
Prüfung	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
Test 1	Ab	31	29	25	19
		22	34	22	28
	Mittelwert	27	32	24	24
	Faktor Präzision	1,5	1,2	1,1	1,5
	Wiederfindungsrate	84 %		100 %	
	Ba	104	63	86	54
		105	75	92	62
	Mittelwert	105	69	89	58
	Wiederfindungsrate	1,0	1,2	1,1	1,1
	Faktor Präzision	152 %		153 %	
	Ca	50	41	61	43
		59	73	50	57
	Mittelwert	55	57	56	50
	Wiederfindungsrate	1,2	1,8	1,2	1,3
	Faktor Präzision	96 %		112 %	
	Psa	15	15	30	20
		9	10	29	30
	Mittelwert	12	13	30	25
	Wiederfindungsrate	1,7	1,5	1,0	1,5
	Faktor Präzision	92 %		120 %	
	Sta	48	52	48	53
		46	53	56	49
	Mittelwert	47	53	52	51
Wiederfindungsrate	1,0	1,0	1,2	1,1	
Faktor Präzision	89 %		102 %		
Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0				
LOQ	Ab	3	4		
		3	6		
	Mittelwert	3	5		
	Faktor Präzision	1,0	1,5		
	Wiederfindungsrate	60 %			
	Ba	7	4		
		5	6		
	Mittelwert	6	5		
	Faktor Präzision	1,4	1,5		
	Wiederfindungsrate	120 %			
	Ca	9	5		
		11	8		
	Mittelwert	10	7		
	Faktor Präzision	1,2	1,6		
Wiederfindungsrate	143 %				

Weiterführung Tabelle 19:

Prüfmuster 2 mit einer 1:100 Verdünnung für TAMC					
Prüfung	Organismus	Probe	Kontrolle	Wdhl.	Wdhl.
		KBE/Platte	KBE/Platte	Probe	Kontrolle
				KBE/Platte	KBE/Platte
LOQ	Psa	12	12		
		15	7		
	Mittelwert	14	10		
	Faktor Präzision	1,3	1,7		
	Wiederfindungsrate	140 %			
	Sta	6	5		
		12	10		
	Mittelwert	9	8		
	Faktor Präzision	2,0	2,0		
	Wiederfindungsrate	113 %			
Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0				
RoRef	Ab	31	29	27	19
		22	34	19	22
	Mittelwert	27	32	23	21
	Faktor Präzision	1,5	1,2	1,4	1,2
	Wiederfindungsrate	84 %		110 %	
	Ba	104	63	72	77
		105	75	75	81
	Mittelwert	105	69	74	79
	Faktor Präzision	1,0	1,2	1,0	1,1
	Wiederfindungsrate	152 %		94 %	
	Ca	50	41	36	33
		59	73	32	50
	Mittelwert	55	57	34	42
	Faktor Präzision	1,2	1,8	1,1	1,5
	Wiederfindungsrate	96 %		81 %	
	Psa	15	15	22	13
		9	10	16	15
	Mittelwert	12	13	19	14
	Faktor Präzision	1,7	1,5	1,4	1,2
	Wiederfindungsrate	92 %		136 %	
	Sta	48	52	29	29
		46	53	28	28
	Mittelwert	47	53	29	29
	Faktor Präzision	1,0	1,0	1,0	1,0
	Wiederfindungsrate	89 %		100 %	
	Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0			

Tabelle 19 können die Ergebnisse zur Untersuchung auf TAMC für das Prüfmuster 2 entnommen werden.

Für Test 1 und Test 2 (Wdhl.) konnten für alle Testorganismen Werte erreicht werden, die einem angepflanzten Verhältnis von in der Regel < 100 KBE / Ansatz (Ausnahme Ba Test 1 und RoRef 1) entsprechen. Der Test auf LOQ weist eine Mindestwiederfindungsrate von 60 % auf. *Staphylococcus aureus* zeigt einen Präzisionsfaktor von 2,0 für die Probe und die Kontrolle. Die Wiederfindungsrate liegt bei 113 %. RoRef zeigt, im Vergleich zum Test 1, geringere koloniebildende Einheiten auf. Lediglich *Pseudomonas aeruginosa* zeigt einen leichten Werteanstieg.

5.5.2 Bestimmung TYMC Prüfmuster 2

Tabelle 20: Ergebnisse der Bestimmung auf TYMC Prüfmuster 2

Prüfmuster 2 mit einer 1:100 Verdünnung für TYMC					
Test	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
Test 1	Ab	44	43	30	56
		38	51	48	58
	Mittelwert	41	47	39	57
	Faktor Präzision	1,2	1,2	1,6	1,0
	Wiederfindungsrate	87 %		68 %	
	Ca	61	99	24	23
		73	86	28	25
	Mittelwert	67	93	26	24
	Faktor Präzision	1,2	1,2	1,2	1,1
	Wiederfindungsrate	72 %		108 %	
Negativkontrolle (SAB + CA-Agar)	0 / 0				
LOQ	Ab	5	7	/	/
		9	7		
	Mittelwert	7	7		
	Faktor Präzision	1,8	1,0		
	Wiederfindungsrate	100 %			
	Ca	12	15		
		13	11		
	Mittelwert	13	13		
	Faktor Präzision	1,0	1,4		
	Wiederfindungsrate	100 %			
Negativkontrolle (SAB + CA-Agar)	0 / 0				
RoRef	Ab	44	43	70	53
		38	51	66	69
	Mittelwert	41	47	68	61
	Faktor Präzision	1,2	1,2	1,1	1,3
	Wiederfindungsrate	87 %		111 %	
	Ca	61	99	20	23
		73	86	31	25
	Mittelwert	67	93	26	24
	Faktor Präzision	1,2	1,2	1,6	1,1
	Wiederfindungsrate	72 %		92 %	
Negativkontrolle (SAB + CA-Agar)	0 / 0				

Bei der Überprüfung auf TYMC können, wie der Tabelle 20 zu entnehmen ist, keine Auffälligkeiten innerhalb der einzelnen Tests nachgewiesen werden.

Candida albicans zeigt einen starken Abfall der koloniebildenden Einheiten zwischen Test 1 und Test 2 (Wdhl.). Der Test auf LOQ zeigt durchgehend unauffällige Ergebnisse, im Bereich zwischen 5 und 15 KBE / Platte. Die Ergebnisse der Überprüfung auf Robustheit (RoRef) liegen deutlich niedriger als die des Test 1. Sie sind mit den Werten des Tests 2 (Wdhl.) zu vergleichen.

5.5.3 Spezifizierte Mikroorganismen

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die qualitative Bestimmung der Testorganismen *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* in Anwesenheit des Prüfmusters 2 dargestellt.

Ergebnisse für den Testorganismus: *Escherichia coli* ATCC 8739

Tabelle 21: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für *Escherichia coli* Prüfmuster 2

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MacConkey Bouillon	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb
MacConkey Agar	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof

Tabelle 22: Ergebnisse LOQ für *Escherichia coli* Prüfmuster 2

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz LOQ	Kontrolle LOQ
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MacConkey Bouillon	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb
MacConkey Agar	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof

Tabelle 23: Ergebnisse RoRef für *Escherichia coli* Prüfmuster 2

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MacConkey Bouillon	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb
MacConkey Agar	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof

In den Tabellen 21 – 23 werden die Ergebnisse des Nachweises auf den spezifizierten Mikroorganismus *Escherichia coli* zusammengefasst. Nach Beobachtung einer Trübung der CASO-B. wurde die Suspension in MCB überführt. Nach ausreichender Inkubation und ersichtlicher gelb Färbung, erfolgte der Ausstrich auf MCA. Das Ergebnis auf MCA wird im Anhang Teil 1 Tabelle B dargestellt. Ersichtlich sind die für *E. coli* typischen roten Kolonien mit trübem Hof. Probenansatz und Kontrolle zeigen selbe Ergebnisse.

Ergebnisse für den Testorganismus: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028Tabelle 24: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für *Salmonella typhimurium* Prüfmuster 2

Test-organismus	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
RVS-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
XLD-Agar	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung

Tabelle 25: Ergebnisse LOQ für *Salmonella typhimurium* Prüfmuster 2

Test-organismus	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz LOQ	Kontrolle LOQ
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
RVS-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
XLD-Agar	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung

Tabelle 26: Ergebnisse RoRef für *Salmonella typhimurium* Prüfmuster 2

Test-organismus	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
RVS-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
XLD-Agar	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung

Den Tabellen 24 – 26 sind die Ergebnisse der Überprüfung auf den spezifizierten Mikroorganismus *Salmonella typhimurium* zu entnehmen. Beobachtungen und Ergebnisse der Probe und Kontrolle, der einzelnen Prüfschritte, stimmen für alle Tests überein. Es konnte jeweils eine Trübung der CASO-B. und RVS-B. bestätigt werden. Nach Ausstrich auf XLD-Agar wurden, wie im Anhang 1 Teil 1 Tabelle B dargestellt, durchscheinende Kolonien und eine Schwarzfärbung des Agars beobachtet.

5.6 Prüfmuster 3

Die vorliegende Ergebniszusammenfassung bezieht sich auf den Validierungsbericht SOP CUP VALB 244. Dabei werden die Ergebnisse der Überprüfung auf TAMC und TYMC tabellarisch aufgeführt.

5.6.1 Bestimmung TAMC Prüfmuster 3

Tabelle 27: Ergebnisse der Bestimmung auf TAMC Prüfmuster 3

Prüfmuster 3 mit einer 1:1000 Verdünnung für TAMC					
Test	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
Test 1	Ab	27	22	21	26
		36	36	19	19
	Mittelwert	32	29	20	23
	Faktor Präzision	1,3	1,6	1,1	1,4
	Wiederfindungsrate	110 %		87 %	
	Ba	108	96	53	51
		114	79	60	49
	Mittelwert	111	88	57	50
	Faktor Präzision	1,1	1,2	1,1	1,0
	Wiederfindungsrate	126 %		114 %	
	Ca	53	52	37	30
		56	59	26	32
	Mittelwert	55	56	32	31
	Faktor Präzision	1,1	1,1	1,4	1,1
	Wiederfindungsrate	98 %		103 %	
	Psa	24	29	20	25
		22	22	17	20
	Mittelwert	23	26	19	23
	Faktor Präzision	1,1	1,3	1,2	1,3
	Wiederfindungsrate	88 %		83 %	
Sta	37	32	27	25	
	34	44	26	36	
Mittelwert	36	38	27	31	
Faktor Präzision	1,1	1,4	1,0	1,4	
Wiederfindungsrate	94 %		87 %		
Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0				
LOQ	Ab	2	2		
		3	2		
	Mittelwert	3	2		
	Faktor Präzision	1,5	1,0		
	Wiederfindungsrate	150 %			
	Ba	5	8		
		9	5		
	Mittelwert	7	7		
	Faktor Präzision	1,8	1,6		
	Wiederfindungsrate	100 %			
	Ca	4	4		
		4	3		
	Mittelwert	4	4		
	Faktor Präzision	1,0	1,3		
Wiederfindungsrate	100 %				

Weiterführung Tabelle 27:

Prüfmuster 3 mit einer 1:1000 Verdünnung für TAMC					
Prüfung	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
	Psa	4	6		
		4	4		
	Mittelwert	4	5		
	Faktor Präzision	1,0	1,5		
	Wiederfindungsrate	80 %			
	Sta	7	4		
		7	3		
	Mittelwert	7	4		
	Faktor Präzision	1,0	1,3		
	Wiederfindungsrate	175 %			
Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0				
RoRef	Ab	27	22	16	18
		36	36	28	17
	Mittelwert	32	29	22	18
	Faktor Präzision	1,3	1,6	1,8	1,1
	Wiederfindungsrate	110 %		122 %	
	Ba	108	96	39	39
		114	79	39	41
	Mittelwert	111	88	39	40
	Faktor Präzision	1,1	1,2	1,0	1,1
	Wiederfindungsrate	126 %		98 %	
	Ca	53	52	63	72
		56	59	45	56
	Mittelwert	55	56	54	64
	Faktor Präzision	1,1	1,1	1,4	1,3
	Wiederfindungsrate	98 %		84 %	
	Psa	24	29	7	12
		22	22	9	16
	Mittelwert	23	26	8	14
	Faktor Präzision	1,1	1,3	1,3	1,3
	Wiederfindungsrate	88 %		57 %	
	Sta	37	32	13	18
		34	44	19	10
	Mittelwert	36	38	16	14
	Faktor Präzision	1,1	1,4	1,5	1,8
	Wiederfindungsrate	94 %		114 %	
	Negativkontrolle (CASO-Agar)	0 / 0			

Für das Prüfmuster 3 wurden zwei Verdünnungsstufen der Probenlösung erstellt. Im Anhang Teil 1 unter passender Überschrift befindet sich die Ergebnistabelle der 1:10 000 Verdünnung (Test 1 TAMC). Für weitere Überprüfungen wurden die 1:1000 Verdünnung verwendet, da sich die Ergebnisse der beiden Verdünnungen im Vergleich nur unwesentlich unterscheiden.

Der Tabelle 27 können die Ergebnisse der 1:1000 Probenverdünnung entnommen werden. *Aspergillus brasiliensis* und *Pseudomonas aeruginosa* weisen sehr geringe KBE / Platte für den Test 1 und Test 2 auf. *Bacillus subtilis* hingegen zeigt in Test 2 nur halb so viel koloniebildende Einheiten wie im Test 1. Der Test auf LOQ gibt durchgehend erwartungsgemäße Ergebnisse < 10 KBE / Platte wieder. Nur *Bacillus subtilis* zeigt einen erhöhten Präzisionsfaktor für Probe und Kontrolle auf. Im Vergleich zu dem Test 1

zeigt der RoRef wesentlich geringe koloniebildende Einheiten pro Testorganismus. Lediglich *Candida albicans* zeigt eine vergleichbare Anzahl an koloniebildenden Einheiten auf.

5.6.2 Bestimmung TYMC Prüfmuster 3

Tabelle 28: Ergebnisse der Bestimmung auf TYMC Prüfmuster 3

Prüfmuster 3 mit einer 1:1000 Verdünnung für TYMC					
Test	Organismus	Probe KBE/Platte	Kontrolle KBE/Platte	Wdhl. Probe KBE/Platte	Wdhl. Kontrolle KBE/Platte
Test 1	Ab	22	31	25	33
		30	20	41	31
	Mittelwert	26	26	33	32
	Faktor Präzision	1,4	1,6	1,6	1,1
	Wiederfindungsrate	100 %		103 %	
	Ca	51	43	23	40
		44	42	40	39
	Mittelwert	48	43	32	40
	Faktor Präzision	1,2	1,0	1,7	1,0
	Wiederfindungsrate	111 %		80 %	
	Negativkontrolle (SAB-Agar)	0 / 0			
LOQ	Ab	4	4	/	/
		6	4		
	Mittelwert	5	4		
	Faktor Präzision	1,5	1,0		
	Wiederfindungsrate	125 %			
	Ca	3	3		
		4	4		
	Mittelwert	4	4		
	Faktor Präzision	1,3	1,3		
	Wiederfindungsrate	100 %			
	Negativkontrolle (SAB-Agar)	0 / 0			
RoRef	Ab	22	31	31	27
		30	20	32	24
	Mittelwert	26	26	32	26
	Faktor Präzision	1,4	1,6	1,0	1,1
	Wiederfindungsrate	100 %		123 %	
	Ca	51	43	44	47
		44	42	54	45
	Mittelwert	48	43	49	46
	Faktor Präzision	1,2	1,0	1,2	1,0
	Wiederfindungsrate	111 %		107 %	
	Negativkontrolle (SAB-Agar)	0 / 0			

Die in Tabelle 28 aufgeführten Ergebnisse zeigen die nachgewiesenen KBE / Platte in Anwesenheit des Prüfmusters 3. Dabei fällt auf, dass es zu keinerlei Annäherung an die Grenzwerte für den Faktor Präzision und die Wiederfindungsrate kommt. Alle Werte liegen im Bereich der angeimpften koloniebildenden Einheiten. Lediglich *Candida albicans* weist im Test 2 (Wdhl.) einen Ausreißerwert der Platte 1 in Anwesenheit des Produktes auf.

5.6.3 Spezifizierte Mikroorganismen

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die qualitative Bestimmung der Testorganismen *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* in Anwesenheit des Prüfmusters 3 dargestellt. Außerdem wird die qualitative und quantitative Bestimmung von galletoleranten gramnegativen Bakterien aufgeführt.

Ergebnisse für den Testorganismus: *Escherichia coli* ATCC 8739

Tabelle 29: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für *Escherichia coli* Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MacConkey Bouillon	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb
MacConkey Agar	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof

Tabelle 30: Ergebnisse LOQ für *Escherichia coli* Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz LOQ	Kontrolle LOQ
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MacConkey Bouillon	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb
MacConkey Agar	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof

Tabelle 31: Ergebnisse RoRef für *Escherichia coli* Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
MacConkey Bouillon	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb	Farbänderung zu gelb
MacConkey Agar	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof	Rote Kolonien, trüber Hof

Die Tabellen 29 – 31 zeigen die Beobachtungen der Prüfschritte in Anwesenheit des Prüfmusters 3 für den Testorganismus *Escherichia coli*. Außerdem liegen die Ergebnisse der Kontrollansätze bei, die dem Vergleich dienen. Probeansatz und Kontrolle kommen zum selben Ergebnis.

Nach entsprechender Inkubation konnte eine Trübung der CASO-B. für die einzelnen Tests festgestellt werden. Die Suspension wurde in MCB überführt und weitere 48 h inkubiert. Nach der Inkubation

konnte eine Farbänderung zu gelb beobachtet werden. Wie im Anhang Teil 1 Tabelle B dargestellt, sind auf den MCA nach Ausstrich und Bebrütung, rote Kolonien mit trübem Hof zu beobachten.

Ergebnisse für den Testorganismus: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Tabelle 32: Ergebnisse Test 1 und Test 2 für *Salmonella typhimurium* Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
RVS-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
XLD-Agar	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung

Tabelle 33: Ergebnisse LOQ für *Salmonella typhimurium* Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz LOQ	Kontrolle LOQ
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
RVS-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
XLD-Agar	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung

Tabelle 34: Ergebnisse RoRef für *Salmonella typhimurium* Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028			
Beobachtungen bei den Prüfschritten	Probenansatz Test 1	Kontrolle Test 1	Probenansatz Test 2	Kontrolle Test 2
CASO-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
RVS-Bouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon	Trübung der Nährbouillon
XLD-Agar	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung	durchscheinende Kolonien, Agar verfärbt sich Schwarz, H ₂ S-Bildung

Die Tabellen 32 – 34 liefern den Beweis für den Nachweis des spezifizierten Mikroorganismus *Salmonella typhimurium*. Kontrollansatz und Probenansatz zeigen die gleichen Ergebnisse für den jeweiligen Test. Nach Nachweis einer Trübung in CASO-B. und anschließend in RVS-B, konnten durchscheinende Kolonien auf XLD-Agar beobachtet werden. Die Schwarzfärbung des Agars wird im Anhang Teil 1 Tabelle B visualisiert.

Ergebnisse für galletolerante gramnegativer Bakterien des qualitativen Nachweises:

Tabelle 35: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien Test 1 und Test 2 qualitativ Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					
	Produktansatz			Kontrolle		
	Ergebnis	Ec Test 1 / Test 2	Psa Test 1 / Test 2	Ergebnis	Ec Test 1 / Test 2	Psa Test 1 / Test 2
CASO-B. (Vorinkubation 4 h)	-	-	-	-	-	-
Mossel- B.	Trübung der Nährbouillon	✓/✓	✓/✓	Trübung der Nährbouillon	✓/✓	✓/✓
VRBD Agar	Rote Kolonien	✓/✓	✓/✓	Rote Kolonien	✓/✓	✓/✓

Tabelle 36: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien LOQ qualitativ Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					
	Produktansatz			Kontrolle		
	Ergebnis	Ec	Psa	Ergebnis	Ec	Psa
CASO-B. (Vorinkubation 4 h)	-	-	-	-	-	-
Mossel- B.	Trübung der Nährbouillon	✓	✓	Trübung der Nährbouillon	✓	✓
VRBD Agar	Rote Kolonien	✓	✓	Rote Kolonien	✓	✓

Tabelle 37: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien qualitativ RoRef Prüfmuster 3

Test-organismus	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					
	Produktansatz			Kontrolle		
	Ergebnis	Ec Test 1 / Test 2	Psa Test 1 / Test 2	Ergebnis	Ec Test 1 / Test 2	Psa Test 1 / Test 2
CASO-B. (Vorinkubation 4 h)	-	-	-	-	-	-
Mossel- B.	Trübung der Nährbouillon	✓/✓	✓/✓	Trübung der Nährbouillon	✓/✓	✓/✓
VRBD Agar	Rote Kolonien	✓/✓	✓/✓	Rote Kolonien	✓/✓	✓/✓

Für den qualitativen Nachweis auf die galletolerante gramnegative Testorganismen, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, wurde der angesetzte 10 ml Ansatz verwendet. Wie in Tabelle 35 – 37 dargestellt, kann eine Trübung der Mossel-Nährbouillon beobachtet werden. Selbiges Ergebnis ergibt sich für den jeweiligen Kontrollansatz. Nach Ausstrich auf VRBD-Agar zeigt der 10 ml Ansatz ein Wachstum roter Kolonien. Im Anhang Teil 1 Tabelle B wird dieses Wachstum illustriert. Dabei wird die Trübung der Mossel-B. und das Wachstum der roten Kolonien auf VRBD-Agar der entsprechenden Testorganismen aufgeführt. Es ist zu beobachten, dass die Trübung des Ansatzes für *Pseudomonas aeruginosa* wesentlich geringer, im Vergleich zu *E. coli*, ausfällt.

Ergebnisse der galletoleranten gramnegativer Bakterien des quantitativen Nachweises:**Tabelle 38: Ergebnisse galletolerante Gram(-) Bakterien quantitativ Prüfmuster 3**

Test	Beobachtung	Probe		Kontrolle	
		Ec	Psa	Ec	Psa
Test 1	Mossel 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	Mossel 0,1 ml Ansatz	+	+	+	+
	Mossel 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	Mossel 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	VRBD 0,1 ml Ansatz	+	+	+	+
	VRBD 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-
Test 2 (Wdhl.)	Mossel 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	Mossel 0,1 ml Ansatz	+	+	+	+
	Mossel 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	Mossel 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	VRBD 0,1 ml Ansatz	+	+	+	+
	VRBD 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-
LOQ	Mossel 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	Mossel 0,1 ml Ansatz	-	-	-	-
	Mossel 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	Mossel 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	VRBD 0,1 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-
RoRef	Mossel 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	Mossel 0,1 ml Ansatz	+	+	+	+
	Mossel 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	Mossel 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 1 ml Ansatz	+	+	+	+
	VRBD 0,1 ml Ansatz	+	+	+	+
	VRBD 0,01 ml Ansatz	-	-	-	-
	VRBD 0,001 ml Ansatz	-	-	-	-

Der quantitative Nachweis der Organismen, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, erfolgte anhand des 1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml und 0,001 ml Ansatz. Dargestellt werden die Ergebnisse in Tabelle 38. Dabei wird eine positive Reaktion in Form einer Trübung der Mossel-Bouillon bzw. eines Wachstums auf VRBD-Agar mit einem Plus (+) gekennzeichnet. Konnte weder eine Trübung noch ein Wachstum beobachtet werden, wird dies in der Tabelle 38 mit einem Minus (-) dargestellt.

Für den Test 1, Test 2 und RoRef konnte jeweils eine Trübung und ein Wachstum des 1 ml und 0,1 ml Ansatzes beobachtet werden. Für den Test auf die Bestimmungsgrenze LOQ konnte nur eine Trübung bzw. ein Wachstum des 1 ml Ansatzes ermittelt werden. Probenansatz und Kontrollansatz des einzelnen Tests stimmen untereinander überein. In Anhang Teil 1 Tabelle C werden die Ergebnisse für den 1 ml und den 0,01 ml Ansatz repräsentativ, zur Visualisierung der in Tabelle 38 dargestellten Ergebnisse, aufgeführt. Im Vergleich zum Testorganismus *Escherichia coli*, zeigt *Pseudomonas aeruginosa* eine wesentlich geringe Trübung der Mossel-Bouillon. Es ist zu sehen, dass der 1 ml Ansatz ein üppiges Wachstum auf VRBD-Agar zeigt. Der 0,01 ml Ansatz hingegen bereits kein Wachstum mehr aufweist.

5.7 Reidentifizierung der Testorganismen

Nach erfolgreicher Durchführung der Methoden pro Prüfmuster erfolgt die Reidentifizierung der Testorganismen zur Sicherstellung der Richtigkeit der Ergebnisse.

5.7.1 Reidentifizierung von *Aspergillus brasiliensis* und *Candida albicans*

Tabelle 39: Ergebnisse der Reidentifizierung von *Aspergillus brasiliensis* und *Candida albicans*

Teststamm	Beobachtung
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Typische Gießkannenform
	Schwarze Sporen
	Fragmentierte Hyphen
<i>Candida albicans</i>	Ovale Zellen
	Bildung von Pseudomycel
	Blastosporen und Chlamydosporen

Die Testorganismen *Aspergillus brasiliensis* und *Candida albicans* wurden mit Hilfe einer mikromorphologischen Untersuchung reidentifiziert. Die Ergebnisse liegen in der Tabelle 39 vor. Zur Visualisierung der Ergebnisse liegen im Anhang Teil 1 Abbildung A und B die mikroskopischen Bilder der Organismen zum Vergleich vor.

5.7.2 Reidentifizierung von *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa*

Salmonella typhimurium wurde auf dem Selektivmedium BPLS-Agar nachgewiesen. Es konnten rötliche Kolonien beobachtet werden. *Pseudomonas aeruginosa* wurde zusätzlich in Acetamid-B. mit Zugabe von Nessler-Reagenz nachgewiesen. Dabei entstand ein gelblich-brauner Niederschlag.

Zur Illustration der Ergebnisse werden die Färbungen des jeweiligen Selektivmediums im Anhang Teil 1 Abbildung C und D dargestellt.

5.7.3 Reidentifizierung mit API-Streifen

Reidentifizierung von *E. coli*:

Mit API 20 E (Identifizierung gramnegativer, oxidasenegativer Stäbchen):



Abbildung 5: Negativreaktion API 20 E zum Zeitpunkt 0 [SOP CUP GMP MIB 08]

Dargestellt wird die Negativreaktion des API 20 E Streifens für die Reidentifizierung von *Escherichia coli*.



Abbildung 6: Ergebnis der Reidentifizierung von *E. coli* mit API 20 E nach Inkubation

Es wird der API-Streifen API 20 E für die Identifizierung gramnegativer, oxidasenegativer Stäbchen dargestellt. Dabei sind die Positiv- und Negativreaktionen aufgeführt.

Es kann, im Vergleich mit der dargestellten Negativreaktionen (Siehe Abbildung 5), eine Verfärbung folgender Kammern beobachtet werden: ONPG, LDC, IND, VP, GLU, MAN, SOR, RHA, MEL, ARA (Siehe Abbildung 6). Bei AMY ist die Farbänderung nicht eindeutig.

Reidentifizierung *Bacillus subtilis*:

Mit API 50 CHB (Identifizierung von *Bacillus subtilis* mit CHB-Medium):



Abbildung 7: Ergebnis der Reidentifizierung von *Bacillus subtilis* mit API 50 CHB [SOP CUP GMP MIB 08]

Es wird der API-Streifen API 50 CHB für die Identifizierung *Bacillus subtilis* in CHB-Medium dargestellt. Links ist die Negativreaktion zum Zeitpunkt 0 dargestellt. Rechts die Ergebnisse nach Animpfung der Bakteriensuspension und Inkubation.

Die Abbildung 7 zeigt rechts einen eindeutigen Farbumschlag von rot zu gelb in Kammer 1, 4, 11, 13, 17, 23, 25 und 27, im Vergleich zur links dargestellten Negativreaktion.

Reidentifizierung *Staphylococcus aureus*:

Mit API Staph (Identifizierung grampositiver, katalasepositiver Kokken):



Abbildung 8: Negativkontrolle API Staph zum Zeitpunkt 0 [SOP CUP GMP MIB 08]

Dargestellt wird die Negativreaktion des API Staph zum Vergleich mit den Ergebnissen für die Reidentifizierung.

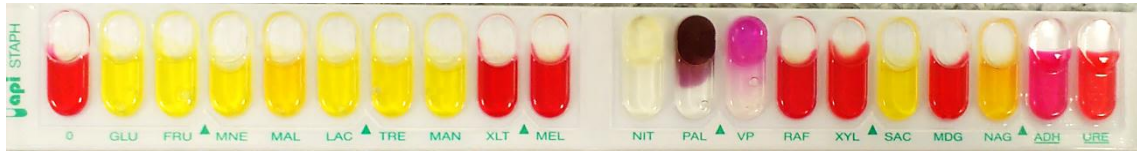


Abbildung 9: Ergebnis der Reidentifizierung von *Staphylococcus aureus* mit API Staph nach Inkubation

Es wird der API-Streifen API STAPH für grampositive, katalasepositive Kokken dargestellt. Die Ergebnisse nach 24 h Inkubation und Zugabe der Zusatzsubstanzen können abgelesen werden.

Folgende Röhrchen werden im Vergleich zur Negativreaktion (Siehe Abbildung 8) als positiv bewertet: GLU, FRAU, MNE, MAL, LAC, TRE, MAN, PAL, VP, SAC, NAG, ADH, URE (Ergebnis wird in Abbildung 9 dargestellt).

Die Ergebnisse werden im Anhang Teil 1 unter den Abbildungen E, F und G in Form der Ergebniskarte zusätzlich dargestellt. Auf diesen werden Positiv- und Negativreaktion zusammengefasst und bewertet. Daraus ergibt sich ein numerischer siebenstelliger Code.

Die Abkürzungen der Mikroröhrchen liegen ebenfalls im Anhang Teil 1 vor (Tabelle E, F, G), dabei wird auf die aktiven Bestandteile und die Reaktion eingegangen.

6 AUSWERTUNG UND DISKUSSION

6.1 Risikoanalyse

Eine Risikoanalyse ist ein wichtiges Mittel zur Bewertung des potentiellen Fehlers und somit bedeutend für den reibungslosen Ablauf einer Methode, indem der Einfluss kritischer Parameter auf die Produkte in Augenschein genommen wird. Mit Hilfe der Risikoanalyse erfolgt die Minimierung von Fehlern und die ständige Verbesserung des Verfahrens bzw. der Methode. Die Risikoprioritätszahl gibt Auskunft über das Ausmaß des Schadens. Anhand der Ermittlung der Risikoprioritätszahl wurden Maßnahmen aufgestellt, die in den laufenden Prozess der Validierung einbezogen werden. Die strukturierte Erfassung von Risikoquellen reduziert den potenziellen Fehler. Fehler die als technischer Prüfpunkt deklariert wurden, sind ein akzeptables Risiko und werden nicht in den Prozess einbezogen [ICH, Q9].

6.2 Auswertung der Vorbereitung der Testorgansimen

Die Ergebnisse der hergestellten Verdünnungen wurden in die Durchführung einbezogen und bilden die Grundlage des Validierungsvorgangs (Tabelle 7). Es erfolgte eine Anpassung der Volumina an die Vorgaben, um einen Vergleich zwischen den Prüfmustern zu bewirken.

6.3 Vergleich der Prüfmuster

Tabelle 40: Vergleich der Prüfmuster

Vergleichspunkte	Prüfmuster 1	Prüfmuster 2	Prüfmuster 3
Zusammensetzung	Vaselinesalbe mit Salicylsäure	Bärenblütten	Leinsamen
Kategorie	Kutane Anwendung	Pflanzliches Arzneimittel, welches vor Verbrauch mit kochendem Wasser versetzt wird	Pflanzliches Arzneimittel, welches vor Verbrauch nicht mit kochendem Wasser versetzt wird
Eigenschaft / Hemmwirkung	Antimikrobielle Wirkung	Antimikrobielle Wirkung	Keine antimikrobielle Wirkung
Grenzwert TAMC	10^2 KBE / g	10^7 KBE / g	10^5 KBE / g
Grenzwert TYMC	10^1 KBE / g	10^5 KBE / g	10^4 KBE / g
Bioburden-Test	Nein	Ja	Ja
Probenverdünnung TAMC / TYMC	1:10 / 1:100	1:100 / 1:100	1:1000 / 1:1000
Escherichia coli	Nein	Ja	Ja
Pseudomonas aeruginosa	Ja	Nein	Nein
Salmonella typhimurium	Nein	Ja	Ja
Staphylococcus aureus	Ja	Nein	Nein
Galletolerante gramnegative Bak.	Nein	Nein	Ja

Tabelle 40 fasst alle Eigenschaften der validierten Prüfmuster zusammen. Im Folgenden werden diese Ergebnisse ausgewertet und diskutiert. Die Tabelle kann zum Vergleich herangezogen werden.

6.3.1 Zusammensetzung

Die Probenvorbereitung für das Prüfmuster 1 wurde an deren Ansprüche angepasst. Die antimikrobielle Wirkung erhält das synthetische Produkt durch die enthaltene Salicylsäure. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde in der Probenvorbereitung auf NCPB + 10 % Tween 80 zurückgegriffen. Tween 80 ist ein Polysorbat, welches lipophile (fetthaltige) Substanzen in einem wässrigen Medium löst. Um den Lösungsvorgang der Emulsion weiter zu unterstützen, wurde das Produkt zusätzlich erwärmt [Ph. Eur. 2.6.12].

Da es sich bei dem Prüfmuster 2 und 3 um ein Naturprodukt mit Grundkontamination handelt, wurde für die Bestimmung auf TYMC das Medium Sabouraud-Glucose-Agar mit Chloramphenicol (SAB+CA-Agar) verwendet. Chloramphenicol kann gemäß der Ph. Eur. 2.6.13 als Breitbandantibiotika zum Medium beigefügt werden, um mit seiner antimikrobiellen Wirkung das Wachstum von Mikroorganismen (Grundkontamination) zu inhibieren. Die Grundkontamination läuft für das Produkt 2 der 1:100 Verdünnung gegen Null, jedoch wird der Zusatz mit Antibiotika als Vorsichtsmaßnahme, zur Gewährleistung korrekter Ergebnisse, eingesetzt. Prüfmuster 3 besitzt im Vergleich zum Prüfmuster 2 keine antimikrobielle Wirkung und zeigt eine wesentlich höhere Grundkontamination auf [Ph. 2.6.13].

6.3.2 Bioburden

Der Test auf Bioburden wird durchgeführt, um die Grundkontamination mit lebensfähigen Mikroorganismen im jeweiligen Produkte zu ermitteln. Dabei steht die frühzeitige Entdeckung eventueller Schwierigkeiten während der Durchführung im Vordergrund. Liegt eine Grundkontamination vor, können die Mikroorganismen während der Validierung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es kann die Probenverdünnung für die Weiterverarbeitung an die Grundkontamination angepasst werden, die je nach Art des Produkts variiert (synthetisch oder natürlich).

Da es sich bei dem Prüfmuster 1 um ein synthetisches medizinisches Produkt handelt, wurde auf die Überprüfung des Bioburden nach Ermessen verzichtet. So konnte das Produkt in einer 1:10 Verdünnung weiterverwendet werden. Aufgrund der hemmenden Wirkung musste für TYMC eine 1:100 Verdünnung gewählt werden.

Prüfmuster 2 ist ein Naturprodukt, welches antimikrobielle Eigenschaften besitzt und im Vergleich zum Prüfmuster 3, eine sehr geringe Grundkontamination aufweist. Dementsprechend konnte auf die 1:100 Verdünnung zurückgegriffen werden. Prüfmuster 3 ist ein Naturprodukt ohne antimikrobielle Eigenschaft. Aus diesem Grund kommt es zu keiner Reduzierung der Grundkontamination, was die hohen KBE / Platte für das Prüfmuster 3 erklärt. Aufgrund der hohen Kontaminationsrate musste eine höhere Probenverdünnung angesetzt werden. Entsprechend der Grenzwerte musste eine 1:1000 Verdünnung für die Bestimmung auf TYMC gewählt werden. Da die KBE / Platte der 1:1000, für die Bestimmung auf TAMC sehr gering waren, wurde diese verwendet. Zudem wurde eine

Vergleichsuntersuchung zwischen der 1:1000 und 1:10 000 Verdünnung durchgeführt, deren Ergebnisse sich nicht erwähnenswert unterscheiden (Zum Vergleich die Tabelle 1 im Anhang Teil 1).

6.3.3 Bestimmung TAMC und TYMC

Für die Bestimmung auf TAMC und TYMC der Prüfmuster 1, 2 und 3, kann den Ergebnistabellen entnommen werden, dass die Parameter Richtigkeit, Präzision, Bestimmungsgrenze, Robustheit und Selektivität erfüllt sind.

In Anwesenheit der Produkte, in angepasster Verdünnungsstufe, können die Testorganismen bei kleinstmöglich nachzuweisender Konzentration qualitativ und quantitativ ermittelt werden. Der **Parameter Bestimmungsgrenze** (LOQ) kann damit für alle Prüfmuster anerkannt werden. Anhand der Untersuchung der Präzision und Wiederholungspräzision kann gezeigt werden, dass die Selektivität der Methode gegeben und die Fähigkeit der Methode als ausreichend zu bewerten ist. Der **Parameter Präzision** trifft ebenfalls für die angewendeten Methoden zu. Dabei gibt die Präzision Auskunft über die Streuung der Werte einer Serie. Die Platten 1 und 2 der einzelnen Tests unterscheiden sich um nicht mehr als den Faktor 2. Die Resultate mehrfach durchgeführter Tests zeigen eine Übereinstimmung (**Wiederholungspräzision**). Die Methode konnte außerdem für den **Parameter Selektivität** bestätigt werden. Dieser Parameter gibt Auskunft über die Fähigkeit des Verfahrens die Teststämme, bei Anwesenheit des Produktes, zu ermitteln. Mit Hilfe des Kontrollansatzes konnte ein permanenter Vergleich zum Probenansatz durchgeführt werden, der mögliche Hemmwirkungen des Produktes gegenüber den angeimpften Organismen ausschließen lässt. Durch die Mindestwiederfindungsrate von 50 %, entsprechend eines Präzisionsfaktors kleiner 2, können die Methoden kongruent der Grenzwerte als zutreffend bewertet werden. Der **Parameter Richtigkeit** wird bestätigt, da Probenansatz und Kontrolle übereinstimmende Ergebnisse aufweisen. Abweichungen sind mit der antimikrobiellen Wirkung des Produkts 1 und 2 zu erklären. Die Wiederfindungsrate aller Testorganismen entspricht der Spezifikation von mindestens 50 %. Durch die Anpassung der Nährmedien an die Eigenschaften wurde der antimikrobiellen Wirkung zurückgesetzt, um eine Reduktion des Bakterienwachstums zu vermeiden. Für den **Parameter Robustheit** (RoRef) wurde die Methode ebenfalls bestätigt. Somit wurde bewiesen, dass die Testorganismen mit einem geschwächten Stoffwechsel nach einer Lagerung von 8 Tagen bei 2 – 8 °C erfolgreich ermittelt werden können. Die subjektiven Methoden können die Spezifikationen pro Produkt erfüllen.

Validierungen als Bestandteil des Qualitätssystems belegen die Zweckmäßigkeit und garantieren die einzuhaltende Qualität des Verfahrens. Die angewendeten Methoden müssen anerkannten Regularien, wie dem EU-GMP-Leitfaden Anhang 15, PIC/S PI 006-1 und der Ph. Eur., entsprechen. Erst dann erfolgt die Aufnahme der Methoden in die Routine [EU-GMP-Leitfaden, Anhang 15].

Die Ergebnisse der angewendeten Probenvorbereitung, angepasst an die Eigenschaften der Prüfmuster, zeigen, dass alle analytischen Kenngrößen erfolgreich nachgewiesen werden können. Dabei ist die Zusammensetzung und die Beschaffenheit der Produkte nicht als trivial zu bewerten. Probenvorbereitung und Tests müssen der Beschaffenheit angepasst sein, um zu optimalen Ergebnissen

zu führen und die Methode für die Routine zugänglich zu machen. Es wurde bestätigt, dass Ausrüstung, Material und Methode zu der gewünschten stabilen Qualität des Produkts führen.

Für die Bestimmung auf TAMC und TYMC wurden die Testorganismen (Siehe Ergebnisse) gewählt, da sie als Repräsentanten für verschiedene Mikroorganismengruppen dienen. *Bacillus subtilis* und *Aspergillus brasiliensis* repräsentieren die sporenbildenden Organismen. *Candida albicans* ist eine Hefe. *Staphylococcus aureus* vertritt die Gruppe der Kokken. *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* sind Bakterien in Stäbchenform. Zudem werden die Wirkungen der verschiedenen Eigenschaften bewertet. Zum Beispiel das Gramverhalten der Mikroorganismen. Grampositive und gramnegative Testorganismen unterscheiden sich im Aufbau ihrer Zellwand. Der Unterschied besteht in der Aufnahmefähigkeit von Wirkstoffen. Mit den Teststämmen wird somit ein gewisses Spektrum an Eigenschaften von Organismen abgedeckt. Die Testorganismen wurden erfolgreich in Anwesenheit der Prüfmuster ermittelt und anschließend eindeutig identifiziert [SOP CUP GMP MIB 08].

Alle zu testenden Faktoren (analytische Kenngrößen) konnten für die Methode zur Bestimmung auf TAMC und TYMC für das Prüfmuster 1, 2 und 3 bestätigt werden. Die Parameter konnten innerhalb der vorgegebenen Grenzwerte (Spezifikationen) nachgewiesen werden. Kleine Abweichungen der KBE / Platte entstehen durch falsche Animpfung oder fehlerhafte Auszählung der Verdünnungsreihen und damit verbundene Fehler bei der Zuteilung des entsprechenden Volumens. Abweichungen entstehen jedoch nicht nur subjektiv durch den Bearbeiter, sondern können von dem Produkt selbst ausgelöst werden. Prüfmuster 2 und 3 zum Beispiel weisen, aufgrund ihres natürlichen Ursprungs, eine Grundkontamination auf. Diese Grundkontamination kann die Ergebnisse, im Vergleich zur Kontrolle, erhöhen. Durch den Einsatz von SAB+CA-Agar kann diesem Resultat entgegen gewirkt werden. Bei geringeren KBE / Platte der Probensubstanz im Vergleich zur Kontrolle, kann die antimikrobielle Wirkung verantwortlich sein. Antimikrobielle Eigenschaften weisen die Prüfmuster 1 und 2 auf. Um starke Abweichungen zu vermeiden, wurde die Probenvorbereitung an die Eigenschaft angepasst. Dazu wurde für Prüfmuster 1 NCPB + 10 % Tween verwendet, um der antimikrobiellen Eigenschaft entgegen zu wirken bzw. SAB+CA-Agar bei Prüfmuster 2 und 3, um deren Grundkontamination zu regulieren. Nur so konnten die Testorganismen eindeutig nachgewiesen werden.

Die Tests sollten in einem Maß wiederholt werden, dass durch Anzahl der Daten ein Trend der Werte zu sehen ist und eine geeignete und repräsentative Auswertung möglich ist. Um die Ergebnisse bewerten zu können, wird im Vorfeld festgelegt, innerhalb welchen Intervalls die Resultate schwanken dürfen (Spezifikationen). Dazu erfolgt die Betrachtung der Produkteigenschaft. Prüfmuster 1 ist ein synthetisches Produkt zur kutanen Anwendung. Da es aufgrund seines Bestandteils Salicylsäure antimikrobiell wirkt, liegen die Spezifikationen zwischen 10 (TYMC) und 100 (TAMC) KBE / g. Die Probenverdünnung für TYMC musste 1:100 gewählt werden, da das Produkt die Testorganismen bei einer 1:10 Verdünnung hemmt und keine Ergebnisse nachzuweisen waren. Um den Akzeptanzkriterium zu entsprechen wurden 10 ml der Probenverdünnung angeimpft. Dabei entsteht ein Verdünnungseffekt bei dem das selbe Verhältnis entsteht, wie bei der 1:10 Verdünnungsstufe und einem Volumen von 1 ml.

Anders bei den Prüfmustern 2 und 3. Als Naturprodukte besitzen sie eine gewisse Grundkontamination. Die Spezifikationen für TAMC und TYMC des Prüfmusters 2 liegen aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaft über denen des Prüfmusters 3 ohne diese Wirkung. Prüfmuster 2 wird zusätzlich mit kochendem Wasser versetzt.

Um das Qualitätssystem zu unterstützen wird eine detaillierte Dokumentation von Ergebnissen und Auswertung gefordert. Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, dass Produktvalidierungen nicht zu verallgemeinern sind. Analytische Methoden müssen gemäß den Produkteigenschaften angepasst werden. Es wurde durch die Veränderung bzw. Anpassung der Methode, in Übereinstimmung mit der Ph. Eur., die endgültige Optimierung der angewendeten Methode für das jeweilige Produkt erreicht.

6.4.3 Spezifizierte Mikroorganismen

Für das Prüfmuster 1 wurden die spezifizierten Testorganismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* zusätzlich validiert. Bei dem Prüfmuster 1 handelt es sich um eine Salbe zur Anwendung auf der Haut (kutan). Da es sich bei den besagten Organismen um typische Hautkeime handelt, werden diese im Produkt nachgewiesen. Beide Mikroorganismen sind Auslöser von eitrigen Wundinfektionen und dürfen somit in Präparaten, zur Anwendung auf der Haut, nicht enthalten sein. Da der Organismus *Staphylococcus aureus* in der Umwelt sehr verbreitet ist, ist er gegen vielerlei Wirkstoffe resistent. Im Folgenden werden die biochemischen Prinzipien erläutert, die zu den im Ergebnisteil dargestellten Resultaten führen [URL-7].

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027:

Die CASO-B. weist nach entsprechender Inkubation eine Trübung auf. Der Testorganismus fällt im Nährmedium als Niederschlag aus.

Auf Cetrimid-Agar konnten, wie im Anhang Teil 1 illustriert, blaugrüne Kolonien bestätigt werden. Cetrimid-Agar ist das, gemäß der Ph. Eur. 2.6.13, anzuwendende Selektivmedium zur Isolation von *Pseudomonas aeruginosa*. Die blaugrüne Färbung der Kolonien entsteht aus der Umwandlung von Cetrimid in Ammoniak [URL-8].

Beim Ansatz von 10 ml Produktlösung in 100 ml CASO-Bouillon wurde mit der angewendeten Methode der Teststamm *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen.

Die Parameter Richtigkeit, Bestimmungsgrenze, RoRef und Selektivität können für die angewendete Methode bestätigt werden.

Staphylococcus aureus ATCC 6538:

Die CASO-B. weist nach entsprechender Inkubation eine Trübung auf. Der Testorganismus fällt im Nährmedium als Niederschlag aus.

Gemäß der Ph. Eur. 2.6.13 erfolgt die Isolation des Testorganismus auf dem Selektivmedium MKP-Agar. MKP-Agar besitzt eine hohe Konzentration an Natriumchlorid, was das Wachstum anderer Mikroorganismen verhindert. Staphylokokken bauen das enthaltene Mannitolsalz ab, und erhöhen somit den pH Wert, der die Farbänderung des Agar zu gelb hervorruft. Es entstehen große Kolonien mit gelbem Hof [URL-9].

Die Prüfmuster 2 und 3 sind Naturprodukte zur oralen Anwendung. Aus diesem Grund werden die Mikroorganismen *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* nachgewiesen. Beide Organismen sind die häufigsten Auslöser für Darminfektionen. Vor allem der Testorganismus *Salmonella spp.* führt zu den meisten „*Lebensmittelbedingten Darminfektionen*“. Bei einer Kontamination von etwa 1000 KBE / g Lebensmittel kann eine Infektion, durch den besagten Organismus, nicht ausgeschlossen werden [URL-10]. *Escherichia coli* ist Bestandteil unserer natürlichen Darmflora. Außerhalb des Darms ist er jedoch, durch seine Eigenschaft Harnwegsinfektionen auszulösen, bekannt. Der Stamm *Enterohämorrhagische Escherichia coli*, auch bekannt als EHEC, erlangte im Jahr 2011 traurige Berühmtheit, indem er Auslöser von blutigem Durchfall und Nierenschäden war. Somit löste er die größte Krankheitswelle, verursacht durch EHEC, in Deutschland aus [URL-11].

Im Folgenden wird das biochemische Prinzip der Selektivmedien erklärt, die zum Nachweis der Testorganismen *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*, gemäß der Ph. Eur. 2.6.13, eingesetzt wurden.

Escherichia coli ATCC 8739:

Nach Inkubation der mit *Escherichia coli* ATCC 8739 versetzten CASO-B., in Anwesenheit des Produkts 2, kann durch Ausfällungsprozesse des Teststammes eine Trübung beobachtet werden.

Die getrübe Suspension wurde in MacConkey-Bouillon (MCB) überführt. Es kann eine Farbänderung zu gelb bestätigt werden. Die MCB fördert das Wachstum von *E. coli*, durch das enthaltene Gelatine-Pepton. Ein weiterer Bestandteil der Bouillon ist Laktose. Laktose wird von dem Organismus als Kohlenstoff- und Energielieferant, zur Unterstützung des Wachstums, verwendet. Der Verbrauch von Laktose führt zu einer Farbänderung von violett zu gelb, aufgrund des entstandenen sauren Milieus [URL-12].

Nach Ausstrich der Suspension auf MacConkey-Agar (MCA) können rote Kolonien mit trübem Hof beobachtet werden. MCA enthält ebenfalls Laktose, der durch den gramnegativen und laktosepositiven Testorganismus *E. coli* abgebaut wird. Der Abbau der Laktose und der enthaltene pH-Indikator Neutralrot (dringt in die lebenden Zellen ein und färbt diese in saurem Milieu bei einem pH-Wert < 5 rot) führen zu der Ausbildung roter Kolonien. Andere gramnegative Mikroorganismen wachsen farblos. Grampositive Teststämme werden durch das enthaltene Gallensalz gehemmt. Somit ist MCA, das nach der Ph. Eur. 2.6.13, vorgeschriebene Selektivmedium zur Isolation von *E. coli* [URL-13].

Beim Einsatz von 10 ml Probenlösung in 100 ml CASO-B. konnte der Testorganismus *Escherichia coli* in Anwesenheit des Prüfmusters 2 erfolgreich bestätigt werden. Die Parameter Richtigkeit, Robustheit, Bestimmungsgrenze und die Selektivität können, wie den Ergebnistabellen zu entnehmen ist, anerkannt werden.

Salmonella typhimurium ATCC 14028:

Nach Bestätigung einer Trübung der CASO-B. wurde die Suspension in RVS-Bouillon überführt. RVS-B. ist ein flüssiges Nährmedium zur selektiven Anreicherung von *Salmonella spp.* Das enthaltene Sojapepton wirkt auf den Organismus *Salmonella typhimurium* wachstumsfördernd. Bestandteile wie Magnesiumchlorid oder Malachitgrün wirkend inhibierend auf entstehende „Begleitflore“. Der niedrige pH-Wert der Bouillon erhöht die Selektivität der Organismen [URL-14].

Durchscheinende Kolonien sind das Ergebnis des Ausstrichs auf XLD-Agar. Dabei entsteht häufig ein schwarzes Zentrum innerhalb der Kolonien. Der Abbau von Xylose und Laktose sind stattfindende Reaktionen während der Inkubation. Zudem wird der Bestandteil Natriumthiosulfat als aktive Substanz im Medium eingesetzt. Das enthaltende Ammoniumeisen (III)- citrat bilden den Indikator für die Bildung von H₂S. Gemäß der Ph. Eur. 2.6.13 wird XLD-Agar als Selektivmedium zur Isolation von *Salmonella* vorgeschrieben [URL-15].

Für die angewendete Methode beim Ansatz von 25 g Produkt in 250 ml CASO-B. können die Parameter Richtigkeit, RoRef, LOQ und Selektivität für den Teststamm *Salmonella typhimurium*, in Anwesenheit des Produkts, bestätigt werden.

Prüfmuster 3, wurde neben den aufgeführten spezifizierten Mikroorganismen, auf galletolerante gramnegative Bakterien untersucht. Zur besagten Gruppe zählen die Teststämme *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die Testorganismen repräsentieren die Gruppe der *Enterobacteriaceae*. Neben Wundinfektionen löst *Pseudomonas aeruginosa*, gleich *E. coli*, Harnwegsinfektionen aus. Im Gegensatz zum Prüfmuster 2, wird Prüfmuster 3 nicht mit kochendem Wasser vor dem Verzehr behandelt und besitzt keine antimikrobielle Wirkung. Der Einsatz von kochendem Wasser reduziert die Zahl der Kontaminaten. Prüfmuster 3 bleibt diese Reduktion vorbehalten. Aus diesem Grund schreibt die Ph. Eur. vor, diese Arzneimittel der Kategorie „pflanzliche Arzneimittel; Produkte, die vor Verabreichung nicht mit kochendem Wasser versetzt werden“ zu zuordnen. Pflanzliche Arzneimittel müssen diesen vorgegeben Kategorien der Ph. Eur. entsprechen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse, nach Anreicherung und Selektion der Organismen, biochemisch erläutert [Ph. Eur. 2.6.13].

Qualitativer Nachweis galletolerante gramnegative Mikroorganismen:

Für den qualitativen Nachweis galletoleranter gramnegativer Mikroorganismen wurden 10 ml der vorinkubierten Suspension (Medium: CASO-B.) mit 90 ml Mossel-Bouillon aufgefüllt und 48 h inkubiert. Mossel-Bouillon wird als selektives Anreicherungsmedium für die besagte Gruppe von Mikroorganismen gemäß der Ph. Eur. 2.6.13 verwendet und liefert nach geforderter Inkubation eine Trübung der Nährbouillon. Mossel enthält wachstumsförderndes Pepton und Laktose, welches zusätzlich als Energiequelle fungiert. Der Bestandteil Brilliantgrün sorgt für die Hemmung entstehender „Begleitflora“. Die Bouillon besitzt ein sehr stark gepuffertes System, um das Absinken des pH-Wertes und eine damit verbundene Reduktion des Wachstums zu vermeiden [URL-16].

Nach Ausstrich der Suspension auf dem Selektivmedium (VRBD-Agar) können rote Kolonien nachgewiesen werden. Durch die Säurebildung aus der im Medium enthaltenen Glucose bilden sich diese rotgefärbten Kolonien, die von einem Gallensäureniederschlag umrundet werden [URL-17].

Quantitativer Nachweis galletoleranter gramnegativer Mikroorganismen:

Bei der Auswertung des quantitativen Nachweises erfolgt die Ermittlung der wahrscheinlichen Bakterienanzahl. Für die Bestimmung wird die Tabelle 41 herangezogen.

Tabelle 41: Quantitative Bestimmung galletoleranter gramnegativer Organismen [Ph. Eur. 2.6.13]

Ergebnisse der jeweiligen Verdünnungsstufen				
0,1 g bzw. 0,1 ml (Entspricht 1 ml Ansatz)	0,01 g bzw. 0,01 ml (Entspricht 0,1 ml Ansatz)	0,001 g bzw. 0,001 ml (Entspricht 0,01 ml Ansatz)	0,0001 g bzw. 0,0001 ml (Entspricht 0,001 ml Ansatz)	Wahrscheinliche Anzahl Bakterien/g bzw. ml Produkt
+	+	+	+	$>10^4$
+	+	+	-	$<10^4$ und $>10^3$
+	+	-	-	$<10^3$ und $>10^2$
+	-	-	-	$<10^2$ und >10
-	-	-	-	<10

Aus der Tabelle 41 ergeben sich folgende wahrscheinliche Bakterienanzahlen für die einzelnen Test entsprechend der angeimpften Testorganismen (Siehe Tabelle 42):

Tabelle 42: Auswertung qualitativer Nachweis galletoleranter Bakterien

Organismus \ Test	Test 1 [Wahrscheinliche Anzahl Bakterien / g Produkt)	Test 2 [Wahrscheinliche Anzahl Bakterien / g Produkt)	LOQ [Wahrscheinliche Anzahl Bakterien / g Produkt)	RoREF [Wahrscheinliche Anzahl Bakterien / g Produkt)
<i>Escherichia coli</i>	$<10^3$ und $>10^2$	$<10^3$ und $>10^2$	$<10^2$ und >10	$<10^3$ und $>10^2$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$<10^3$ und $>10^2$	$<10^3$ und $>10^2$	$<10^2$ und >10	$<10^3$ und $>10^2$

Galletolerante gramnegative Organismen werden zusätzlich quantitativ nachgewiesen. In der Routinearbeit wird nur der qualitative Nachweis durchgeführt. Werden besagte Mikroorganismen nachgewiesen, erfolgt zusätzlich der quantitative Nachweis um abzuwägen, wie hoch die wahrscheinliche Anzahl an Bakterien pro g Produkt ist. Übertragen wird die Gruppe der *Enterobacteriaceae* vor allem durch Nahrung. Sie kommen aber auch in der Umwelt vor [Ph. Eur. 2.6.13].

Die entstandene Trübung der Mossier-Bouillon und das Wachstum auf VRBD-Agar kann gleich dem Ergebnissen des qualitativen Nachweises beschrieben werden.

6.8 Reidentifizierung der Testorganismen

Die Reidentifizierung der Testorganismen erfolgt vor jeder Beendigung der Methode, um die Richtigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu bestätigen. Die im Kapitel 5 aufgeführten Kammern der API -Streifen werden im Anhang Teil 1 in den Tabellen E – G zusammengefasst und erläutert, um die stattfindende Reaktion nachvollziehen zu können. Für die Auswertung auf Selektivmedium, wird die Tabelle D des Anhangs Teil 1 herangezogen.

6.8.1 Reidentifizierung von *Aspergillus brasiliensis* und *Candida albicans*

Bei der Herstellung des Lebendpräparats für den Teststamm *Aspergillus brasiliensis* und *Candida albicans* wurde Immersionsöl verwendet, um die Brechung des Lichtes des Mikroskops zu verbessern und ein klares Bild zu erhalten.

Beide Organismen weisen für sich typische Merkmale auf, die in Tabelle 38 zusammengefasst werden.

6.8.2 Reidentifizierung von *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa*

Salmonella typhimurium wurde für die Reidentifizierung auf BPLS-Agar ausgestrichen. Durch das Auftreten rötlich-pinker Kolonien kann der Organismus bestätigt werden. Zur Auswertung wurde die Tabelle D im Anhang Teil 1 hinzugezogen, die gemäß der SOP CUP GMP MIB 08 erstellt wurde.

Pseudomonas aeruginosa zeigt mit dem Auftreten eines bräunlich-roten Niederschlags eine positive Reaktion nach Zugabe der Nessler-Reagenz. *Pseudomonas* produziert während der Inkubation in Acetamid-Bouillon, aus dem Enthaltenen Acetamid, Ammoniak. Nessler-Reagenz besteht aus Kaliumtetraiodomercurat (II), welches mit dem entstandene Ammoniak einen Farbkomplex bildet [URL-18].

6.8.3 Reidentifizierung mit API-Streifen

Entsprechend der Karten (Dargestellt im Anhang Teil 1 Abbildung E, F und G) erfolgte die Eingabe der durch Addition berechneten Werte, in das Programm „APIweb“. Folgende Wahrscheinlichkeiten wurden von dem Programm „APIweb“ für den jeweiligen Testorganismus berechnet (Siehe Tabelle 43):

Tabelle 43: Auswertung APIweb

Organismus	Wahrscheinlichkeit für das Austreten des gesuchten Organismus
<i>Escherichia coli</i>	94,7 %
<i>Bacillus subtilis</i>	99,9 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	96,9 %

7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK DER VALIDIERUNG MIKROBIOLOGISCHER METHODEN

Die praktische Laborphase in der „CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH“ hat gezeigt, dass Methodenstabilität und Verallgemeinerung für bestimmte Produkte nicht gegeben sind. Es ist notwendig das Verfahren für jedes Produkt zu validieren und eventuelle Anpassungen zu starten, um es für den Routinebetrieb konform zu machen. Die Aussage, Verwendung, Anforderung und Zusammensetzung jedes Produktes ist anders, somit muss jedes Produkt individuell validiert werden.

Grundlage für die Durchführung bildet die Erstellung frischer Bakterienkulturen und der Test auf Bioburden, der die Grundkontamination des Produktes wiedergibt, anhand derer die Probenverdünnung ermittelt wird. Die analytischen Kenngrößen Richtigkeit, Präzision, Selektivität, Robustheit und Bestimmungsgrenze wurden erfolgreich in Anwesenheit der Produkte untersucht. Dabei wurde die Gesamtkeimzahl bestimmt und spezifizierte Mikroorganismen, gemäß den Anforderungen des Produkts, nachgewiesen. Um die Resultate und deren Richtigkeit zu bekräftigen, findet am Ende der Durchführung einer jeden Methode, die Identifizierung der ermittelten Mikroorganismen statt.

Um den Qualitätsstandard gerecht zu werden, wurden alle Ergebnisse und Durchführungsdetails, gemäß der Anforderung des EU-GMP-Leitfadens, dokumentiert.

Ergeben sich Veränderungen in der Zusammensetzung der Präparate, muss die Methode revalidiert werden, um den Zustand des Verfahrens aufrecht zu erhalten. Eine Revalidierung wird durchgeführt, wenn es zu einer Änderung am Verfahren oder Produkt kommt, die direkten Einfluss auf die Produktqualität und somit weitreichenden Einfluss auf den Verbraucher, hat [Oechslein, 2009].

Richtlinien und Regularien unterstützen die fehlerfreie Durchführung von Methoden zur Validierung. Bis Ende Dezember 2013 wird eine Revision des Annex 15 veröffentlicht und bis Oktober 2014 soll die Annahme des Entwurfs „zur Revision des Annex 15“ verwirklicht werden. Dabei fließen Änderungen des GMP-Umfeldes seit der Veröffentlichung des Annex 15, 2001, ein. Große Erwähnung findet die ICH-Leitlinie (International Conference on Harmonisation) Q9 (Qualitätsmanagement) und Q10 (pharmazeutisches Qualitätssystem) und Process Analytical Technologie (PAT). Weitere Aspekte der Revision bilden die „Guideline“ zur Prozessvalidierung und die Änderungen bezüglich des EU-GMP-Leitfadens. Eine „Harmonisierung“ mit weiteren Regularien bezüglich Validierungen, erwähnenswert an dieser Stelle WHO (World Health Organisation) und FDA (Food and Drug Administration), werden angestrebt [URL-19].

Neben gesetzlichen Neuerungen werden fortschrittliche Methoden für Validierungen entwickelt. Es liegen viele verschiedene Produkte mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung vor, die vor der Einführung in den Routinebetrieb, validiert werden müssen. Zukünftig werden Produkte in Produktgruppen eingeteilt, die jeweils ähnliche Eigenschaften besitzen. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Bracketing“. Bracketing ist ein risikobasierendes Verfahren (nach Q9 und Q10 des ICH-Leitfadens) zur Aufwandsminimierung. Es wird der Fall der Gruppe ausgewählt, der dem Worst Case (Der am ungünstigsten anzunehmende Fall) entspricht. Dieses Produkt wird repräsentativ für die gesamte Gruppe validiert [URL-20].

Das zweite erwähnenswerte Beispiel zur Verbesserung der Validierungsdurchführung ist die „Schnellmethode auf Basis der Real-Time-PCR“. Die „molekularbiologische Schnell-Analytik“ soll für den Nachweis in der Routinearbeit verwendet werden. Allgemeines Ziel der Methode ist die zügige und belegte Ermittlung von Kontaminaten, sowie die rechtzeitige Einleitung von Maßnahmen zum „Verbraucherschutz“. Die Vorteile einer Schnellmethode beziehen sich vor allem auf die zeitliche Einsparung und den geringen Arbeitsaufwand während der Durchführung, um schnellstmöglich Ergebnisse zu erhalten und Gegenmaßnahmen erwägen zu können [URL-10].



Teil 2

Frau Daniela Taraba

**Validierung eines Excel-
Arbeitsblattes zur mikrobiellen
Wertbestimmung von Antibiotika
im GMP-pflichtigen Bereich**

Mittweida, 2013

8 ZIELSTELLUNG TEIL 2

Ziel dieser auf Excel basierenden Validierung computergestützter Systeme im GMP-pflichtigen Bereich, ist zunächst die Risikobewertung und Aufstellung von Maßnahmen zur Vermeidung zukünftiger Komplikationen. Auf Grundlage dessen wird auf die Umsetzung der Validierung in der Praxis eingegangen. Die Validierung der zuvor erstellten Excel-Arbeitsblätter soll die Zuverlässigkeit, Fehlerfreiheit und Richtigkeit der Formeln und Funktionen bestätigen. Zudem sollen potenzielle Fehlerquellen aus der Risikoanalyse durch geeignete Maßnahmen behoben werden. Anhand dreier Beispiele werden die Excel-Arbeitsblätter kontrolliert und die Ergebnisse bestätigt. Ausgabezellen werden gesperrt und farblich von Eingabezellen unterschieden.

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 Regularien

Folgende Regularien werden bei Computervalidierung des Excel-Sheets einbezogen:

- **EU-GMP-Leitfaden Annex 11**
- **PIC/S-Leitfaden PI 011-2** „Gute Praxis für computergestützte Systeme in geregelten ,GXP-Umgebungen““
- **Kapitel 5.3** „Statistical analysis“ der Ph. Eur.

9.2 Spezifikationen

- Dokumentierte Formeln und Funktionen müssen mit den beschriebenen Gleichungen der SOP CUP GMP MIB 51, die gemäß der Ph. Eur. 5.3 erstellt worden, übereinstimmen.
- Ergebnisse aus der manuellen Berechnung mit Hand, müssen mit denen des Excel-Arbeitsblatts konform sein.
- Zellen die Formeln enthalten müssen gesperrt sein.
- Es muss eine farbige Unterscheidung zwischen den Zelltypen stattfinden.

Zur Berechnung der „*mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika*“ wird der Gehalt an Antibiotika in einer unbekannt Probe ermittelt. Es wird die optische Dichte erfasst (Extinktion). Der Standard wird mit der Probe verglichen.

9.3 Risikoanalyse

Die Risikoanalyse für die Validierung erfolgt nach der „FMEA-Methode“ in Form einer Prüfpunktliste. Es wurde eine Bewertung anhand drei Kriterien und einem Fünfpunktabstufungsprogramm durchgeführt (Tabelle 44) [SOP CUP VAL 132].

Tabelle 44: Bewertungsmaßstab der Risikoanalyse nach FMEA Teil 2 [SOP CUP VAL 132]

Bewertungspunkte	1	2	3	4	5
S: Schwere des Fehlers	niedrig		→		hoch
H: Fehlerhäufigkeit	gering		→		schwer
W: Wahrscheinlichkeit den Fehler zu erkennen	hoch		→		niedrig

Berechnung:

Entsprechend der angewendeten Methoden wurden relevante Prüfpunkte aufgestellt, denen ein potenzieller Fehler zugeordnet wurde. Die Bewertung der Fehlerquellen erfolgte in Anlehnung an die FMEA-Methode mit einem Fünfpunktabstufungsprogramm. Dabei wurden die in Tabelle 44 aufgeführten Kriterien (Bewertungspunkte) unterschieden. Die Punkte der Kriterien pro Fehler wurden multipliziert und ergeben damit die Risikoprioritätszahl (RPZ). Bei einem Ergebnis < 30 (Wert wird betriebsintern festgelegt) wurde der Fehler als technischer Prüfpunkt (TP) deklariert und nicht in die Validierung (V) einbezogen. Bei einem RPZ > 30 fand die Einbeziehung der Parameter in die Validierung statt.

9.4 Programmaufbau

Die Tabellen des Arbeitsblatts wurden für die Druckversion „*Berechnungsvorlage*“ im Microsoft Office Excel 14.0 (2010) geschrieben bzw. die Formel der Ph. Eur Kapitel 5.3 transformiert und den Bezügen zugeteilt. Für die Arbeitsmappe erfolgte die Zusammenstellung von vier Ausdrücken, die der Berechnung der „*mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika*“ (für die Beispiele Gentamycin- und Neomycinsulfat) dienen. Es wurden weitere Registrierkarten in der Anwendung erstellt, auf die der Zugriff mit einem Passwort (Zugang nur für Laborleitung zur Bearbeitung) beschränkt wurde. Diese Karten unterstützen den Sheet, haben jedoch keinen direkten Einfluss auf die Berechnungselemente und somit keine Bedeutung für die Validierung der „*Berechnungsvorlage*“ (Registrierkarten werden in Abbildung 10 dargestellt).



Abbildung 10: Registrierkarten der Excel-Anwendung

Aufgeführt werden die erstellten Registrierkarten. Die „*Berechnungsvorlage*“ enthält alle Formeln und Funktionen und wird als Ausdruck verwendet.

Um das direkte Öffnen auf die Berechnungsvorlage zu reduzieren, erfolgte die Programmierung, wie folgt, im „*Makros-Visual-Basic-Editor*“. Bei diesem Editor handelt es sich um eine Skriptsprache, mit der definierte und automatisierte Funktionen und Abläufe erstellt werden können. Dazu wurde der Visual-Basic-Editor geöffnet und im Menü „*Projekt-Explorer*“ (Option: Ansicht) der Befehl „*DieseArbeitsmappe*“ ausgewählt. Es öffnete sich ein Eingabefenster, indem die Anweisung „*Workbook*“ und „*Open*“ bestätigt wurden. In Abbildung 11 wird der einzugebende Code dargestellt. Die Programmierung wurde mit der Speicherung der Eingabe beendet. Bei Öffnung der Excel-Anwendung erscheint nun immer die „*Berechnungsvorlage*“ [URL-21].

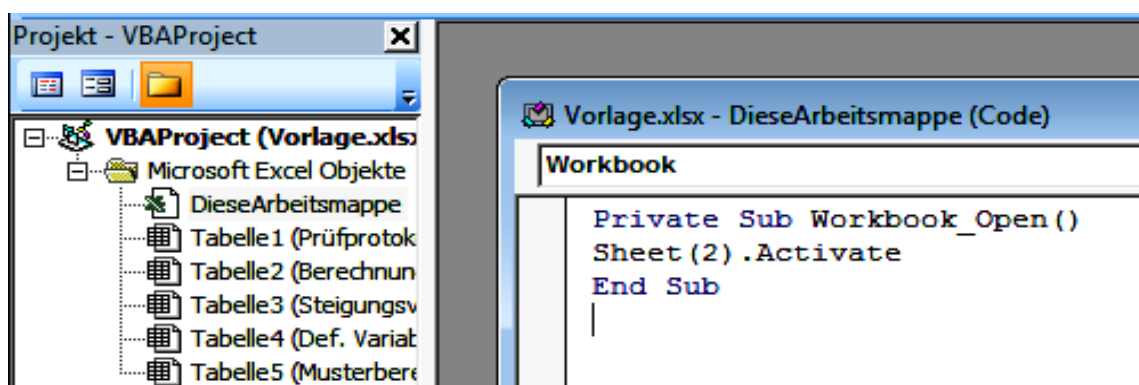


Abbildung 11: Visual-Basic-Editor

Es wird der Code dargestellt, der in den Visual-Basic-Editor eingegeben wurde, um das Öffnen der Excel-Anwendung auf die Berechnungsvorlage (Ausdruck) einzuschränken.

Zusätzlich wurde jeder Zelle der entsprechende Dateityp („*Zahl*“, „*Text*“, „*Prozent*“, „*Datum*“) zugeteilt. (Siehe Anhang Teil 2 Abbildung O, zur Erläuterung der Durchführung).

9.5 Methoden

Die folgenden Methoden wurden nur auf die Registrierkarte „Berechnungsvorlage“ angewendet.

9.5.1 Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln, Erläuterung der Beziehungen zwischen den Formeln

Es erfolgte eine Darstellung der Berechnungsformeln in den Tabellen des Excel-Sheets. Zudem wurden die Gleichungen des Sheets mit denen der SOP CUP GMP MIB 51 (Siehe Berechnungselemente gemäß der Ph. Eur. 5.3) verglichen und gegebenenfalls korrigiert.

9.5.2 Musterberechnung mit Hand

Für jedes Arbeitsblatt der „Berechnungsvorlage“ erfolgte eine Musterrechnung unter Zuhilfenahme eines selbstständig erstellten Excel-Arbeitsblattes. Am Ende wurden die Ergebnisse aus der Musterrechnung mit denen der Excel-Arbeitsblätter verglichen. Die Berechnung erfolgte anhand dreier Beispiele.

9.5.3 Sperrung aller Zellen außer den Eingabezellen und farbliche Unterscheidung der Eingabe- und Ausgabefelder

Um die farbliche Unterscheidung zwischen Eingabe- und Ausgabezellen zu dokumentieren, wurde ein Farbausdruck angefertigt. Es sollte die Signalwirkung der Eingabefelder bewiesen werden.

Um die Sperrung der Zellen für die Ausgabe zu illustrieren, erfolgte ein Bildschirmausdruck. Die Sperrung der Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

- Zu sperrende Zellen wurden markiert.
- In Menüleiste der Excel-Anwendung erfolgte die Auswahl „*Format*“ und die Option „*Zelle sperren*“.
- Diese Option konnte nur ausgeführt werden, wenn das Datenblatt geschützt wurde.
- Dazu wurde mit „*Rechtsklick*“ auf das Datenblatt, im unteren Bereich der Excel-Anwendung, die Option „*Blatt schützen*“ ausgewählt.
- In erscheinenden Auswahlkästchen fand die Bestätigung des Befehls „*Nicht gesperrte Zellen auswählen*“ statt.
- Um das Datenblatt zusätzlich zu sichern, erfolgte die Eingabe eines Kennworts, ohne dieses die Aufhebung der Sicherung nicht möglich wäre.
- Es wurden alle Zellen gesperrt, lediglich die Eingabezellen (grün) wurden für die Eingabe des Typs „*Zahl*“ freigestellt.

10 ERGEBNISSE

10.1 Risikoanalyse nach der FMEA-Methode

Tabelle 45: Prüfpunktliste Risikoanalyse Teil 2 [SOP CUP VAL 132]

Prüfgegenstand /Regularien	Anforderungen / mögliche Fehler	S	H	W	RPZ	TP/V	Maßnahmen
Formeln	Falsche Formel, die zu Berechnungsfehler führt.	5	5	4	100	V	Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln.
	Falsche Zellenbezüge	5	5	4	100	V	Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln, Erläuterung der Beziehungen zwischen den Formeln.
Annex 11 (EU-GMP-Leitfaden)	Überprüfung hinsichtlich Richtigkeit und Zuverlässigkeit	5	5	4	100	V	Musterberechnung per Hand durch unabhängigen Bearbeiter.
	Schutz der Formeln	5	2	4	40	V	Sperrung aller Zellen außer Eingabezellen in Verbindung mit Blattschutz.
	Berechnungen werden mit angezeigter Genauigkeit durchgeführt, angezeigt und ausgedruckt	4	2	3	24	TP	Kontrolliertes Runden bei der Ergebnisangabe, Zwischenergebnisse mit so vielen Dezimalstellen, dass die Einstellung der Rechengenauigkeit nicht relevant ist.
	Schutz gegen Eingabe von Daten des falschen Typs	2	4	3	24	TP	Zelltypen festlegen („Zahl“, „Text“)
	Falsche Version des Excel-Sheets	5	2	4	40	V	Vorlagenname, Versionsnummer müssen auf Ausdruck zu sehen sein.
	Berechnungsfelder nicht gesperrt	5	5	4	100	V	Sperrung aller Zellen außer Eingabezellen in Verbindung mit Blattschutz.
Handhabung	Eingabe in falsche Felder	3	5	4	60	V	Farbige Unterscheidung von Eingabe und Ausgabefeldern.
	Plausibilitätsprüfung der eingegebenen Daten und berechneten Ergebnisse	2	4	3	24	TP	Es erfolgt eine manuelle Plausibilitätsprüfung durch den Bearbeiter und den Laborleiter im Rahmen des Vergleiches der berechneten Ergebnisse mit den festgelegten Spezifikationen.
	Excel-Datei wird mit Daten und evtl. Fehlern auf Laborcomputer gespeichert	3	3	1	6	TP	Excel-Datei liegt als Vorlage „xlt“ auf dem Server, damit kann eine versehentliche Speicherung ausgeschlossen werden.

Für die Risikoanalyse wurden gezielt Schwerpunkte gesetzt, die anhand der drei Kriterien bewertet wurden (Siehe Tabelle 45). Dabei wird festgelegt, welcher potentielle Fehler in die Validierung (V) aufgenommen wird. Am Ende liegt eine Übersicht vor, in der Fehler und Maßnahme gegenübergestellt sind.

10.2 Programmaufbau

Der Sheet „*mikrobielle Wertbestimmung von Antibiotika*“ läuft unter der Microsoft Office Excel Version 14.0 (2010). Die Vorlage „*mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika.xlsx*“ enthält die Tabellen mit entsprechenden Berechnungselementen für den Routinebetrieb und unterstützt den manuellen Dokumentationsprozess.

Leistungsumfang der Berechnungsvorlage:

Die vier Arbeitsblätter der Arbeitsmappe „*Berechnungsvorlage*“ setzen sich wie folgt zusammen:

Arbeitsblatt 1:

Auf dem ersten Arbeitsblatt befindet sich die Eingabetabelle für die drei Parallelproben (Extinktionen der Antibiotika-Bouillon mit Gentamycinsulfat, Bakteriensuspension und Puffer nach Inkubation), sowie Positivkontrolle (Bakteriensuspension und Puffer ohne Genatmycinsulfat nach vorgegebener Inkubation) und dem Blindwert (Bakteriensuspension und Puffer ohne Gentamycinsulfat zum Zeitpunkt 0) in Doppelbestimmung (gemäß der Vorstellung des hd-Plans zum Steigungsverhältnismodell). Es findet die Berechnung des Mittelwertes abzüglich des Blindwertes und die Ermittlung der Wirkung statt. Zusätzlich erfolgt auf der Blattoberseite die Eingabe der Probennummer, des Bearbeiters und des Datums der Erstellung des Ausdrucks.

Arbeitsblatt 2:

Arbeitsblatt zwei enthält die Berechnungen für die Varianzanalyse und deren Parameter, sowie der Eingabetabelle für die Versuchsvariablen d , n und h . Außerdem erfolgt die Untersuchung der Gültigkeit (Signifikanz).

Arbeitsblatt 3:

Das dritte Arbeitsblatt fasst die Ausgabe der Ergebnisse zusammen und kann auf einem Blick ausgewertet werden.

Arbeitsblatt 4:

Blatt vier zeigt die Zusatztabelle zur Berechnung der Varianzursache „*Gesamt*“.

Zur Kontrolle der Ergebnisse, kann eine Musterberechnung im Formblatt (Registrierkarte) „*Musterberechnung Datenblatt*“ durchgeführt werden. Zusätzlich kann die Registrierkarte „*Steigungsverhältnismodell*“ zur Simulation des Dosis-Wirkungsverhältnisses geöffnet werden.

Dateneingabe:

Die Eingabe der individuellen Zellentypen war erfolgreich, die Ausgabe der Ergebnisse entspricht den vorgegebenen Typen und zeigt angemessene Werte. Folgende Zellenbezeichnungen wurden verwendet:

- **Zahl** (Mit Festlegung der individuellen Dezimalstelle je nach Priorität des Wertes)
- **Text** (Für Zellen mit Tabellenkopfbeschreibungen, Variablendefinitionen, Abkürzungen oder Eingabe von Probenummer oder Bearbeiter)
- **Prozent** (Für die prozentuale Ausgabe des R'T-Wertes, zur Erfassung des Ergebnisses und Vergleich mit den Spezifikationen gemäß der Standardarbeitsanweisung SOP CUP GMP MIB 51)
- **Datum** (Eingabe des Bearbeitungsdatums auf dem Arbeitsblatt 1)

Im Anhang Teil 2 in der Abbildung O wird der Verlauf der Festlegung des Zellentyps „Zahl“ festgehalten.

10.3 Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln, Erläuterung der Beziehungen zwischen den Formeln

Tabelle 46: Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln

Gleichungen nach SOP CUP GMP MIB 51	Formeln / Funktionen der Excel-Arbeitsblätter	Spezifikation erfüllt
Gleichung 1: Wirkung		
Extinktionen (Parallelproben) – Blindwert (BW)	Beispiel für Dosis1 des Standard: =B9-H23 B9 – Extinktion 1 H23 – Mittelwert der Blindwerte (Doppelbestimmung)	JA
Positivkontrollen (Doppelbestimmung) – BW	Beispiel Positivkontrolle 1: =B22-H23 B22 – Wert der Positivkontrolle 1	JA
Mittelwert (MW) der Positivkontrollen (PK) abzüglich BW (Doppelbestimmung)	=MITTELWERT(E22:F22) E22/F22 – Positivkontrolle 1 und 2	JA
Mittelwert der drei Parallelproben (PP) abzüglich BW	Am Beispiel Dosis 1 (Standard): =MITTELWERT(E9:G9) E9:G9 – Extinktion 1,2 und 3 bei Dosis 1 abzüglich BW	JA
Aus den obigen Fragmenten ergibt sich folgende <u>Gleichung für die Wirkung</u> : =(MW PK – BW) – (MW PP – BW)	Wirkung am Beispiel Dosis 1 (Standard): =H\$22-H9 H\$22 – MW der PK abzüglich BW H9 – MW der PP für Dosis 1	JA
Gleichung 2: Gesamtsumme je Substanz		
Ps = S1 + S2 + S3 + ... + Sx Pt = T1 + T2 + T3 + ... + Tx	=SUMME(C36:C40) =SUMME(D36:D40)	JA JA
Ps / Pt – Gesamtsumme je Substanz x – Wirkung bei Dosis x S bzw. s – Standard/Referenzsubstanz T bzw. t – Testsubstanz/Probe	C36:C40 – Summe der Wirkungen Referenzsubstanz D36:D40 – Summe der Wirkungen Testsubstanz	
Gleichung 3: Lineares Produkt		
Ls = 1*S1 + 2*S2 + 3*S3 + ... + x*Sx Lt = 1*T1 + 2*T2 + 3*T3 + ... + x*Tx	=1*C36+2*C37+3*C38+4*C39+5*C40 =1*D36+2*D37+3*D38+4*D39+5*D40	JA JA
Ls / Lt – Lineares Produkt	C36 bis C40 – Einzelwerte der Wirkung Referenzsubstanz D36 bis D40 – Einzelwerte der Wirkung Testsubstanz	
Gleichung 4: Achsenabschnitt:		
as = (4*d + 2)*Ps – 6*Ls at = (4*d + 2)*Pt – 6*Lt	=(4*I35+2)*C42-6*C43 =(4*I35+2)*D42-6*D43	JA JA
as bzw. at – Achsenabschnitt d – Anzahl der Dosen ohne BW	I35 – d (Anzahl der Konzentrationen/Dosen) C42/D42 – Ps/Pt C43/D43 – Ls/Lt	
Gleichung 5: Steigung		
bs = 2*Ls – (d+1) *Ps bt = 2*Lt – (d+1) *Pt	=2*C43-(I35+1)*C42 =2*D43-(I35+1)*D42	JA JA
bs bzw. bt – Steigung	C43/D43 – Ls/Lt; I35 – d; C42/D42 – Ps/Pt	

Weiterführung Tabelle 46:

Gleichungen nach SOP CUP GMP MIB 51	Formeln / Funktionen der Excel-Arbeitsblätter	Spezifikation erfüllt
Gleichung 6: Behandlungswert		
$G_s = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + \dots + S_x^2$ $G_t = T_1^2 + T_2^2 + T_3^2 + \dots + T_x^2$ Gs / Gt – Behandlungswert	$=\text{SUMME}(E36:E40)$ $=\text{SUMME}(F36:F40)$ E36:E40 – Summe der Wirkung zum Quadrat (Referenzsubstanz) F36:F40 – Summe der Wirkung zum Quadrat (Testsubstanz)	JA JA
Gleichung 7: Nichtlinearität		
$J_s = G_s - (P_s^2/d) - (3 \cdot b_s^2/d^3 - d)$ $J_t = G_t - (P_t^2/d) - (3 \cdot b_t^2/d^3 - d)$ Js bzw. Jt – Nichtlinearität	$=C46 - (E42/I35) - (3 \cdot E45)/((\text{POTENZ}(I35;3) - I35))$ $=D46 - (F42/I35) - (3 \cdot F45)/((\text{POTENZ}(I35;3) - I35))$ C46/D46 – Gs E42/F42 – Ps/Pt ins Quadrat I35 – d E45/F45 – bs/bt ins Quadrat	JA JA
Gleichung 8-11: Varianzanalyse		
$H_b = (n \cdot h \cdot d^2 - n \cdot h \cdot d) / (h \cdot d^2 - h \cdot d + 4 \cdot d + 2)$ $H_i = n / (4d^3 - 2d^2 - 2 \cdot d)$ $a = a_s + a_t / (h \cdot (d^2 - d))$ $K = (n \cdot (P_s + P_t)^2) / h \cdot d$ Hi – Faktor der Varianzanalyse für das Steigungsverhältnismodell Hb – Faktor der Varianzanalyse für das Steigungsverhältnismodell a – Achsenabschnitt der linearen Regression der Wirkung K – Korrekturterm n – Anzahl der Wiederholungen für jede Behandlung h – Anzahl der Prüfsubstanzen	$= (I37 \cdot I36 \cdot I38 - I37 \cdot I36 \cdot I35) / (I36 \cdot I38 - I36 \cdot I35 + 4 \cdot I35 + 2)$ $= I37 / (4 \cdot I35^3 - 2 \cdot I38 - 2 \cdot I35)$ $= (C44 + D44) / I36 \cdot (I38 - I35)$ $= I37 \cdot ((C42 + D42)^2) / I36 \cdot I35$ I37 – n I36 – h I35 – d C44/D44 – as/at I38 – d ² C42/D42 – Ps/Pt	JA JA JA JA
Gleichung 12-15: Abweichungsquadrate und Freiheitsgrade (FG)		
Regression FG: h $SS_{\text{reg}} = SS_{\text{beh}} - SS_{\text{schn}} - SS_{\text{lin}}$ Schnittpunkt FG: h-1 $SS_{\text{schn}} = H_i \cdot ((a_s^2 + a_t^2) - h \cdot (d^2 - d)^2 \cdot a^2)$ Nichtlinearität FG: h*(d-2) $SS_{\text{lin}} = n \cdot (J_s + J_t)$ Behandlung FG: h*d -1 $SS_{\text{beh}} = n \cdot (G_s + G_t) - K$ SSreg – Regression; SSbeh – Behandlung SSschn – Schnittpunkt; SSlin – Nichtlinearität	Regression FG: =I36 $=D56 - D54 - D55$ Schnittpunkt FG: =I36 - 1 $=C49 \cdot ((E44 + F44) - I36 \cdot (I38 - I35)^2 \cdot (C50^2))$ Nichtlinearität FG: =I36 \cdot (I35 - 2) $=I37 \cdot (C47 + D47)$ Behandlung FG: =(I36 \cdot I35) - 1 $=I37 \cdot (C46 + D46) - C51$ D56 – SSbeh; D54 – SSschn; D55 – SSlin E44/F44 – as/at ins Quadrat C49 – Hi; C50 – a; C47/D47 – Js/Jt C46/D46 – Gs/Gt	JA JA JA JA JA JA JA JA

Weiterführung Tabelle 46:

Gleichungen nach SOP CUP GMP MIB 51	Formeln / Funktionen der Excel-Arbeitsblätter	Spezifikation erfüllt
Gleichung 16-17: Restfehler und Gesamtwert		
Restfehler: FG: $hd(n-1)$ SSrest = SSges – SSbeh Gesamt: FG: $n \cdot h \cdot d - 1$ SSges = $\sum (y-y')^2$ y – Einzelwirkung der Extrinktion x bei Dosis x y' - 0,18025 (Fester Wert gemäß Ph. Eur 5.3) SSrest/SSges – Restfehler / Gesamt	Restfehler: FG: $=(I36 \cdot I35) \cdot (I37 - 1)$ =D58-D56 Gesamt: FG: $=(I37 \cdot I36 \cdot I35) - 1$ =SUMME(S9:U13;S16:U20) D58 – SSges D56 – SSbeh S9:U13 bzw. S16:U20 – $(y-y')^2$	JA JA JA JA
Gleichung 18: F-Verteilung / Test		
Jedes Mittlere Abweichungsquadrat / FG Restfehler	Beispiel für SSschn und SSlin: =F54/B\$57 =F55/B\$57 Wenn Wert > 4,965 = Signifikant Wenn Wert < 4,965 = Nicht Signifikant F54 – Mittleres Quadrat SSschn F55 – Mittleres Quadrat SSlin B\$57 – FG Restfehler	JA JA
Gleichung 19-27: Berechnung Wirkungsverhältnis mit Vertrauensgrenze		
Berechnung gemeinsamer Achsenabschnitt: $a' = a$ Berechnung Steigung der Referenzsubstanz und Testsubstanz: $b's = (6 \cdot Ls - 3 \cdot d \cdot (d+1) \cdot a') / (2 \cdot d^3 + 3 \cdot d^2 + d)$ $b't = (6 \cdot Lt - 3 \cdot d \cdot (d+1) \cdot a') / (2 \cdot d^3 + 3 \cdot d^2 + d)$ Berechnung Wirkungsverhältnis: $R'T = b't / b's$ Berechnung Vertrauensintervall: $= C \cdot R'T \cdot K'$ $V1 = (6 / (n \cdot d \cdot (2 \cdot d + 1))) \cdot (((1 / (d+1)) + (3 / (h \cdot (d-1))))$ $V2 = 3 \cdot (d+1) / (3 \cdot (d+1) + 8 \cdot (d-1))$ $C = bs^2 / (bs^2 - A^2 \cdot R^2 \cdot V1)$ $K' = (C-1) \cdot V2$ a' – gemeinsamer Achsenabschnitt b's / b't – Steigung Standard/Probe R'T – Wirkungsverhältnis C – statistische Größe V1 / V2 – Variationskoeffizient A – Mittleres Abweichungsquadrat des Restfehlers R – Wert für t-Test für den FG des Restfehlers	Berechnung gemeinsamer Achsenabschnitt: D67=C50 Berechnung Steigung der Referenzsubstanz und Testsubstanz: $=(6 \cdot C43 - 3 \cdot I35 \cdot (I35+1) \cdot D67) / (2 \cdot I35^3 + (3 \cdot I38) + I35)$ $=(6 \cdot D43 - (3 \cdot I35 \cdot (I35+1) \cdot D67)) / ((2 \cdot (I35^3)) + (3 \cdot (I38)) + I35)$ Berechnung Wirkungsverhältnis: =E68/D68 Berechnung Vertrauensintervall: =C\$75 \cdot D\$70 \cdot C\$76 $C73 = (6 / (I37 \cdot I35 \cdot (2 \cdot I35 + 1))) \cdot (((1 / (I35 + 1)) + (3 / (I36 \cdot (I35 - 1))))$ $C74 = (3 \cdot (I35 + 1)) / ((3 \cdot (I35 + 1)) + I36 \cdot (I35 - 1))$ $C75 = (D68^2) / ((D68^2) - ((F57^2) \cdot (H59^2) \cdot C73))$ $=(C75 - 1) \cdot C74$ E68/D68 – b't/b's C\$75 \cdot D\$70 \cdot C\$76 – C \cdot R'T \cdot K' C43/D43 – Ls/Lt E79 – WURZEL(+F75) F57 – Mittleres Abweichungsquadrat des Festfehlers H59 – Wert für t-Test für FG des Restfehlers	JA JA JA JA JA JA JA JA JA JA JA

Die Tabelle 46 fasst die Formeln der Standardarbeitsanweisung, erstellt gemäß der Ph. Eur. 5.3, im Vergleich zu den Formeln des angefertigten Excel-Sheets, zusammen. Dabei werden den Zellen entsprechende Variablen zugeordnet, die denen der Vorschrift nachkommen. Die Gleichungen wurden im Vorfeld auf Richtigkeit überprüft, um mögliche Berechnungsfehler zu vermeiden. Es müssen die Bedingungen erfüllt sein, dass die Dosis-Wirkungsbeziehung eine Gerade ergibt und Standard Testsubstanz die y-Achse schneiden. Diese Bedingungen werden in einer zusätzlichen Arbeitsmappe grafisch dargestellt („Steigungsverhältnismodell“).

Die Formeln und Funktionen wurden erfolgreich auf ihre Gültigkeit untersucht und falls notwendig entsprechend den Vorgaben der Ph. Eur. Kapitel 5.3. transformiert. Die Umformung der Berechnung erfolgte, wie in Tabelle 46 Gleichung 1 – 27 dargestellt. Mit Hilfe der Varianzanalyse kann die Gültigkeit überprüft werden (Gleichung 18, Ermittlung der Signifikanz). Am Ende steht die Berechnung des Wirkungsverhältnisses mit Vertrauensgrenze, dargestellt in den Gleichungen 19 – 27.

Die Abbildungen Q und R im Anhang Teil 2 können zum Vergleich mit den in Tabelle 46 dargestellten Formeln des Sheets herangezogen werden.

10.4 Musterberechnung mit Hand

Der Tabelle 47 können die Ergebnisse am Beispiel 1 für die Musterberechnung mit Hand, im Vergleich zur Berechnung mit Hilfe des erstellten Excel-Sheets, entnommen werden.

Tabelle 47: Musterberechnung mit Hand im Vergleich zum Excel-Sheet Beispiel 1

Beispiel	Musterberechnung mit Hand		Berechnung mit Excel-Sheet	
Probe	Standard:	Probe:	Standard:	Probe:
12-02/297-1	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,01318333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,02321667	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,01318333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,02321667
	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,00755000	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,05505000	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,00755000	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,05505000
	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,02235000	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,07458333	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,02235000	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,07458333
	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,05255000	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,12255000	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,05255000	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,12255000
	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,10231667	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,14018333	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,10231667	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,14018333
	Ps: 0,19795000	Pt: 0,41558333	Ps: 0,19795000	Pt: 0,41558333
	Ls: 0,81711667	Lt: 1,54818333	Ls: 0,81711667	Lt: 1,54818333
	as: -0,54780000	at: -0,14626667	as: -0,54780000	at: -0,14626667
	bs: 0,44653333	bt: 0,60286667	bs: 0,44653333	bt: 0,60286667
	Gs: 0,01396053	Gt: 0,04380206	Gs: 0,01396053	Gt: 0,04380206
	Js: 0,00113889	Jt: 0,00017395	Js: 0,00113889	Jt: 0,00017395

Weiterführung Tabelle 47:

Beispiel	Musterberechnung mit Hand	Berechnung mit Excel-Sheet
	Hb: 1,9354839 Hi: 0,0068182 a: -6,9406667 K: 2,8231736 R'T: 1,00696738 Summe(y-y') ² : 6,57245 SSreg: 260,105004 SSschn: -262,758829 SSlin: 0,003938518 SSbeh: -2,649885872 SSrest: 9,222335147 SSges: 6,572449275 V1: 0,01969697 V2: 0,69230769 C: 1,00250290 K': 0,00173278 Mittleres Abweichungsquadrat des FG von SSrest: 0,32560442 Ergebnis: 100,70 % Obere Grenze: 0,04114112 Untere Grenze: -0,03764268	Hb: 1,9354839 Hi: 0,0068182 a: -6,9406667 K: 2,8231736 R'T: 1,00696738 Summe(y-y') ² : 6,57245 SSreg: 260,105004 SSschn: -262,758829 SSlin: 0,003938518 SSbeh: -2,649885872 SSrest: 9,222335147 SSges: 6,572449275 V1: 0,01969697 V2: 0,69230769 C: 1,00250290 K': 0,00173278 Mittleres Abweichungsquadrat des FG von SSrest: 0,32560442 Ergebnis: 100,70 % Obere Grenze: 0,04114112 Untere Grenze: -0,03764268

Der Tabelle 48 können die Ergebnisse am Beispiel 2 für die Musterberechnung mit Hand, im Vergleich zur Berechnung mit Hilfe des erstellten Excel-Sheets, entnommen werden.

Tabelle 48: Musterberechnung mit Hand im Vergleich zum Excel-Sheet Beispiel 2

Beispiel	Musterberechnung mit Hand		Berechnung mit Excel-Sheet	
Probe 12-02/353	Standard:	Probe:	Standard:	Probe:
	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,07403333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,06043333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,07403333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,06043333
	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,10660000	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,08580000	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,10660000	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,08580000
	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,14150000	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,11993333	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,14150000	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,11993333
	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,17643333	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,13926667	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,17643333	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,13926667
	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,02013333	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,16140000	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,02013333	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,16140000
	Ps: 0,070070000	Pt: 0,56683333	Ps: 0,070070000	Pt: 0,56683333
	Ls: 2,42813333	Lt: 1,95590000	Ls: 2,42813333	Lt: 1,95590000
	as: 0,84660000	at: 0,73493333	as: 0,84660000	at: 0,73493333
	bs: 0,65206667	bt: 0,51080000	bs: 0,65206667	bt: 0,51080000
	Gs: 0,10885335	Gt: 0,07084300	Gs: 0,10885335	Gt: 0,07084300
	Js: 0,00002748	Jt: 0,00006008	Js: 0,00002748	Jt: 0,00006008

Weiterführung Tabelle 48:

Beispiel	Musterberechnung mit Hand	Berechnung mit Excel-Sheet
	Hb: 1,9354839 Hi: 0,0068182 a: 15,8153333 K: 12,0498056 R'T:1,00201120 Summe(y-y') ² : 3,01152 SSreg: 1352,797370 SSschn: -1364,308349 SSlin: 0,00262661 SSbeh: -11,510716593 SSrest: 14,522232728 SSges: 3,011516135 V1: 0,01969697 V2: 0,69230769 C: 1,00010263 K': 0,00007105 Mittleres Abweichungsquadrat des FG von SSrest: 0,0,14772097 Ergebnis: 100,20 % Obere Grenze: 0,00802646 Untere Grenze: -0,00788405	Hb: 1,9354839 Hi: 0,0068182 a: 15,8153333 K: 12,0498056 R'T:1,00201120 Summe(y-y') ² : 3,01152 SSreg: 1352,797370 SSschn: -1364,308349 SSlin: 0,00262661 SSbeh: -11,510716593 SSrest: 14,522232728 SSges: 3,011516135 V1: 0,01969697 V2: 0,69230769 C: 1,00010263 K': 0,00007105 Mittleres Abweichungsquadrat des FG von SSrest: 0,0,14772097 Ergebnis: 100,20 % Obere Grenze: 0,00802646 Untere Grenze: -0,00788405

Der Tabelle 49 können die Ergebnisse am Beispiel 3 für die Musterberechnung mit Hand, im Vergleich zur Berechnung mit Hilfe des erstellten Excel-Sheets, entnommen werden.

Tabelle 49: Musterberechnung mit Hand im Vergleich zum Excel-Sheet Beispiel 3

Beispiel	Musterberechnung mit Hand		Berechnung mit Excel-Sheet	
Probe 12-1019-01	Standard:	Probe:	Standard:	Probe:
	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,16938333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,15978333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,16938333	Wirkung 1 bei Dosis 1: 0,15978333
	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,18108333	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,17795000	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,18108333	Wirkung 2 bei Dosis 2: 0,17795000
	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,18158333	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,17535000	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,18158333	Wirkung 3 bei Dosis 3: 0,17535000
	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,18041667	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,18751667	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,18041667	Wirkung 4 bei Dosis 4: 0,18751667
	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,19065000	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,20181667	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,19065000	Wirkung 5 bei Dosis 5: 0,20181667
	Ps: 0,90311667	Pt: 0,90241667	Ps: 0,90311667	Pt: 0,90241667
	Ls: 2,75121667	Lt: 2,80088333	Ls: 2,75121667	Lt: 2,80088333
	as: 3,36126667	at: 3,04786667	as: 3,36126667	at: 3,04786667
	bs: 0,08373333	bt: 0,18726667	bs: 0,08373333	bt: 0,18726667
	Gs: 0,16335199	Gt: 0,16383701	Gs: 0,16335199	Gt: 0,16383701
	Js: 0,00005277	Jt: 0,00008912	Js: 0,00005277	Jt: 0,00008912

Weiterführung Tabelle 49:

Beispiel	Musterberechnung mit Hand	Berechnung mit Excel-Sheet
	Hb: 1,9354839 Hi: 0,0068182 a: 64,0913333 K: 24,4496296 R'T: 0,99994819 Summe(y-y') ² : 5,32346 SSreg: 22382,022097 SSschn: -22405,490585 SSlin: 0,000425650 SSbeh: -23,468062645 SSrest: 28,791524160 SSges: 5,323461515 V1: 0,01969697 V2: 0,69230769 C: 1,00001996 K': 0,00001382 Mittleres Abweichungsquadrat des FG von SSrest: 0,26599399 Ergebnis: 99,99 % Obere Grenze: 0,00351867 Untere Grenze: -0,00349103	Hb: 1,9354839 Hi: 0,0068182 a: 64,0913333 K: 24,4496296 R'T: 0,99994819 Summe(y-y') ² : 5,32346 SSreg: 22382,022097 SSschn: -22405,490585 SSlin: 0,000425650 SSbeh: -23,468062645 SSrest: 28,791524160 SSges: 5,323461515 V1: 0,01969697 V2: 0,69230769 C: 1,00001996 K': 0,00001382 Mittleres Abweichungsquadrat des FG von SSrest: 0,26599399 Ergebnis: 99,99 % Obere Grenze: 0,00351867 Untere Grenze: -0,00349103

Um die Richtigkeit zusätzlich zu beweisen, liegt dem Anhang Teil 2 Abbildung H – M, die Musterberechnung mit Hand und die Berechnungen des Excel-Sheets vor.

10.5 Sperrung aller Zellen außer den Eingabezellen und farbliche

Unterscheidung der Eingabe- und Ausgabefelder

10.5.1 Sperrung aller Zellen außer der Eingabezellen

Die Sperrung der Zellen verlief erfolgreich (Siehe Anhang Teil 2 Abbildung N). Ist das Dokument mit einem Passwort versehen, so kann lediglich die Eingabe der Ergebnisse in der grün markierten Eingabefeldern erfolgen. Ausgabezellen können nicht ausgewählt werden. Somit sind alle Zellen, außer Eingabebereiche, geschützt. Weder die Änderung von Formeln oder Bezügen, noch die Erstellung neuer Spalten ist möglich. Nur wenn die Sperre durch Eingabe eines Passwortes gelöst wird, kann eine Bearbeitung der Mappe stattfinden.

Im Anhang Teil 2 Abbildung N befinden sich die Fotodokumentation zur Sperrung der „Berechnungsvorlage“.

10.5.2 Farbliche Unterscheidung der Ein- und Ausgabezellen

Die farbliche Unterscheidung von Eingabe- und Ausgabebereichen wird im Anhang Teil 2 Abbildung P illustriert. Folgende farbliche Zuordnungen haben sich für das Arbeitsblatt „*Berechnungsvorlage*“ ergeben:

- Eingabezellen werden grün markiert.
- Ausgabezellen sind weiß.
- Tabellenköpfe oder Zellen mit Beschreibungen werden grau untermalt.
- Festwerte wie t-Wert, y' , p-Wert usw. werden rot dargestellt.
- Ausgabefelder die Ergebnisse entsprechend der SOP-Gleichungen ausgeben, werden weiß mit blauer Schrift dargestellt.
- Zur genaueren Erläuterung einiger Werte wurden Kommentare eingefügt, die den Ursprung des Wertes erklären.

11 AUSWERTUNG UND DISKUSSION

11.1 Risikoanalyse

Die Risikoanalyse umfasst alle relevanten Risiken und gibt Möglichkeiten zur Begrenzung an. Es erfolgte eine grobe Aufstellung der potentiellen Fehlerquellen, die Datenintegrität und Qualität beeinflussen können. Anhand der Berechnung der RPZ wurden die Parameter in die Validierung einbezogen oder als technischer Prüfpunkt deklariert. Durch die Einbeziehung dieser Maßnahmen in die Durchführung, hat die Risikoanalyse direkten Einfluss auf die Erhaltung der Spezifikationen und anschließenden Validierung. Die Maßnahmen werden eingeleitet, um während der gesamten Lebensdauer der Excel-Anwendung, dessen Validität zu garantieren. Hier ist die Regelmäßigkeit der Kontrollen und Abwägung neuer Fehlerquellen, im Laufe des Lebenszyklus des Programms, zu erwähnen. Nach Änderungen muss die Anwendung erneut validiert werden. Nicht nur Fehler, verursacht durch die Entwicklung, sondern auch subjektive Fehler durch den Bearbeiter müssen betrachtet werden. Am kritischsten zu bewerten ist das Löschen von Formeln und Bezügen bzw. die Verfälschung von Bezügen innerhalb der Formeln. Löscht der Anwender ganze Formeln oder baut versehentlich falsche Bezüge ein, ist die Richtigkeit der Ergebnisse nicht mehr gewährt. Dies kann weitreichende Konsequenzen für die praktische Methode haben. Aufgrund von Rechenfehlern besteht die Möglichkeit, dass die Spezifikationen für die „mikrobielle Wertbestimmung“ nicht mehr erfüllt sind und die Messungen wiederholt werden müssen. Außerdem findet keine zusätzliche Kontrolle statt. Man verlässt sich blind auf die vom Programm berechneten Resultate [Trantow, Teil 1, 2010].

11.2 Programmaufbau

Das Programm ist erfolgreich entsprechend der Spezifikationen und anzuwendenden Methoden validiert worden. Es kann für die Routine eingesetzt werden.

Das Arbeitsblatt hilft dem potenziellen Anwender bei der Berechnung der mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika. Die Berechnung liegt komplexen statistischen Kenngrößen, gemäß den Vorschriften der Ph. Eur, zu Grunde. Somit wurde die Anwendung konzipiert und validiert, um die Darstellung der Ergebnisse in der Routine zu vereinfachen. Es wird direkt im Programm angegeben, ob die Spezifikationen für die „mikrobielle Wertbestimmung von Antibiotika“ erfüllt sind. Optional kann die Dosis-Wirkungsbeziehung in der Registrierkarte „Steigungsverhältnismodell“ angezeigt werden, um folgende Bedingungen zu überprüfen:

- Test- und Referenzsubstanz müssen die y-Achse in einem Punkt schneiden
- Die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung ergibt eine Gerade

Entworfen wurde das Programm für die Beispiele Gentamycin- und Neomycinsulfat.

Einzelne Menüpunkte können, trotz der Sperrung, aufgerufen werden. Dabei ist es z.B. möglich die Datei als xlsx oder PDF (Portable Document Format) zu speichern. Für die virtuelle Dokumentation wird das PDF – Format empfohlen. Der Vorteil der PDF besteht in der Anwendbarkeit. Es kann auf jedem

Computer mit jedem Betriebssystem geöffnet werden. Bei dem xlsx-Format besteht die Möglichkeit, dass sich die Arbeitsblätter beim Öffnen, mit z.B. einer älteren Excel-Version, verschieben.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Validierung erläutert.

11.3 Dokumentation der genutzten Excel-Funktionen und Formeln

Der dreiteiligen Ergebnistabelle 46 können die Formeln entnommen werden. Dabei ist ersichtlich, dass die Formeln des Excel-Sheets mit denen der Standardarbeitsanweisung (gemäß der Ph. Eur. 5.3) übereinstimmen. Somit ist die Spezifikation erfüllt.

Im Anhang Teil 2 in den Abbildungen Q und R, ist ein Ausdruck zusammengefasst, in dem die Formeln des Excel-Sheets pro Zelle aufgeführt werden. Diese Auflistung aller Zeller mit Darstellung der angezeigten Formeln und Funktionen kann zum Vergleich mit den Berechnungselementen (Kapitel 1) herangezogen werden.

Für die Ergebnistabelle wurden die Einzelkomponenten zur Berechnung der „mikrobiellen Wertbestimmung von Antibiotika“ aufgeführt. Dabei wurden die Formeln der SOP mit denen der Ph. Eur. Kapitel 5.3, für das Steigungsverhältnismodell anhand des hd-Plans, abgestimmt. Erst dann erfolgte die Transformation der Funktionen für den Excel-Sheet.

Um einige Werte und Formeln innerhalb des Sheets besser verstehen zu können, wurden Kommentare hinterlegt, die es dem Bearbeiter in der Routine erleichtert, eine Auswertung der Ergebnisse durchzuführen.

11.4 Musterberechnung mit Hand

Den Ergebnistabellen 47 – 49 für die Beispiele 1 – 3 kann entnommen werden, dass die Ergebnisse zwischen Musterberechnung mit Hand, durch ein eigens erstelltes Arbeitsblatt, mit denen des Excel-Sheets übereinstimmen. Somit ist die Spezifikation erfüllt.

Dem Anhang Teil 2 liegen zum zusätzlichen Vergleich die Ausdrücke der einzelnen Berechnung vor. Dabei ist anzumerken, dass nur die relevanten Ergebnisse in der Musterberechnung dargestellt sind.

11.5 Sperrung aller Zellen außer den Eingabezellen und farbliche Unterscheidung der Eingabe- und Ausgabefelder

Die Spezifikation für die Sperrung der Ausgabezellen ist erfüllt. Die Fotoreihe im Anhang Teil 2 dokumentiert das Vorgehen und erbringt den Beweis für die Durchführung der Sperrung. Lediglich die grün markierten Felder des Sheets werden zur Eingabe freigeschaltet. Die Sperrung der Ausgabezellen soll die Eingabe fehlerhafter Bezüge oder das Löschen von Formeln verhindern. Sind Funktionen verändert oder gelöscht wurden, kann die Richtigkeit des Ergebnisses nicht mehr gewährleistet werden. Es ist wichtig die Ausgabezellen in Verbindung mit dem Blattschutz zu bringen. Da man nicht jede Berechnung detailliert kontrolliert, verlässt man sich auf das entstandene falsche Ergebnis. Dies hätte weitreichende folgenden für die Dokumentation und Auswertung. Somit ist die Sperrung der Ausgabezellen unabwendbar.

Formatierungen sind dazu geeignet, dem Anwender in der Routine eine gewisse Hilfestellung zu bieten. Dabei ist nicht nur die Sperrung der Ausgabezellen von Vorteil, sondern ebenso die farbliche Unterscheidung, um eine Signalwirkung zu erzielen.

Die Eingabezellen sind grün markiert, um die Option der Werteeingabe zu symbolisieren. Ausgabezellen sind weiß gehalten. Zellen die der Ausgabe SOP-relevanter Ergebnisse dienen, sind weiß mit blauer Schrift gekennzeichnet. Tabellenköpfe oder Beschreibungen sind grau meliert dargestellt und haben somit keine Signalfunktion. Rot markierte Zellen beziehen sich auf feste Werte, bezogen auf die Vorgaben der Ph. Eur. Hier sollte eine regelmäßige Kontrolle zur Aktualisierung durchgeführt werden, um die Richtigkeit der Bezüge zu garantieren. Die farbliche Unterscheidung ist im Detail im Anhang Teil 2 dokumentiert, somit sind die Spezifikationen bezüglich der Farbunterscheidung für die Excel-Anwendung erfüllt.

12 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK DER VALIDIERUNG COMPUTERGESTÜTZTER PROGRAMME

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Validierung eines computergestützten Systems im GMP-pflichtigen Bereich, anhand der Excel-Anwendung für die „mikrobielle Wertbestimmung von Antibiotika“.

Am Anfang jeder Validierung steht der Validierungsplan, der z.B. Informationen zur Risikoanalyse enthält. Im Fokus der Durchführung liegt die Aufstellung möglicher Risiken, sowie die Diskussion und Bewertung der in den Ablauf einzubeziehenden Maßnahmen. Die Methode zur Erstellung der Risikoanalyse ist gleich der einer Validierung mikrobiologischer Methoden. Der Unterschied besteht in der Regelmäßigkeit der Durchführung. Ein computergestütztes Programm im GMP-konformen Umfeld, muss während seines gesamten Lebenszyklus validiert und auf Gültigkeit seiner Berechnungen untersucht werden.

Die folgenden Methoden wurden auf Richtigkeit und Zuverlässigkeit gemäß der Spezifikationen untersucht:

- Dokumentation der genutzten Excel-Formeln und Funktionen, im Vergleich mit denen der Standardarbeitsanweisung
- Musterberechnung mit Hand und anschließenden Überprüfung der Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Excel-Arbeitsblatts (Anhand von drei Beispielen)
- Sperrung der Ausgabezellen und farbliche Unterscheidung

Die Schritte der Excel-Validierung wurden dabei detailliert beschrieben und mit Hilfe von Bildschirmausdrücken dokumentiert.

Die Anwendung wurde gemäß den Vorgaben erstellt und entsprechend der Spezifikationen formatiert.

Beendet wurde die Validierung im Teil zwei mit der Bestätigung aller, für die Anwendung zutreffenden, Spezifikationen. Die Prüfdokumentation war erfolgreich und wird im Anhang Teil 2 dargestellt.

Die Entwicklung und Validierung des Excel-Arbeitsblatts erleichtert den Umgang mit Rohdaten und Ergebnisberechnungen. Dabei steht die unkomplizierte Handhabung und Richtigkeit der Resultate im Vordergrund.

Die Rolle computergestützter Programme zur Dokumentation von Ergebnissen, wird in Zukunft wachsen. Unternehmen sind immer abhängiger von Computersystemen zur Darstellung von Ergebnissen und Rohdaten. Computersysteme unterstützen aktiv das Ordnungssystem und erleichtern die manuelle Dokumentation. Diese Systeme müssen regelmäßig validiert werden, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Der EU-GMP-Leitfaden Annex 11 schreibt bereits eine regelmäßige Überprüfung der Computersysteme vor. Es wird weiter an der Anpassung der periodischen Durchführung von Validierungen gearbeitet, die an das Risikomanagement des Systems angepasst wird. In Abhängigkeit von Parametern wie [URL-22]:

- Produktqualität
- und Datenintegrität

soll der individuelle Rhythmus zur Überprüfung des Systems gefunden werden. Dabei ist der Risikograd entscheidend. Es wird an einer „strukturierten“ Herangehensweise gearbeitet, die den Grad des Risikos einbezieht. Die Aufstellung und Vorschrift standardisierter Bedingungen und Vorgänge ist ein Zeichen für die zunehmende Relevanz der computergestützten Systeme [URL-22].

Weiterhin ist eine Entwicklung der Datensicherung für computergestützte Systeme zu erwarten. Der Annex 11 blieb lange weitgehend unverändert und konnte mit den Stand der Entwicklung nicht mithalten. Seit der Neuerung von 2011 bildet der Annex 11 „*die regulatorische Grundlage zur Anwendung von GMP bei IT-Systemen*“ (Dr. Andreas Mangel). Da sich die Technik rasant weiterentwickelt, sind weitere Neuerungen, die die Validierung standardisieren, unabwendbar [URL-23].

Mit einer Excel-Anwendung werden vielerlei Möglichkeiten zur Berechnung und Darstellung von Ergebnissen und Rohdaten geliefert. In Zukunft werden die Anforderungen an die Richtigkeit und Zuverlässigkeit steigen. Momentan herrscht dahingehend Nachholbedarf. Die Komplexität von Excel wird verbreitet Anwendung finden. Dazu werden Standards erarbeitet, die Abläufe und Realisierungen zur Sicherung der Anwendung liefern. Es werden Formblätter erstellt, die die Planung, Durchführung und Datendokumentation erleichtern. In der Neufassung des EU-GMP-Leitfadens Anhang 11 werden spezielle Vorgaben zur Tabellenkalkulation bereits aufgeführt. Aufgrund von fortwährenden Modernisierungen und Automatisierungen wird eine Anpassung an neue Standards unabwendbar [Tantow, Teil 4, 2010].

SUMMARY

The bachelor report about the topic "*Validation of GMP-relevant processes and methods*" was written in cooperation by "*CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH*".

Validations are processes to document and evidence results. The method disproves that the results are according to the selected specifications. Only validated processes are used during the chore. Validations are an inherent part of quality management. In the assignment two modes of pharmaceutical area validations are figured.

Part 1 illustrates the process and documentation of the results during a validation of microbiological method exemplified by three medicaments. The parameters trueness, accuracy, limit of quantitation (LOQ), robustness and selectivity were investigated and approved. The microbiological count and the specified organisms were determined for every probation. This method has been approved to get used during the chore.

In the second part the validation of a computer based system is illustrated and constituted via Excel-Sheet. It serves to capture and analyses of data's. Formulas are transformed in to an Excel-Sheet. Output segments were locked and optical differ from input segments.

For every method it is necessary to validate individually.

LITERATURVERZEICHNIS

Internetquellen:

URL-1: (Verfügbar am: 12.12.2012) CUP Laboratorien Dr. Freitag: *Historie*.

URL: < <http://www.cup-freitag.de/index.php?pid=9&subpid=3&lang=0&t=Historie> >

URL-2: (Verfügbar am: 30.01.2013). Autor unbekannt: *Konfidenzintervall für den Mittelwert*. 2012

URL: < <http://www.iasor.tu-clausthal.de/Arbeitsgruppen/Stochastische-Optimierung/Applet-sammlung/konfidenz>>

URL-3: (Verfügbar am: 19.02.2013). H. Müller: Lektion 1 – Das Wichtigste vorab: *Was ist Excel überhaupt*.

URL: < <http://www.der-pc-anwender.de/excel-2010-lernen/was-ist-excel.htm>>

URL-4: (Verfügbar am: 30.01.2013). H. Müller: Lektion 5 – Formeln und Funktionen: *Formeln kopieren, relative und absolute Zellbezüge*.

URL: < <http://www.der-pc-anwender.de/excel-2010-lernen/formeln-kopieren.htm>>

URL-5: (Verfügbar am: 10.01.2012) Autor unbekannt: *Teil 4: Anwendung für parametrische Freigabe*

URL:<http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000001707/07_Teil8.pdf?hosts=>

URL-6: (Verfügbar am: 18.02.2013).Autor unbekannt: *Identifizierung von Mikroorganismen*.

URL: < <http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/ue4.pdf> >

URL-7: (Verfügbar am: 20.02.2013).keimtec: *Typische Erreger-Bakteriologie, Mykologie & Virologie*. 2012

URL: < <http://www.keimtec.de/erreger/> >

URL-8: (Verfügbar am: 01.02.2013).heipha Dr. Müller GmbH: *Cetrimid-Agar (Pseudomonas-CN-Agar)*.

URL: < http://www.heipha.de/files/product/de/110e-2-0307_CN-Agar.pdf>

URL-9: (Verfügbar am: 01.02.2013). heipha Dr. Müller GmbH: *Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar – LI*.

URL: < http://www.heipha.de/files/product/de/0128e-1-1109_Mannit-Kochsalz.pdf>

URL-10: (Verfügbar am 18.02.20139). Dr. Ingrid Huber – Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit: *Forschungsprojekt: Etablierung und Validierung molekularbiologischer Nachweismethoden für die häufigsten Lebensmittelpathogene Salmonella spp. sowie thermophile Campylobacter in Lebensmitteln*. 2007

URL: < http://www.lgl.bayern.de/das_lgl/forschung/forschung_lebensmittel/fp_lebensmittel_pathogene.htm >

- URL-11:** (Verfügbar am: 20.02.2013). Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): *Escherichia coli*
URL: < http://www.bfr.bund.de/de/escherichia_coli-54352.html>
- URL-12:** (Verfügbar am: 03.02.2013). heipha Dr. Müller GmbH: *MacConkey-Bouillon nach EP*.
URL: < http://www.heipha.de/files/product/de/526100-2-1207_MacConkey-Bouillon-EP.pdf>
- URL-13:** (Verfügbar am: 03.02.2013). heipha Dr. Müller GmbH: *MacConkey Agar acc. to EP/USP*.
URL: < http://www.heipha.com/files/product/en/0126e-4-e-0411_MacConkey_0.pdf>
- URL-14:** (Verfügbar am: 03.02.2013). heipha Dr. Müller GmbH: *Rappaport-Vassiliadis-Medium (RVS)*.
URL: < http://www.heipha.de/files/product/de/392r-3-1106_Rappaport-Vassiliadis_ISO.pdf>
- URL-15:** (Verfügbar am: 03.02.2013). Carl Roth GmbH + Co. KG.: *Produkt-Datenblatt XLD AGAR - Agarmedium K und empfohlen nach der Harmon. Meth. (Ph. Eur. 6.0), sowie Ph. Eur. 6.3. Zur Isolierung von enteropathogenen Bakterien, insbesondere von Shigella und Salmonella, Ph. Eur. X941. 2011*
URL: < http://www.carlroth.de/media/_de-de/usage/X941.pdf>
- URL-16:** (Verfügbar am: 04.03.2013). heipha Dr. Müller GmbH: *Mosssel-Bouillon (EE-Bouillon)*.
URL: < http://www.heipha.de/files/product/de/2192r-3-1211_EE-Bouillon_1.pdf>
- URL-17:** (Verfügbar am: 04.03.2013). heipha Dr. Müller GmbH: *Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (VRBD)*.
URL: < http://www.heipha.de/files/product/de/0185e-3-0511_VRBD.pdf>
- URL-18:** (Verfügbar am: 04.03.2013). SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin: *Acetamid-Lösung mit Nessler's Reagenz*.
URL: < <http://www.sifin.de/deutsch/produktinfo/acetamid-loesung-nesslers-reagenz-tn1512.pdf>>
- URL-19:** (Verfügbar am: 27.01.2013). Sven Pommeranz: *EMA veröffentlicht Concept Paper zur Revision des Annex 15. 2012*
URL: < [http://www.gmp-navigator.com/nav_news_3425_7328,7766,7678,7706,Z-VLB\\$1,2,2,9,1\\$2,0.html](http://www.gmp-navigator.com/nav_news_3425_7328,7766,7678,7706,Z-VLB$1,2,2,9,1$2,0.html)>
- URL-20:** (Verfügbar am: 20.02.2013). PTS Training Service : *Reinigung und Reinigungsvalidierung mit Workshops und Praktikum für Arzneimittel und Wirkstoffe am 20.-21.09.2011 in Binzen bei Basel. 2011*
URL: < [http://www.pts.eu/\(S\(awam1munummfun552krfc1nt\)\)/Angebot/topic.aspx?kursid=1680&p=38](http://www.pts.eu/(S(awam1munummfun552krfc1nt))/Angebot/topic.aspx?kursid=1680&p=38)>
- URL-21:** (Verfügbar am: 07.02.2013). Martin Althaus: *Die schnellste Methode zum Start von Excel-VBA. 2012*
URL: < <http://www.computerwissen.de/office/excel/artikel/die-schnellste-methode-zum-start-von-excel-vba.html>>

URL-22: (Verfügbar am: 07.02.2013). Bob McDowall: *Change Management: Periodic Reviews bei computerisierten Systemen im Labor ?*. 2012

URL: < [http://www.gmp-navigator.com/nav_news_3092_7339\\$1,2,2,4,1\\$3,0.html](http://www.gmp-navigator.com/nav_news_3092_7339$1,2,2,4,1$3,0.html) >

URL-23: (Verfügbar am: 07.02.2013). Dr. Andreas Mangel: *Neue EG-GMP-Leitfaden Annex 11 "Computerised Systems"*. 2011

URL: < [http://www.gmp-navigator.com/nav_news_2347_6731,6719,6741,6728\\$1,2,2,4,1\\$3,0.html](http://www.gmp-navigator.com/nav_news_2347_6731,6719,6741,6728$1,2,2,4,1$3,0.html) >

Bücher / Zeitschriften:

Axmann, Eickenberg, Lücker, Weidenfeller, Tabori: *Validierungskonzept für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte ohne normgerechte Nachrüstung*. medizin & technik, S. 8 – 11, **2008**

Blumenthal, Rolf: *Validierungspflicht für Software – Nutzung des GAMP 4-Leitfadens für die Entwicklung von Softwareprodukten*. Sonderdruck aus: PROCESS PharmaTEC, Vogel Industrie Medien GmbH & Co. KG, Werum – Software & Systems, S. 1 – 2, **2002**

Herbold, Schmidt: *Validierung von Analyseverfahren*. Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin: Universität Heidelberg, S. 1 – 32, GTFCh-Weiterbildung, **2000**

Leiterer, Matthias: *Validierung von Untersuchungsmethoden in der analytischen Praxis*. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft: Jena, S. 1 – 21, **2008**

Metas (Metrologie und Akkreditierung Schweiz), Autosignatur: EM: *Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie*. Nr. 328.dw,Rev. 00, S. 1 – 19, **2005**

Oechslein, Christine (Novartis Pharma AG): *Von der punktuellen zur kontinuierlichen Validierung – Richtlinien-Entwurf der FDA und Stand der Technik in Europa*. Leitartikel Newsletter Logfile Nr. 25, Maas & Peither AG, Schopfheim, S. 1 – 3, **2009**

Schlegel, Fuchs: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, Auflage 8, S. 678, **2006**

Trantow, Neubert, Neubauer, Jope: **Teil 1:** *GMP-konforme Validierung von Excel-Anwendungen – Risikomanagement und Vorgehensmodelle – unter Berücksichtigung des Entwurfs der Neufassung des Annex 11 zum EU-EMP-Leitfaden*. In: Pharm.Ind. 72, – Wissenschaft und Technik – GMP Expertenforum, Nr. 2, Editio Cantor Verlag: Aulendorf, S. 300 – 309, **2010**

Trantow, Neubert, Neubauer, Jope: **Teil 2:** *GMP-konforme Validierung von Excel-Anwendungen – Risikomanagement und Vorgehensmodelle – unter Berücksichtigung des Entwurfs der Neufassung des Annex 11 zum EU-EMP-Leitfaden*. In: Pharm.Ind. 72, – Wissenschaft und Technik – GMP Expertenforum, Nr. 3, Editio Cantor Verlag: Aulendorf, S. 488 – 497, **2010**

Trantow, Neubert, Neubauer, Jope: **Teil 3: GMP-konforme Validierung von Excel-Anwendungen – Risikomanagement und Vorgehensmodelle – unter Berücksichtigung des Entwurfs der Neufassung des Annex 11 zum EU-EMP-Leitfaden.** In: Pharm.Ind. 72, – Wissenschaft und Technik – GMP Expertenforum, Nr. 5, Editio Cantor Verlag: Aulendorf, S. 874 – 882, **2010**

Trantow, Neubert, Neubauer, Jope: **Teil 4: GMP-konforme Validierung von Excel-Anwendungen – Risikomanagement und Vorgehensmodelle – unter Berücksichtigung des Entwurfs der Neufassung des Annex 11 zum EU-EMP-Leitfaden.** In: Pharm.Ind. 72, – Wissenschaft und Technik – GMP Expertenforum, Nr. 7, Editio Cantor Verlag: Aulendorf, S. 1222 – 1229, **2010**

Gesetze / Standardarbeitsanweisungen (Firmendokumente):

Aide mémoire, Deutscher Inspektionsleitfaden: *Inspektion von Qualifizierung und Validierung in pharmazeutischer Herstellung und Qualitätskontrolle.* Dok.-Nr. 07 12 1104, In: Kleiner GMP-Berater – Regelwerke zur Qualifizierung und Validierung –, Auflage 3, Mass & Peither GMP-Verlag, Schopfheim, 2004

EU-GMP-Leitfaden, Anhang 11: Computergestützte Systeme. Anlage 2 zur Bekanntmachung des Bundesministeriums für Gesundheit zu § 2 Nummer 3 der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung vom 8. August 2011 (BAnz Nr. 125, S. 2901-2906) Europäische Kommission, Revision 1, 2011

EU-GMP-Leitfaden, Anhang 15: Qualifizierung und Validierung. In: Kleiner GMP-Berater – Regelwerke zur Qualifizierung und Validierung, Mass & Peither GMP-Verlag, Schopfheim, 2004

EU-GMP-Leitfaden, Teil1: Leitfaden der Guten Herstellungspraxis, Teil1. Anlage 2 zur Bekanntmachung des Bundesministeriums für Gesundheit zu § 2 Nr. 3 der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung vom 27. Okt. 2006 (Banz. S. 6887), S. 1-59, 2006

ICH (International Conference on Harmonisation): *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.* ICH harmonised tripartite guideline, **Q9: QUALITY RISK MANAGEMENT.** ICH Expert Working Group, Step 4, 2005

Ph. Eur. (Europäisches Arzneimittelbuch), Kapitel **2.6.12: Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Zählung der gesamten vermehrungsfähigen Keime.** Ausgabe 6, S. 210-220, Grundwerk, 2008

Ph. Eur. (Europäisches Arzneimittelbuch), Kapitel **2.6.13: Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Nachweis spezifizierter Mikroorganismen.** Ausgabe 6, S. 220-233, Grundwerk, 2008

Ph. Eur. (Europäisches Arzneimittelbuch), Kapitel **2.6.31: Microbiological examination of herbal medicinal products for oral use under revision.** European Pharmacopoeia 7.0, 2010

- Ph. Eur.** (Europäisches Arzneimittelbuch), Kapitel **5.1.4**: *Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use*. European Pharmacopoeia 7.0, S. 507, 2011
- Ph. Eur.** (Europäisches Arzneimittelbuch), Kapitel **5.1.8**: *Microbiological quality of herbal medicinal products for oral use*. European Pharmacopoeia 7.0, 2011
- Ph. Eur.** (Europäisches Arzneimittelbuch), Kapitel **5.3**: *Statistical analysis of results of biological assays and tests*. Ausgabe 6, S. 571-600, 2008
- PIC/s PI 006-1** (Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme): *Recommendations on validation master plan, installation and operation qualification, non-Steril process validation, cleaning validation*. PIC/S – Sekretariat, 2001, Veröffentlicht in: Kleiner GMP-Berater – Regelwerke zur Qualifizierung und Validierung –, Mass & Peither GMP-Verlag, Schopfheim, 2004
- SOP CUP GMP MIB 08**: *Identifizierung von Referenzstämmen und unbekanntem Mikroorganismen*. Erstellt von: Dr. K. Haase, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 02, S. 1 – 16, 2007
- SOP CUP GMP MIB 51**: *Mikrobielle Wertbestimmung von Gentamycinsulfat*. Erstellt von: Dipl. Biol. S. Werner, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 02, S. 1 – 6, 2008
- SOP CUP ORG 11**: *Validierung mikrobiologischer Methoden*. Erstellt von: Dr. K. Haase, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 02, S. 1 – 8, 2006
- SOP CUP VAL 132**: *Validierung Excel-Arbeitsmappe – Pipettenkalibrierung* –. Verifizierungsprotokoll, Erstellt von: Daniela Taraba, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 02, S. 1 – 8, 2012
- SOP CUP VAL 231**: *Mikrobiologische Untersuchung von Monotee aus Blatt/Blüte/Krautdrogen mit antimikrobiellen Eigenschaften*. Validierungsprotokoll, Erstellt von: Dipl. Biotechnologin K. Gerth, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 25, 2012
- SOP CUP VAL 241**: *Mikrobiologische Untersuchung von halbfesten Zubereitungen mit Salicylsäure*. Validierungsprotokoll, Erstellt von: Dipl. Biotechnologin K. Gerth, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 24, 2012
- SOP CUP VAL 244**: *Mikrobiologische Untersuchung von Monotee aus Frucht/Samendrogen ohne antimikrobielle Eigenschaften*. Validierungsprotokoll, Erstellt von: Daniela Taraba, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 27, 2013
- SOP CUP VALB 231**: *Mikrobiologische Untersuchung von Monotee aus Blatt/Blüte/Krautdrogen mit antimikrobiellen Eigenschaften*. Validierungsbericht, Erstellt von: Dipl. Biotechnologin K. Gerth, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 24, 2012

SOP CUP VALB 241: *Mikrobiologische Untersuchung von halbfesten Zubereitungen mit Salicylsäure.* Validierungsbericht, Erstellt von: Dipl. Biotechnologin K. Gerth, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 24, 2012

SOP CUP VALB 244: *Mikrobiologische Untersuchung von Monotee aus Frucht/Samendrogen ohne antimikrobielle Eigenschaften.* Validierungsbericht, Erstellt von: Daniela Taraba, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 29, 2013

SOP CUP VALP 231: *Mikrobiologische Untersuchung von Monotee aus Blatt/Blüte/Krautdrogen mit antimikrobiellen Eigenschaften.* Validierungsplan, Erstellt von: Dipl. Biotechnologin K. Gerth, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 12, 2012

SOP CUP VALP 241: *Mikrobiologische Untersuchung von halbfesten Zubereitungen mit Salicylsäure.* Validierungsplan, Erstellt von: Dipl. Biotechnologin K. Gerth, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 12, 2012

SOP CUP VALP 244: *Mikrobiologische Untersuchung von Monotee aus Frucht/Samendrogen ohne antimikrobielle Eigenschaften.* Validierungsplan, Erstellt von: Daniela Taraba, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 01, S. 1 – 15, 2013

Zur Vervollständigung der Arbeit wurden folgende Regularien herangezogen, um eine GMP-konforme Durchführung zu garantieren*:

PIC/s PI 007-4: (Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme): *Recommendations on the validation of aseptic processes.* PIC/S – Sekretariat, 2009

PIC/s PI 011-2: (Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme): *Good practices for computerised systems in regulated „GXP“ environment.* PIC/S – Sekretariat, 2004

SOP CUP GMP MIB 06: *Herstellung von Nährmedien.* Erstellt von: S. Werner, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 04, S. 1 – 5, 2011

SOP CUP GMP MIB 10: *Qualitätskontrolle von Nährmedien.* Erstellt von: Dr. K. Haase, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 03, S. 1 -11, 2012

SOP CUP GMP MIB 44: *Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Keimgehaltsbestimmung (Ph. Eur. 2.6.12).* Erstellt von: Dr. K. Haase, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 02, S. 1 – 10, 2010

SOP CUP GMP MIB 45: *Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Nachweis spezifischer Mikroorganismen (Ph. Eur. 2.6.13)“.* Erstellt von: Dr. K. Haase, CUP Laboratorien Dr. Freitag GmbH, Version 02, S. 1 – 11, 2010

* Diese Quellen wurden in dem Text nicht zitiert. Sie wurden für die Durchführung herangezogen.

ANHANGSVERZEICHNIS

Teil 1

Ergebnisse Prüfmuster 3 der 1:10 000 verdünnten Probenlösung

Ergebnisse des qualitativen Nachweises auf spezifizierte Mikroorganismen auf Selektivmedium

Pseudomonas aeruginosa auf Cetrimid-A. für Prüfmuster 1 (Repräsentativ)

Staphylococcus aureus auf MKP-A. für Prüfmuster 1 (Repräsentativ)

E. coli auf MCA für Prüfmuster 2 (Repräsentativ)

Salmonella typhimurium auf XLD für Prüfmuster 2 (Repräsentativ)

E. coli auf MCA für Prüfmuster 3 (Repräsentativ)

Salmonella typhimurium auf XLD für Prüfmuster 3 (Repräsentativ)

Galletolerante Ec (10 ml Ansatz)

Galletolerante Psa (10 ml Ansatz)

Ergebnisse galletoleranter gramnegativer Bakterien in Mossel-Bouillon und auf VRDB für Prüfmuster 3

Escherichia coli (Test 1, Test 2, LOQ, RoRef)

Pseudomonas aeruginosa (Test 1, Test 2, LOQ, RoRef)

Grobidentifizierung von Mikroorganismen

Reidentifizierung auf Selektivmedium (Vergleichstabelle)

Ergebnisse Reidentifizierung von Mikroorganismen

Mikroskopische Reidentifizierung von *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* (Ergebnisse)

Reidentifizierung auf Selektivmedium für *Salmonella* und *Pseudomonas aeruginosa* (Ergebnisse)

Beschreibung der API-Streifen, zum Vergleich mit den Ergebnissen

Positiv- und Negativreaktionen

Ablesetabelle API 20 E (für *E. coli*)

Ablesetabelle API STAPH (für *Staphylococcus aureus*)

Ablesetabelle API 50 CHB (für *Bacillus subtilis*)

Teil 2

Musterrechnung mit Hand

Beispielrechnungen Excel-Sheet

Dokumentation der Zellensperrung

Dokumentation der Bestimmung des Zellentyps am Beispiel „Zahl“

Darstellung der farblichen Unterscheidung

Formeln

Variablenzusammenfassung und Definition gemäß der Ph. Eur. 5.3

Anhang Teil 1

Ergebnisse Prüfmuster 3 der 1:10 000 verdünnten Probenlösung

Wie folgt wird das Ergebnis für TAMC (Test 1) des Prüfmusters 3 dargestellt. Diese Ergebnisse wurden für die weiteren Tests nicht herangezogen. Die Tabelle dient der Erläuterung der Auswahl der Probenverdünnung.

Tabelle A: Ergebnis der 1:10 000 Verdünnung Prüfmuster 3

Prüfmuster 3 1: 10 000 Verdünnung der Probenlösung TAMC										
	Ab	K	Ca	K	Ba	K	Psa	K	Sta	K
Platte 1	57	36	41	52	101	96	18	29	37	33
Platte 2	36	22	42	59	109	79	20	22	34	36
Mittelwert	47	29	42	56	105	88	19	26	36	35
Faktor Präzision	1,6	1,6	1,0	1,1	1,1	1,2	1,1	1,3	1,1	1,1
Wiederfindungs- rate	162 %		75 %		120 %		73 %		103 %	

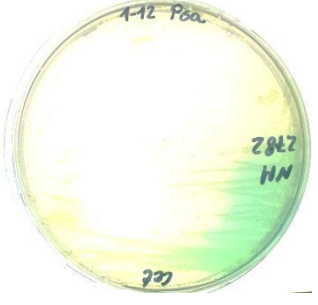
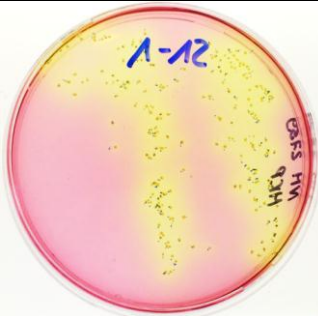

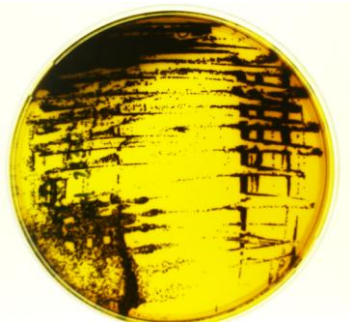
K – Kontrolle

Angaben in KBE / Platte




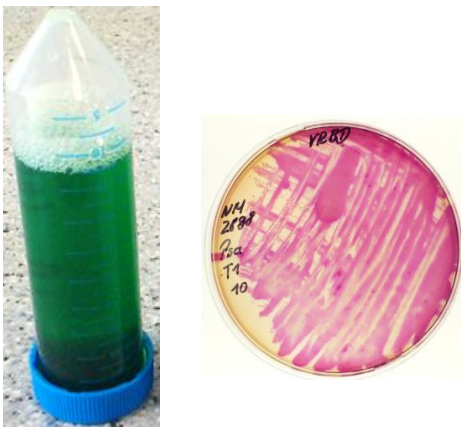
Ergebnisse des qualitativen Nachweises spezifizierter Mikroorganismen auf Selektivmedium

Die Platten zeigen repräsentativ das Wachstum des Testorganismus auf dem entsprechenden Selektiv- bzw. in dem Anreicherungsmedium.

Tabelle B: Fotodokumentation spezifizierter Mikroorganismen (qualitativ)

Prüfmuster und Testorganismus	Beispiel für Wachstum	Beschreibung
Prüfmuster 1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Cetrimid-Agar: Blaugrüne Kolonien Fluoreszierend Alternativ: KING-Agar
<i>Staphylococcus aureus</i>		MKP-Agar: Gelbe Kolonien Gelbfärbung des Agars
Prüfmuster 2		
<i>Escherichia coli</i>		MCA-Agar: Rote Koloniene Trüber Hof
<i>Salmonella typhimurium</i>		XLD-Agar: Farblose bis rote Kolonien Teilweise schwarzes Zentrum Agar evlt. rötlich gefärbt

















Weiterführung Tabelle B:

Prüfmuster und Testorganismus	Beispiel für Wachstum	Beschreibung
Prüfmuster 3		
<i>Escherichia coli</i>		MCA-Agar: Rote Kolonien Trüber Hof
<i>Salmonella typhimurium</i>		XLD-Agar: Farblose bis rote Kolonien Teilweise schwarzes Zentrum Agar evtl. rötlich gefärbt
Galletolerante Ec (10 ml Ansatz)		Mossel-B.: Trübung der Bouillon (hier ist eine sehr starke Trübung zu erkennen) VRBD-Agar: Wachstum rosaroter Kolonien
Galletolerante Psa (10 ml Ansatz)		Mossel-B.: Trübung der Bouillon (hier ist eine sehr schwache Trübung zu erkennen) VRBD-Agar: Wachstum rosaroter Kolonien






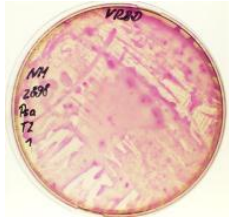





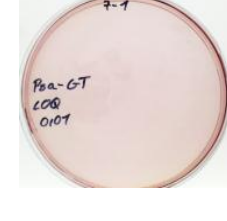




Ergebnisse galletoleranter gramnegativer Bakterien in Mossel-Bouillon und auf VRDB für Prüfmuster 3

Die folgende Fotodokumentation zeigt den Vergleich einer getrübbten Mossel-Bouillon zu einer klaren bzw. den Nachweis des Wachstums auf VRBD-Agar und einem ausbleibenden Wachstum. Es werden, als repräsentative Proben, der 1 ml und 0,01 ml Ansatz dargestellt. Die Ergebnisse beziehen sich auf den quantitativen Nachweis.

Tabelle C: Fotodokumentation des quantitativen Nachweises für galletolerante gramnegative Bakterien

Test	Wachstum am Beispiel: 1 ml Ansatz		Kein Wachstum am Beispiel 0,01 ml Ansatz	
<i>Escherichia coli</i>				
Test 1				
Test 2				
LOQ				
RoRef				

Weiterführung Tabelle C:

Test	Wachstum am Beispiel: 1 ml Ansatz	Kein Wachstum am Beispiel 0,01 ml Ansatz		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Test 1				
Test 2				
LOQ				
RoRef				

Der Kontrollansatz kam zum selben Ergebnis pro Test, wird aber nicht in der Fotodokumentation aufgeführt.

Grobidentifizierung von Mikroorganismen**Tabelle D: Reidentifizierung auf Selektivmedium (Vergleichstabelle) [SOP CUP GMP MIB 08]**

Testorganismus	Nährmedium	Beobachtung
<i>Escherichia coli</i>	MacConkey - Agar	Rote Kolonien, trüber Hof
<i>Escherichia coli</i> (galletolerant)	VRBD - Agar	Rote Kolonien, trüber Hof
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimid - Agar	Grün-blauer Hof Fluoreszierend
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (für Reidentifizierung)	Acetamid-Bouillon + Nessler Reagenz (100 µl)	Wachstum, nach Zugabe Nessler Reagenz → Ammoniakbildung, gelber Niederschlag
<i>Salmonella</i>	XLD- Agar	farblose-rote Kolonien, tw. schwarzes Zentrum, Agar rot
<i>Salmonella</i> (Für Reidentifizierung)	BPLS - Agar	farblose - rote Kolonien, schwarzes Zentrum, Agar orange
<i>Staphylococcus aureus</i>	MKP - Agar	Gelbe Kolonien, Gelbfärbung des Agars

Diese Tabelle wurde gemäß der SOP CUP GMP MIB 08 erstellt und wird zum Vergleich der Ergebnisse bzw. Beurteilung der Richtigkeit herangezogen. Sie gilt als Grundlage für die Reidentifizierung und die Bestätigung der Ergebnisse während des qualitativen/quantitativen Nachweises.

Ergebnisse der Reidentifizierung von Mikroorganismen

Mikroskopische Reidentifizierung von *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis*:

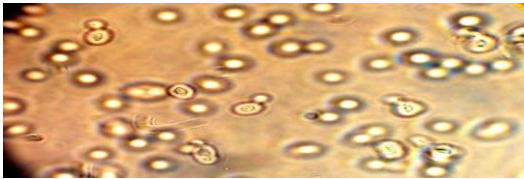


Abbildung A: Mikroskopisches Bild von *Candida albicans*

Es ist das mikroskopische Bild des Testorganismus *Candida albicans* dargestellt. Die ovalen Zellen sind gut zu erkennen.

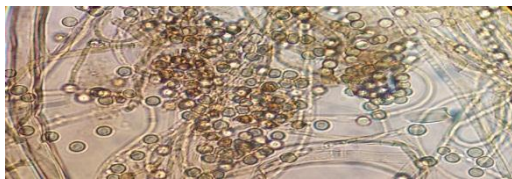


Abbildung B: Mikroskopisches Bild von *Aspergillus brasiliensis*

Es ist das mikroskopische Bild des Testorganismus *Aspergillus brasiliensis* zu sehen. Die schwarzen Sporen sind klar zu erkennen. Ebenso das Myzel.

Reidentifizierung von *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* auf Selektivmedium:

Die Ergebnisse wurden mit der Tabelle D verglichen und bewertet.

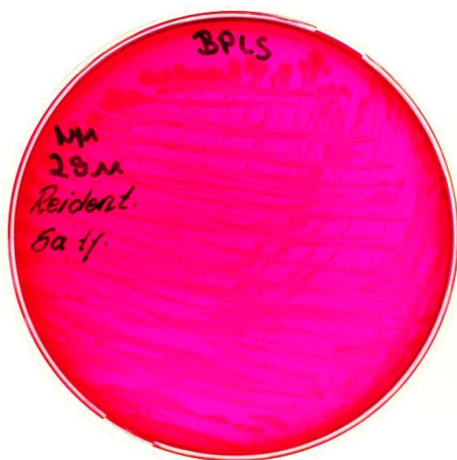


Abbildung C: *Salmonella* auf BPLS-Agar zur Reidentifizierung

Es wird das Ergebnis der Reidentifizierung von *Salmonella typhimurium* auf BPLS-Agar dargestellt. Es sind rosarote Kolonien zu beobachten.



Abbildung D: *Pseudomonas aeruginosa* in Acetamid-Bouillon nach Nessler-Zugabe

Es ist das Ergebnis der Reaktion nach der Zugabe von Nessler-Reagenz zu sehen. Die orange Verfärbung zeigt eine positive Reaktion.

Beschreibung der API-Streifen, zum Vergleich mit den Ergebnissen

Auswertungskarten:

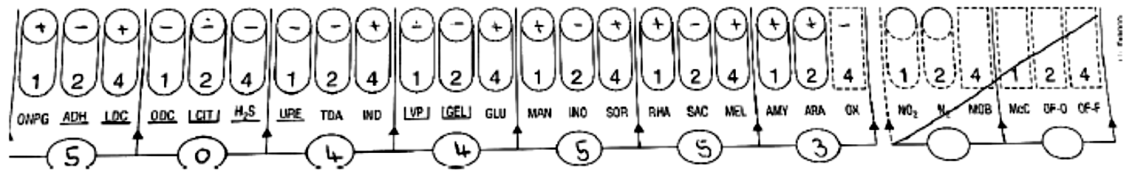


Abbildung E: API 20 E für *Escherichia coli*

Auswertungskarte mit siebenstelligem Code.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
ABH	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABH	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TRY	TRY	TRP	TRP	FIB	EDX	ADP	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	IND	MAN	SOP	MOM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	TRU	MIL	RAF	RAF	AND	GLY	XLT	GEN	TLR	LYX	TAG	DNIC	LEUC	DAR	LAR	ENT	ZNG	SKG		

Abbildung F: API 50 CHB für *Bacillus subtilis*

Auswertungskarte mit siebenstelligem Code.

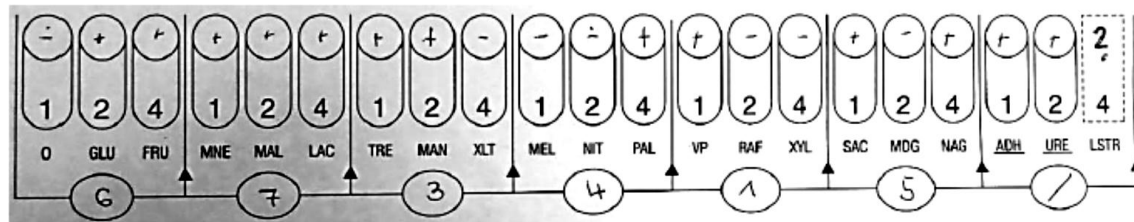


Abbildung G: API Staph für *Staphylococcus aureus*

Auswertungskarte mit siebenstelligem Code.

Ablesetabelle API 20 E [SOP CUP GMP MIB 08]:

Tabelle E: API 20 E

Kammer	Aktive Bestandteile	Vorgang
ONPG	β -Galactosidase	Spaltung von Laktose in Glukose und Galaktose.
ADH	L-Arginin	Reaktion mit Argini-Di-Hydrolase.
LDC	Lysindecaboxylase	Abbaut Lysin zu Cadaverin ab. Bewirkt einen pH-Anstieg in dem säuregepufferten System.
ODC	Ornithine	Ornithindecaboxylase wandelt Ornithin in Putrescin \rightarrow pH Anstieg.
CIT	Trinatriumcitrat	Citratverbrauch bewirkt einen pH-Anstieg.
H2S	Thiosulfat	Schwefelwasserstoff wird aus Thiosulfat gebildet. Schwefelwasserstoff reagiert mit Eisensalzen unter Bildung eines schwarzen Präzipitates.
URE	Harnstoff	Mit Hilfe der Urease wird Harnstoff in Kohlendioxid und Ammoniak gespalten. Ammoniak bewirkt einen pH-Anstieg.
TDA	Tryptophandesaminase	Aus Tryptophan wird Indolbrenztraubensäure, die in Anwesenheit von Eisen-III-Chlorid einen bräunlich-roten Farbkomplex bildet.
IND	L-Tryptophane	Abbau von Tryptophan führt zur Bildung von Indol. Indol und Kovacs-Reagenz bilden einen gefärbten Komplex.
VP	Sodium Pyruvate	Acetoin wird produziert
GEL	Gelantine (bovinen Ursprungs)	Hydrolyse
GLU	D-Glykose	Verbrauch von Kohlenhydrat führt zur Säurebildung und einem anschließenden pH-Rückgang. Der Indikator Bromthymolblau schlägt von blau nach gelb um.
MAN	D-Mannitol	Assimilation von Maltose
INO	Inositol	
SOR	D-Sorbitol	Assimilation von Sorbitol
RHA	L-Rhamnose	Assimilation von Rhamnose
SAC	D-Saccharose	
MEL	D-Meliblase	
AMY	Amygdalin	
ARA	L-Arabinose	Verbrauch von Kohlenhydrat führt zur Säurebildung und einem anschließenden pH-Rückgang. Der Indikator Bromthymolblau schlägt von blau nach gelb um.

Kammerbeschreibung API 50 CHB [SOP CUP GMP MIB 08]:

Tabelle F: API 50 CHB

Kammer	Bezeichnung	Aktiver Bestandteil
0	-	Kontrolle
1	GLY	Glycerin
2	ERY	Eryhthritol
3	DARA	D-Arabinose
4	LARA	L-Arabinose
5	BIB	D-Ribose
6	DXYL	D-Xylose
7	LXYL	L-Xylose
8	ADO	D-Adonitol
9	MDX	Methyl-βD-Xylopyranosid
10	GAL	D-Galaktose
11	GLU	D-Glukose
12	FRAU	D-Fruktose
13	MNE	D-Mannose
14	SBE	L-Sorbose
15	RHA	L-Rhamnose
16	DUL	Dulcitol
17	INO	Inositol
18	MAN	D-Mannitol
19	SOR	D-Sorbitol
20	MDM	Methyl-αD-Mannopyranosid
21	MDG	Methyl-αD-Glucopyranosid
22	NAG	N-Acetylglucosamin
23	AMY	Amygdalin
24	ARB	Arbutin
25	ESC	Esculin/Eisencitrat
26	SAL	Salicin
27	CEL	D-Geliobiose
28	MAL	D-Maltose
29	LAC	D-Lactose
30	MEL	D-Melibiose
31	SAC	D-Saccharose
32	TRE	D-Trehalose
33	INU	Inulin
34	MLZ	D-Melezitose
35	RAF	D-Raffinose
36	AMD	Amidon
37	GLYG	Glycogen
38	XLT	Xylit
39	GEN	Gentioivlose
40	TUR	D-Turanose
41	LYX	D-Lyxose
42	TAG	D-Tagatose
43	DFUC	D-Fucose
44	LFUC	L-Fucose
45	DARL	D-Arabitol
46	LARL	L-Arabitol
47	GNT	Kaliumgluconat
48	2KG	Kalium-2-Ketogluconat
49	5KG	Kalium-5-Ketogluconat

Ablesetabelle API STAPH [SOP CUP GMP MIB 08]:**Tabelle G: API Staph**

Kammer	Aktive Bestandteile	Vorgang
GLU	D-Glykose	Verbrauch von Kohlenhydrat führt zur Säurebildung und einem anschließenden pH-Rückgang. Der Indikator Bromthymolblau schlägt von blau nach gelb um.
FRU	D-Fructose	
MNE	D-Mannose	Assimilation (Mannose)
MAL	D-Maltose	Assimilation (Maltose)
LAC	D-Lactose	Assimilation (Lactose)
TRE	D-Trehalase	Assimilation
MAN	D-Mannitol	Assimilation von Maltose
XLT	Xylit	
MEL	D-Meliblase	
NIT	Kaliumnitrat	Nitrite bilden mit Sulfanilsäure und N,N-Dimethyl-1-Naphthylamin einen roten Komplex.
PAL	2-Naphthyl Phosphate	Alkine Phosphatase (Reaktionsenzym)
VP	Sodium Pyravate	Acetoin wird produziert
RAF	D-Raffinose	Assimilation (Raffinose)
XYL	D-Xylose	Assimilation (Xylose)
SAC	D-Saccharose	
MDG	Methyl-αD-Glucopranosid	
ADH	L-Arginin	Reaktion mit Argini-Di-Hydrolase.
URE	Harnstoff	Mit Hilfe der Urease wird Harnstoff in Kohlendioxid und Ammoniak gespalten. Ammoniak bewirkt einen pH-Anstieg.

Die Tabellen können mit den jeweiligen API-Streifen („Bunte Reihe“) verglichen werden, um die Bedeutung der stattfindenden Reaktionen nachvollziehen zu können.

Anhang Teil 2

Musterberechnung mit Hand

Musterberechnung mit Hand Beispiel 1:

Dosis	Extinktion 1	Extinktion 2	Extinktion 3	Mittelwert - BW	Wirkung	
2 µg/ml	0,6974	0,6967	0,6881	0,53	0,01318333	Standard
2,5 µg/ml	0,6870	0,6989	0,7132	0,54	0,00755000	
3 µg/ml	0,6959	0,6787	0,6801	0,53	0,02235000	
3,5 µg/ml	0,6857	0,6370	0,6414	0,50	0,05255000	
4 µg/ml	0,6281	0,5835	0,6032	0,45	0,10231667	
2 µg/ml	0,6795	0,6847	0,6879	0,52	0,02321667	Probe
2,5 µg/ml	0,6384	0,6561	0,6621	0,49	0,05505000	
3 µg/ml	0,6274	0,6390	0,6316	0,47	0,07458333	
3,5 µg/ml	0,5486	0,6062	0,5993	0,43	0,12255000	
4 µg/ml	0,5323	0,5793	0,5896	0,41	0,14018333	
$\sum (y-y')^2$	0,57245					
d:	5					
h:	2					
n:	3					
y'	0,18025					
Ps:	0,19795000	0,41558333				
Ls:	0,81711667	1,54818333				
as:	-0,54780000	-0,14626667				
bs:	0,44653333	0,60286667				
Gs:	0,01396053	0,04380206				
Js:	0,00113889	0,00017395				
	Standard ↓	Probe ↓				
Hb:	1,9354839					
Hi:	0,0068182					
a:	-6,9406667					
K:	2,8231736					
R'T:	1,00696738	Freiheitsgrade				
SSreg	260,105004	2				
SSschn	-262,758829	1				
SSlin	0,003938518	6				
SSbeh	-2,649885872	9				
SSrest	9,222335147	20				
SSges	6,572449275	29				

Pos. Kontrolle:	0,7030	0,7115
BW	0,1645	0,1539
MW PK/BW	0,54805	0,15920

V1	0,01969697
V2	0,69230769
C	1,00503245
K'	0,00348401
t-Wert	2,086
Mittleres Abweichungsquadrat des Restfehlers	0,46111678

Ergebnis:	100,70%
Spezifikation erfüllt:	≥ 95 % ERFÜLLT
	≤ 105 % ERFÜLLT
Obere Grenze	0,05939385
Untere Grenze	-0,05234198

Zusatztable:

$(y-y')^2$	$(y-y')^2$	$(y-y')^2$
0,26744	0,26672	0,25791
0,25680	0,26900	0,28404
0,26589	0,24845	0,24985
0,25548	0,20862	0,21266
0,20057	0,16261	0,17889
0,24925	0,25447	0,25771
0,20990	0,22843	0,23218
0,19994	0,21045	0,20372
0,13568	0,18143	0,17560
0,12394	0,15924	0,16757

Abbildung H: Musterberechnung mit Hand 1

Dargestellt wird die Musterberechnung mit Hand an einem eigens entworfenen Berechnungsbogen, für das Beispiel 1. Es sind nur die relevanten Ergebnisse dargestellt.

Musterberechnung mit Hand Beispiel 2:

Dosis	Extinktion 1	Extinktion 2	Extinktion 3	Mittelwert - BW	Wirkung
2 µg/ml	0,5292	0,5554	0,5554	0,41	0,07403333
2,5 µg/ml	0,4989	0,5221	0,5213	0,37	0,10660000
3 µg/ml	0,4871	0,4693	0,4812	0,34	0,14150000
3,5 µg/ml	0,4379	0,4542	0,4407	0,30	0,17643333
4 µg/ml	0,4196	0,4153	0,4208	0,28	0,20213333
2 µg/ml	0,5645	0,5496	0,5667	0,42	0,06043333
2,5 µg/ml	0,5400	0,5226	0,5421	0,39	0,08580000
3 µg/ml	0,5001	0,4913	0,5109	0,36	0,11993333
3,5 µg/ml	0,4911	0,4687	0,4845	0,34	0,13926667
4 µg/ml	0,4684	0,4467	0,4628	0,32	0,16140000
$\sum (y-y')^2$	3,01152				
d:	5				
h:	2				
n:	3				
y'	0,18025				
Ps:	0,70070000	0,56683333			
Ls:	2,42813333	1,95590000			
as:	0,84660000	0,73493333			
bs:	0,65206667	0,51080000			
Gs:	0,10885335	0,07084300			
Js:	0,00002748	0,00006008			
	Standard ↓	Probe ↓			
Hb:	1,9354839				
Hi:	0,0068182				
a:	15,8153333				
K:	12,0498056				
R'T:	1,00201120	Freiheitsgrade			
SSreg	1352,797370	2			
SSschn	-1364,308349	1			
SSlin	0,000262661	6			
SSbeh	-11,510716593	9			
SSrest	14,522232728	20			
Ssges	3,011516135	29			

Pos. Kontrolle:	0,6221	0,6193
BW	0,1410	0,1405
MW PK/BW	0,47995	0,14075

V1	0,01969697
V2	0,69230769
C	1,00248562
K'	0,00172082
t-Wert	2,086
Mittleres Abweichungsquadrat des Restfehlers	0,72611164

Ergebnis:	100,20%
Spezifikation erfüllt:	≥ 95 % ERFÜLLT ≤ 105 % ERFÜLLT
	Obere Grenze: 0,04088585
	Untere Grenze: -0,03742872

Zusatztable:

$(y-y')^2$	$(y-y')^2$	$(y-y')^2$
0,12177	0,14074	0,14074
0,10154	0,11686	0,11632
0,09416	0,08355	0,09057
0,06638	0,07505	0,06783
0,05729	0,05525	0,05786
0,14765	0,13642	0,14934
0,12942	0,11720	0,13094
0,10230	0,09675	0,10933
0,09663	0,08320	0,09257
0,08303	0,07100	0,07983

Abbildung I: Musterberechnung mit Hand 2

Dargestellt wird die Musterberechnung mit Hand an einem eigens entworfenen Berechnungsbogen, für das Beispiel 2. Es sind nur die relevanten Ergebnisse dargestellt.

Musterberechnung mit Hand Beispiel 3:

Dosis	Extinktion 1	Extinktion 2	Extinktion 3	Mittelwert - BW	Wirkung
2 µg/ml	0,6140	0,6116	0,6118	0,43	0,16938333
2,5 µg/ml	0,6043	0,5938	0,6042	0,42	0,18108333
3 µg/ml	0,6044	0,5901	0,6063	0,42	0,18158333
3,5 µg/ml	0,6003	0,6072	0,5968	0,42	0,18041667
4 µg/ml	0,5878	0,5949	0,5909	0,41	0,19065000
2 µg/ml	0,6316	0,6153	0,6193	0,44	0,15978333
2,5 µg/ml	0,6072	0,6017	0,6028	0,42	0,17795000
3 µg/ml	0,6080	0,6083	0,6032	0,42	0,17535000
3,5 µg/ml	0,6107	0,5984	0,5739	0,41	0,18751667
4 µg/ml	0,5668	0,5893	0,5840	0,40	0,20181667
$\sum (y-y')^2$	5,32346				
d:	5				
h:	2				
n:	3				
y'	0,18025				
Ps:	0,90311667	0,90241667			
Ls:	2,75121667	2,80088333			
as:	3,36126667	3,04786667			
bs:	0,08373333	0,18726667			
Gs:	0,16335199	0,16383701			
Js:	0,00005277	0,00008912			
	Standard ↓	Probe ↓			
Hb:	1,9354839				
Hi	0,0068182				
a:	64,0913333				
K:	24,4496296				
R'T:	0,99994819	Freiheitsgrade			
SSreg	22382,022097	2			
SSschn	-22405,490585	1			
SSlin	0,000425650	6			
SSbeh	-23,468062645	9			
SSrest	28,791524160	20			
Ssges	5,323461515	29			

Pos. Kontrolle:	0,8010	0,7627
BW	0,1996	0,1646
MW PK/BW	0,59975	0,18210

V1	0,01969697
V2	0,69230769
C	1,00058504
K'	0,00040503
t-Wert	2,086
Mittleres Abweichungsquadrat des Restfehlers	1,43957621

Ergebnis:	99,99%
Spezifikation erfüllt:	≥ 95 % ERFÜLLT
	≤ 105 % ERFÜLLT
	Obere Grenze: 0,01937990
	Untere Grenze: -0,01856942

Zusatztable:

$(y-y')^2$	$(y-y')^2$	$(y-y')^2$
0,18814	0,18606	0,18624
0,17982	0,17102	0,17973
0,17990	0,16798	0,18152
0,17644	0,18229	0,17351
0,16610	0,17193	0,16863
0,20372	0,18927	0,19276
0,18229	0,17762	0,17855
0,18297	0,18323	0,17889
0,18529	0,17485	0,15496
0,14942	0,16732	0,16301

Abbildung J: Musterberechnung mit Hand 3

Dargestellt wird die Musterberechnung mit Hand an einem eigens entworfenen Berechnungsbogen, für das Beispiel 3. Es sind nur die relevanten Ergebnisse dargestellt.

Beispielrechnung Excel-Sheet

Beispiel 1:

Endkonz. (µg/ml)	Extinktion 1	Extinktion 2	Extinktion 3	Extinktion 1 - BW	Extinktion 2 - BW	Extinktion 3 - BW	Mittelwert	Wirkung
Standard								
2	0,6974	0,6967	0,6981	0,5382	0,5378	0,5389	0,53	0,01
2,5	0,6870	0,6989	0,7132	0,5278	0,5397	0,5540	0,54	0,01
3	0,6989	0,6797	0,6801	0,5367	0,5198	0,5209	0,53	0,02
3,5	0,6857	0,6370	0,6414	0,5265	0,4778	0,4822	0,50	0,05
4	0,6281	0,5835	0,6032	0,4589	0,4243	0,4440	0,45	0,10
Probe								
2	0,6796	0,6847	0,6879	0,5203	0,5258	0,5287	0,52	0,02
2,5	0,6384	0,6551	0,6621	0,4792	0,4969	0,5029	0,49	0,06
3	0,6274	0,6390	0,6316	0,4682	0,4798	0,4724	0,47	0,07
3,5	0,5496	0,6062	0,5993	0,3894	0,4470	0,4401	0,43	0,12
4	0,5323	0,5793	0,5896	0,3731	0,4201	0,4304	0,41	0,14
Pos. Kontrolle	0,7030	0,7115		0,54380	0,55230		0,54805	
Neg. Kontrolle - BW	0,1645	0,1539					0,15920	
Modellauswahl:	Steilungsverhältnismodell: Abstand zw. den benachbarten Dosen konst.							

yy	y-y	y-y	(y-y) ²	(y-y) ²	(y-y) ²
0,51715	0,51645	0,50785	0,26744	0,26672	0,26791
0,50675	0,51865	0,53285	0,23680	0,23600	0,23404
0,51965	0,49845	0,49985	0,24845	0,24845	0,24985
0,50545	0,45675	0,46115	0,20548	0,20562	0,21266
0,44785	0,40325	0,42295	0,20057	0,16261	0,17889
0,49925	0,50445	0,50765	0,24929	0,25447	0,25771
0,45815	0,47585	0,48185	0,20990	0,22643	0,23218
0,44715	0,45875	0,45135	0,19994	0,21045	0,20372
0,36835	0,42595	0,41905	0,13668	0,18143	0,17560
0,35205	0,39905	0,40335	0,12394	0,15924	0,16767
Summe (y-y) ²			6,57245		
y-Wert			0,18025		

Dosis	Abk.	Ref-substanz	Testsubstanz	(Ref-substanz) ²	(Testsubstanz) ²	Anzahl der Konz.	d	5
2	S1 bzw. T1	0,01318333	0,02321667	0,00017380	0,00053901	Anzahl der Prüfsubstanzen	h	2
2,5	S2 bzw. T2	0,00755000	0,05505000	0,00005700	0,00303050	Anzahl der Wdh.	n	3
3	S3 bzw. T3	0,02235000	0,07458333	0,00049952	0,00556267	d ²		25
3,5	S4 bzw. T4	0,05255000	0,12255000	0,00276150	0,01501850			
4	S5 bzw. T5	0,10231667	0,14018333	0,01046870	0,01965137			
Gesamtsumme je Substanz	Ps bzw. Pt	0,19795000	0,41558333	0,03918420	0,17270951			
Lineares Produkt	Ls bzw. Lt	0,81711667	1,54818333	0,66767965	2,39687163			
Achsenabschnitt	as bzw. at	-0,54780000	-0,14626667	0,30008484	0,02139394			
Steigung	bs bzw. bt	0,44653333	0,60286667	0,19939202	0,36344822			
Behandlungswert	Gs bzw. Gt	0,01396053	0,04380206					
Nichtlinearität	Js bzw. Jt	0,00113889	0,00017395					

3. Varianzanalyse

Hd	1,9354839
Hi	0,0068182
a	-6,9406667
K für hd	2,8231736

	Freiheitsgrade	Abweichungsquadrate	Mittleres Quadrat	F-Verteilung	Signifikanz aus Freiheitsgraden
Regression	2	SSreg 260,105004	130,05250216	6,502625108	
Schnittpunkt	1	SSschn -262,758829	-262,75882871	-13,13794144	p=0,05 Signifikant nicht Signif.
Nichtlinearität	6	SSlin 0,003938518	0,00065642	3,2821E-05	4,965 FALSCH WAHR
Behandlungen	9	SSbeh -2,643885872	-0,29443176	-0,014721588	4,965 FALSCH WAHR
Restfehler	20	SSrest 9,222335147	0,46111676	0,023055838	
Gesamt	29	SSqes 6,572449275	0,22663618	0,011331809	
			t-Wert	2,086	

		Refsubstanz	Testsubstanz
Abschätzung Wirkung:	gemeinsamer Achsenabschnitt	a'	-6,9406667
	Steigung	b'	1,9077658 1,9210579
Wirkungsverhältnis:	R' ^t	1,00696738	Ergebnis [%]: 100,70%

	≥ 95 %	≤ 105 %
Spezifikation: Gehalt zwischen 95 % und 105 %	ERFÜLLT	ERFÜLLT

5. Vertrauensinterv.

V1	0,01969697	C*RT*K	± Wurzel
V2	0,69230769		
C	1,00503245	0,003121224	0,055867914
K	0,00348401		
C*RT*K	0,00352594	0,05586791	obere Grenze 0,05939385
			untere Grenze -0,05234198

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Ergebnis	In [%] 100,7%	Vertrauensintervall	obere Grenze 0,05939385
			untere Grenze -0,05234198

Abbildung K: Excel-Berechnung zum Beispiel 1

Dargestellt wird die Berechnung mit dem Excel-Sheet, entsprechend des Beispiels 1 der Musterberechnung 1.

Beispiel 2:

Endkonz. [µg/ml]	Extinktion 1	Extinktion 2	Extinktion 3	Extinktion 1 - BW	Extinktion 2 - BW	Extinktion 3 - BW	Mittelwert	Wirkung
Standard								
2	0,5292	0,5554	0,5554	0,3885	0,4147	0,4147	0,41	0,07
2,5	0,4989	0,5221	0,5213	0,3582	0,3814	0,3806	0,37	0,11
3	0,4871	0,4693	0,4812	0,3464	0,3286	0,3405	0,34	0,14
3,5	0,4379	0,4542	0,4407	0,2972	0,3138	0,3000	0,30	0,18
4	0,4196	0,4153	0,4208	0,2789	0,2746	0,2801	0,28	0,20
Probe								
2	0,5645	0,5496	0,5667	0,4238	0,4089	0,4260	0,42	0,06
2,5	0,5400	0,5226	0,5421	0,3993	0,3819	0,4014	0,39	0,09
3	0,5001	0,4913	0,5109	0,3694	0,3506	0,3702	0,36	0,12
3,5	0,4911	0,4697	0,4845	0,3594	0,3280	0,3438	0,34	0,14
4	0,4684	0,4467	0,4628	0,3277	0,3060	0,3221	0,32	0,16

$y \cdot y'$	$y \cdot y''$	$y \cdot y'''$	$y \cdot y'''$	$(y \cdot y')^2$	$(y \cdot y'')^2$	$(y \cdot y''')^2$
0,34895	0,37515	0,37515	0,12177	0,14074	0,14074	
0,31865	0,34185	0,34185	0,10154	0,11686	0,11632	
0,30685	0,28905	0,30095	0,09416	0,08355	0,09057	
0,25765	0,27395	0,26045	0,06638	0,07505	0,06783	
0,23935	0,23505	0,24055	0,05729	0,05523	0,05786	
0,38425	0,36935	0,38645	0,14768	0,13642	0,14934	
0,35975	0,34235	0,36185	0,12942	0,11720	0,13094	
0,31985	0,31105	0,33065	0,10230	0,09675	0,10933	
0,31385	0,28545	0,30425	0,09663	0,08320	0,09257	
0,28815	0,26645	0,28255	0,08303	0,07100	0,07983	
Summe (y · y')			3,01152			
y-Wert			0,18025			

Pos. Kontrolle	0,6221	0,6193		0,48135	0,47855		0,47995
Neq Kontrolle = BW	0,1410	0,1405					0,14075

Modellauswahl: Steigungsverhältnismodell: Abstand zw. denbenachbarten Dosen konst

Dosis	Abk.	Ref-substanz	Testsubstanz	(Ref-substanz) ²	(Testsubstanz) ²	Anzahl der Konz.	d	5
2	S1 bzw. T1	0,07403333	0,06043333	0,00548093	0,00365219	Anzahl der Prüfsubstanzen	h	2
2,5	S2 bzw. T2	0,10660000	0,08580000	0,01136356	0,00736164	Anzahl der Wdhf.	n	3
3	S3 bzw. T3	0,14150000	0,11993333	0,02002225	0,01438400		d ²	25
3,5	S4 bzw. T4	0,17643333	0,13926667	0,03112872	0,01939520			
4	S5 bzw. T5	0,20213333	0,16140000	0,04085788	0,02604996			

Gesamtsumme je Substanz	Ps bzw. Pt	0,70070000	0,56683333	0,49098049	0,32130003
Lineares Produkt	Ls bzw. Lt	2,42813333	1,95590000	5,89583148	3,82554481
Achsenabschnitt	as bzw. at	0,84660000	0,73493333	0,71673156	0,54012700
Steigung	bs bzw. bt	0,65206667	0,51080000	0,42519094	0,26091664
Behandlungswert	Gs bzw. Gt	0,10885335	0,07084300		
Nichtlinearität	Js bzw. Jt	0,00002748	0,00006008		

3. Varianzanalyse

Hb	1,9354833
Hl	0,0068182
a	15,8153333
K für hd	12,0458056

	Freiheitsgrade	Abweichungsquadrate	Mittleres Quadrat	F-Verteilung	Signifikanz aus Freiheitsgraden
Regression	2	SSreg	1352,797370	676,39868502	33,81993425
Schnittpunkt	1	SSschn	-1364,308349	-1364,30834930	-68,21541745
Nichtlinearität	6	SSlin	0,00026261	0,00004378	2,18884E-06
Behandlungen	9	SSbeh	-11,510716593	-1,27896851	-0,063948426
Restfehler	20	SSrest	14,522232728	0,72611164	0,036305582
Gesamt	29	SSges	3,011516135	0,10384538	0,005192269
				t-Wert	2,086

		Refsubstanz	Testsubstanz
Abschätzung Wirkung:	gemeinsamer Achsenabschnitt	a'	15,8153333
	Steigung	b'	-4,2691248
	Wirkungsverhältnis:	R't	1,00201120

	≥ 95 %	≤ 105 %
Spezifikation: Gehalt zwischen 95 % und 105 %	ERFÜLLT	ERFÜLLT

Ergebnis [%]: 100,20%

5. Vertrauensinterv.

V1	0,01969697
V2	0,69230769
C	1,00248562
K'	0,00172082

C'R't'K'	± Wurzel
0,001533293	0,039157288

C'R't'K'	0,00172856	0,03915729	obere Grenze	0,04088585
			untere Grenze	-0,03742872

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Ergebnis	In [%]	100,2%	Vertrauensintervall	obere Grenze	0,04088585
				untere Grenze	-0,03742872

Abbildung L: Excel-Berechnung zum Beispiel 2

Dargestellt wird die Berechnung mit dem Excel-Sheet, entsprechend des Beispiels 2 der Musterberechnung 2.

Beispiel 3:

Endkonz. [µg/ml]	Extinktion 1	Extinktion 2	Extinktion 3	Extinktion 1 - BW	Extinktion 2 - BW	Extinktion 3 - BW	Mittelwert	Wirkung
Standard								
2	0,6140	0,6116	0,6118	0,4319	0,4295	0,4297	0,43	0,17
2,5	0,6043	0,5938	0,6042	0,4222	0,4117	0,4221	0,42	0,18
3	0,6044	0,5901	0,6063	0,4223	0,4080	0,4242	0,42	0,18
3,5	0,6003	0,6072	0,5968	0,4182	0,4251	0,4147	0,42	0,18
4	0,5878	0,5949	0,5909	0,4057	0,4128	0,4089	0,41	0,19
Probe								
2	0,6316	0,6153	0,6193	0,4495	0,4332	0,4372	0,44	0,16
2,5	0,6072	0,6017	0,6028	0,4251	0,4196	0,4207	0,42	0,18
3	0,6080	0,6063	0,6032	0,4259	0,4262	0,4211	0,42	0,18
3,5	0,6107	0,5984	0,6139	0,4286	0,4163	0,3918	0,41	0,19
4	0,5666	0,5893	0,5840	0,3847	0,4072	0,4019	0,40	0,20

y-y	y-y	y-y	(y-y) ²	(y-y) ²	(y-y) ²
0,43375	0,43135	0,43155	0,18814	0,18606	0,18624
0,42405	0,41355	0,42395	0,17982	0,17102	0,17973
0,42415	0,40985	0,42605	0,17990	0,16798	0,18152
0,42005	0,42695	0,41655	0,17644	0,18229	0,17351
0,40755	0,41485	0,41085	0,16610	0,17193	0,16853
0,45135	0,43505	0,43905	0,20372	0,18927	0,19276
0,42695	0,42145	0,42255	0,18229	0,17762	0,17855
0,42715	0,42805	0,42295	0,18297	0,18323	0,17899
0,43045	0,41815	0,39365	0,18539	0,17481	0,15496
0,38655	0,40905	0,40375	0,14942	0,16732	0,16301
Summe (y-y) ²			5,32346		
y-Wert			0,18025		

Pos. Kontrolle	0,8010	0,7627	0,6180	0,5806	0,59975
Neq Kontrolle - BW	0,1996	0,1646			0,18210

Modellauswahl: Steigungsverhältnismodell: Abstand zw. den benachbarten Dosen konst

Dosis	Abk.	Ref-substanz	Testsubstanz	(Ref-substanz) ²	(Testsubstanz) ²	Anzahl der Konz.	d	5
2	S1 bzw. T1	0,16938333	0,15978333	0,02869071	0,02553071	Anzahl der Prüfsubstanzen	h	2
2,5	S2 bzw. T2	0,18108333	0,17795000	0,03279117	0,03166620	Anzahl der Wdh.	n	3
3	S3 bzw. T3	0,18158333	0,17535000	0,03297251	0,03074762	d ²		25
3,5	S4 bzw. T4	0,18041667	0,18751667	0,03255017	0,03516250			
4	S5 bzw. T5	0,19065000	0,20181667	0,03634742	0,04072997			
Gesamtsumme je Substanz	Ps bzw. Pt	0,90311667	0,90241667	0,81561971	0,81435584			
Lineares Produkt	Ls bzw. Lt	2,75121667	2,80088333	7,56919315	7,84494745			
Achsenabschnitt	as bzw. at	3,36126667	3,04786667	11,29811360	9,28949122			
Steigung	bs bzw. bt	0,08373333	0,18726667	0,00701127	0,03506880			
Behandlungswert	Gs bzw. Gt	0,16335199	0,16383701					
Nichtlinearität	Js bzw. Jt	0,00005277	0,00008512					
3. Varianzanalyse	Hb	1,9354839						
	Hl	0,0068182						
	a	64,0913333						
	K für hd	24,4456296						

	Freiheitsgrade	Abweichungsquadrate	Mittleres Quadrat	F-Verteilung	Signifikanz aus Freiheitsgraden
Regression	2	SSreg 22382,022097	11191,01104841	559,5505524	
Schnittpunkt	1	SSsch 22405,490585	22405,49058512	-1120,274529	p=0,05 Signifikant nicht Signif.
Nichtlinearität	6	SSln 0,000425650	0,00007094	3,54709E-06	4,965 FALSCH WAHR
Behandlungen	9	SSbeh -23,468062645	-2,60756252	-0,130378126	4,965 FALSCH WAHR
Restfehler	20	SSrest 28,791524160	1,43957621	0,07197881	
Gesamt	29	SSges 5,323461515	0,18396764	0,009178382	
				t-Wert	2,086

Probe:	Kontrollrechnung Standard=Probe
Bearbeiter:	Mikrobiologischer Mitarbeiter
Datum:	16.01.2013

4. Berechnung Wirkungsverhältnisses mit Vertrauensgrenze

	gemeinsamer Achsenabschnitt	a'	Refsubstanz	Testsubstanz
Abschätzung Wirkung:	Steigung	b'	-17,4294324	-17,4285294
Wirkungsverhältnis:	Rt		0,99994819	

	≥ 95 %	≤ 105 %
Spezifikation: Gehalt zwischen 95 % und 105 %	ERFÜLLT	ERFÜLLT

Ergebnis [%]: **99,99%**

5. Vertrauensinterv.

V1	0,01969697	C* ² *t*	± Wurzel
V2	0,69230763	0,000360038	0,018974661
C	1,00058504		
K	0,00040503		
C* ² *t*	0,00040524	0,01897466	obere Grenze 0,01937990
			untere Grenze -0,01856942

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Ergebnis	In [%] 100,0%	Vertrauensintervall	obere Grenze 0,01937990
			untere Grenze -0,01856942

Abbildung M: Excel-Berechnung zum Beispiel 3

Dargestellt wird die Berechnung mit dem Excel-Sheet, entsprechend des Beispiels 3 der Musterberechnung 3.

Dokumentation der Zellspernung:

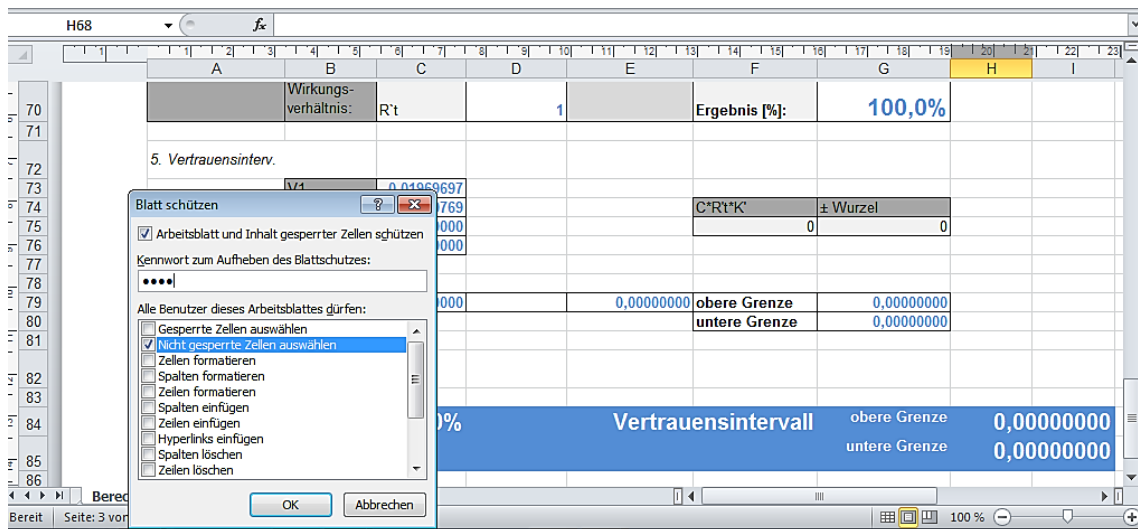


Abbildung N: Sperrung der Ausgabezellen

Dargestellt wird die Sperrung der Ausgabezellen. Nur nicht gesperrte Zellen können ausgewählt werden. Das Arbeitsblatt wird mit einem Kennwort gesichert.

Dokumentation der Bestimmung des Zellentyps am Beispiel „Zahl“

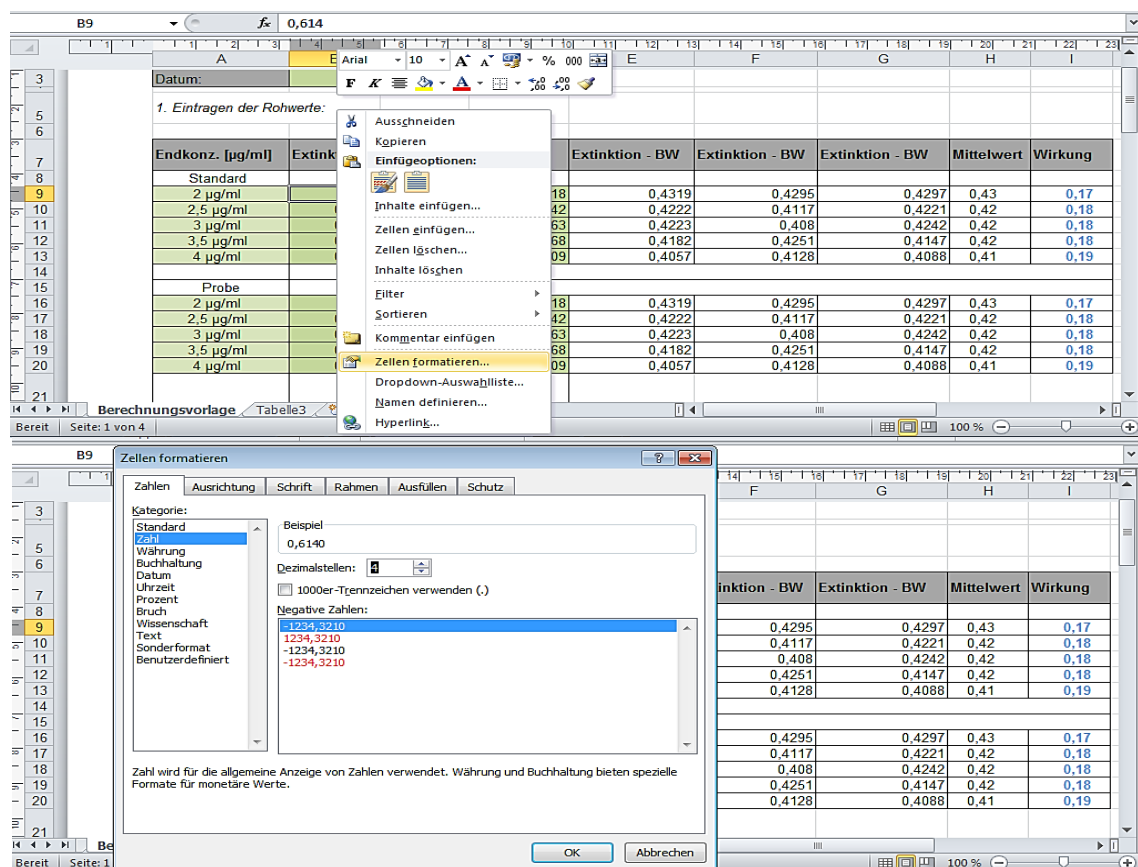


Abbildung O: Zelltypzuteilung „Zahl“

Dargestellt wird die Zuteilung des Zellentyps „Zahl“ und Angabe der gewünschten Dezimalstellen.

Darstellung der farblichen Unterscheidung

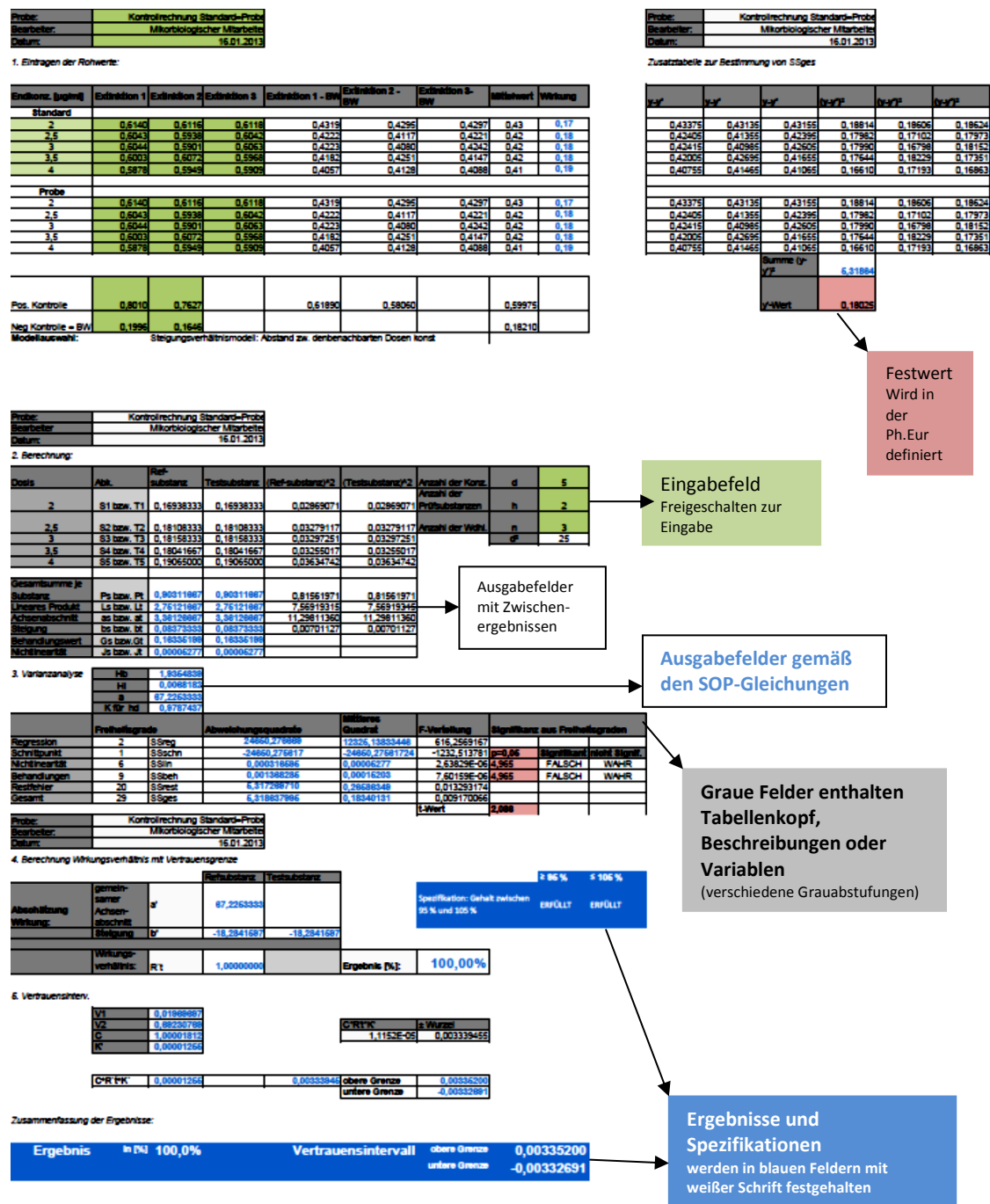


Abbildung P: Farbliche Unterscheidung der Zellen nach Funktion*

Dargestellt wird die farbliche Unterscheidung. Dabei steht die Signalwirkung gemäß der Funktionalität an oberster Stelle.

*Die Werte innerhalb der Darstellung spielen keine Rolle. Es geht lediglich um die Farbgebung.

Formeln:

Extinktion 1 - BW	Extinktion 2 - BW	Extinktion 3- BW	Mittelwert	Wirkung
=B9-H23	=C9-H23	=D9-H23	=MITTELWERT(E9:G9)	=H\$22-H9
=B10-H23	=C10-H23	=D10-H23	=MITTELWERT(E10:G10)	=H\$22-H10
=B11-H23	=C11-H23	=D11-H23	=MITTELWERT(E11:G11)	=H\$22-H11
=B12-H23	=C12-H23	=D12-H23	=MITTELWERT(E12:G12)	=H\$22-H12
=B13-H23	=C13-H23	=D13-H23	=MITTELWERT(E13:G13)	=H\$22-H13

=B16-H23	=C16-H23	=D16-H23	=MITTELWERT(E16:G16)	=H\$22-H16
=B17-H23	=C17-H23	=D17-H23	=MITTELWERT(E17:G17)	=H\$22-H17
=B18-H23	=C18-H23	=D18-H23	=MITTELWERT(E18:G18)	=H\$22-H18
=B19-H23	=C19-H23	=D19-H23	=MITTELWERT(E19:G19)	=H\$22-H19
=B20-H23	=C20-H23	=D20-H23	=MITTELWERT(E20:G20)	=H\$22-H20

=B22-H23	=C22-H23		=MITTELWERT(E22:F22)	
			=MITTELWERT(B23:C23)	

y-y'	y-y'	y-y'	(y-y') ²	(y-y') ²	(y-y') ²
=B9-S\$22	=C9-S\$22	=D9-S\$22	=K9^2	=L9^2	=M9^2
=B10-S\$22	=C10-S\$22	=D10-S\$22	=K10^2	=L10^2	=M10^2
=B11-S\$22	=C11-S\$22	=D11-S\$22	=K11^2	=L11^2	=M11^2
=B12-S\$22	=C12-S\$22	=D12-S\$22	=K12^2	=L12^2	=M12^2
=B13-S\$22	=C13-S\$22	=D13-S\$22	=K13^2	=L13^2	=M13^2
=B16-S\$22	=C16-S\$22	=D16-S\$22	=K16^2	=L16^2	=M16^2
=B17-S\$22	=C17-S\$22	=D17-S\$22	=K17^2	=L17^2	=M17^2
=B18-S\$22	=C18-S\$22	=D18-S\$22	=K18^2	=L18^2	=M18^2
=B19-S\$22	=C19-S\$22	=D19-S\$22	=K19^2	=L19^2	=M19^2
=B20-S\$22	=C20-S\$22	=D20-S\$22	=K20^2	=L20^2	=M20^2
		Summe (y-y') ²	=SUMME(S9:U13;S16:U20)		
		y'-Wert	0,18025		

Ref-substanz	Testsubstanz	(Ref-substanz) ²	(Testsubstanz) ²
=I9	=I16	=C36^2	=D36^2
=I10	=I17	=C37^2	=D37^2
=I11	=I18	=C38^2	=D38^2
=I12	=I19	=C39^2	=D39^2
=I13	=I20	=C40^2	=D40^2
=SUMME(C36:C40)	=SUMME(D36:D40)	=C42^2	=D42^2
=1^*C36+2^*C37+3^*C38+4^*C39+5^*C40	=1^*D36+2^*D37+3^*D38+4^*D39+5^*D40	=C43^2	=D43^2
=(4^*I35+2^*)C42-6^*C43	=(4^*I35+2^*)D42-6^*D43	=C44^2	=D44^2
=2^*C43-(I35+1)^*C42	=2^*D43-(I35+1)^*D42	=C45^2	=D45^2
=SUMME(E36:E40)	=SUMME(F36:F40)		
=C46-(E42/I35)-(3^*E45)/((POTENZ(I35:3)-I35))	=D46-(F42/I35)-(3^*F45)/((POTENZ(I35:3)-I35))		
=(I37^*I36^*I38-I37^*I36^*I35)/(I36^*I38-I36^*I35+4^*I35+2)			
=I37/(4^*I35^3-2^*I38-2^*I35)			
=(C44+D44)/I36^*(I38-I35)			
=I37^*((C42+D42)^2)/I36^*I35			

Abweichungsquadrate	Mittleres Quadrat	F-Verteilung	Signifikanz aus Freiheitsgrade n		
=D56-D54-D55	=D53/B53	=F53/B557			
=C49^*((E44+F44)-I36^*(I38-I35)^2/(C50^2))	=D54/B54	=F54/B557	p=0,05	Signifikant	nicht Signif.
=I37^*(C47+D47)	=D55/B55	=F55/B557	4,965	=G55>H55	=G55<H55
=I37^*(C46+D46)-C51	=D56/B56	=F56/B557	4,965	=G54>H56	=G54<H56
=D58-D56	=D57/B57	=F57/B557			
=S21	=D58/B58	=F58/B557			
		t-Wert	2,086		

Abbildung Q: Formeln Teil 1

Dargestellt sind die Formeln zur Ph. Eur. gemäßen Berechnung.

	Refsubstanz		
a'	=C50		
b'	= $(6^{\circ}C43-3^{\circ}I35^{\circ}(I35+1)^{\circ}D67)/(2^{\circ}I35^{\circ}3+(3^{\circ}I38+I35)$		
R't	=E68/D68	Ergebnis [%]:	=D70
= $(6/(I37^{\circ}I35^{\circ}(2^{\circ}I35+1)))^{\circ}((I/(I35+1))+3/(I36^{\circ}(I35-1))))$			
= $(3^{\circ}(I35+1))/(3^{\circ}(I35+1))+I36^{\circ}(I35-1)$		C'R'K	± Wurzel
= $(D68^{\circ}2)/(D68^{\circ}2)-(F57^{\circ}2)^{\circ}(H59^{\circ}2)^{\circ}C73)$		= $((C75-1)^{\circ}(C75^{\circ}(D70^{\circ}2))+1)+C76^{\circ}(C76-2^{\circ}C75^{\circ}D70)$	=WURZEL(F75)
= $(C75-1)^{\circ}C74$			
=C75^{\circ}D57^{\circ}C576		obere Grenze	=C79+E79
		untere Grenze	=C79-E79
	≥ 95 %	≤ 105 %	
Spezifikation: Gehalt zwischen 95 % und 105 %			
=WENN(G70>=95%;"ERFÜLLT";"NICHT ERFÜLLT") =WENN(G70<=105%;"ERFÜLLT";"NICHT ERFÜLLT")			

Abbildung R: Formeln Teil 2

Dargestellt sind die Formeln zur Ph. Eur. gemäßen Berechnung.

Variablenzusammenfassung und Definition gemäß der Ph. Eur Kapitel 5.3

Tabelle H: Variablen und Zellenzuteilung

Variable	Zellenbezeichnung	Definition
A (in SOP s)	F57	Mittleres Abweichungsquadrat des Restfehlers
a / a'	C50 / D67	Gemeinsamer Achsenschnitt
as / at	C44 / D44	Achsenschnitt Standard / Testsubstanz
bs / bt	C45 / D45	Steigung Standard / Testsubstanz
b's / b't	D68 / E68	Berechnung der Steigung
C	C75	Statistische Größe zur Berechnung des Vertrauensintervalls
d	I35	Anzahl der Dosen ohne Blindwert
Gs / Gt	C46 / D46	Behandlungswert
h	I36	Anzahl der Zubereitungen
Hb	C48	Faktor zur Berechnung der Varianzanalyse
Hi	C49	Faktor zur Berechnung der Varianzanalyse
Js / Jt	C47 / D47	Nichtlinearität
K	C51	Korrekturterm
K'	C76	Korrekturterm
Ls / Lt	C43 / D43	Lineares Produkt
n	I37	Anzahl der Wiederholungen
Ps / Pt	C42 / D42	Gesamtsumme je Substanz
R'T	D70	Wirkungsverhältnis
SSbeh	D56	Behandlungswert (Summe der Abweichungsquadrate für eine gegebene Variationsursache)
SSges	D58	Gesamt (Summe der Abweichungsquadrate für eine gegebene Variationsursache)
SSlin	D55	Nichtlinearität (Summe der Abweichungsquadrate für eine gegebene Variationsursache)
SSreg	D53	Regression (Summe der Abweichungsquadrate für eine gegebene Variationsursache)
SSrest	D57	Restfehler (Summe der Abweichungsquadrate für eine gegebene Variationsursache)
V1	C73	Variationskoeffizient für die Berechnung der Vertrauensgrenze
V2	C74	Variationskoeffizient für die Berechnung der Vertrauensgrenze
y	I9 – I13 / I16 – I20	Einzelne Wirkung

ERKLÄRUNG AUF SELBSTSTÄNDIGKEIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Datum, Ort

Unterschrift