

Optimierung von Effizienz und Nachhaltigkeit in pharmazeutischen Reinräumen

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Ingenieurwissenschaften
(Dr.-Ing.)

Dem Promotionszentrum für Ingenieurwissenschaften
am Forschungscampus Mittelhessen

vorgelegt von

Detlef Behrens

Diplom Ingenieur (FH) / Master of Business Administration
aus Hildesheim

Marburg, 28. Juli 2022

Angenommen vom Promotionszentrum für Ingenieurwissenschaften am
Forschungscampus Mittelhessen

am: 29. Oktober 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Udo Bakowsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Keywan Sohrabi

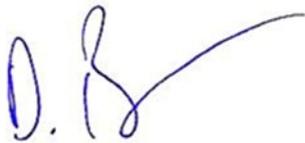
Betreuungspersonen: Prof. Dr. Frank E. Runkel
Prof. Dr. Cornelia M. Keck

Datum der Disputation: 21. Oktober 2022

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der entsprechenden Satzung der federführenden Hochschule niedergelegt sind und die mir ausgehändigt wurde, eingehalten.

Marburg, 28. Juli 2022



Detlef Behrens

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	V
2	Abstract.....	VII
3	Einleitung	1
4	Stand von Wissenschaft und Technik	8
5	Zielsetzung.....	14
6	Ergebnisse	16
6.1	Erste Publikation: „Optimale Luftwechselraten in Reinräumen“	16
6.2	Zweite und dritte Publikation „Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate“	17
6.3	Vierte Publikation: “Effects of different air change rates on cleanroom ‘in operation’ status”	18
6.4	Fünfte Publikation: „Application of biofluorescent particle counters for real-time bioburden control in aseptic cleanroom manufacturing”	20
6.5	Sechste Publikation: „Anwendung eines Echtzeit-Keimzählers zur Überwachung des Reinraumstatus“	22
7	Abkürzungsverzeichnis	25
8	Referenzen.....	26
9	Curriculum Vitae.....	32
10	Original – Publikationen	38
11	Danksagung.....	92

1 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ermittelt, wie der Betrieb von pharmazeutischen Reinräumen optimiert und dadurch Effizienz und Nachhaltigkeit gesteigert werden können.

Für Produktionsräume im Bereich der aseptischen Herstellung werden auf Basis einer Richtlinie der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA in der Literatur Werte für Luftwechselraten von mindestens 20 h^{-1} diskutiert und empfohlen. Eine wissenschaftliche Grundlage für diesen Wert ist aber bislang nicht gegeben.

Ausgehend von der These, dass auch mit niedrigeren Luftwechselraten ($<20 \text{ h}^{-1}$) ein Betrieb dieser Reinräume gemäß den regulatorischen Anforderungen möglich ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Versuchsserien in einem Reinraum mit variabel einstellbarer Lüftung bei unterschiedlichen Luftwechselraten durchgeführt.

Bei der Durchführung der Versuche kamen Laser-Partikelzähler, Luftkeimsammler sowie ein Biofluoreszenz-Partikelzähler zum Einsatz, der mikrobentragende Partikel in Echtzeit erfassen kann. Dabei wurden sowohl die eingestellten Luftwechselraten als auch die Kleidung und das Verhalten des Personals im Raum variiert.

Die Forschungsfragen für diese Dissertation lauteten:

- 1) Ist die von der FDA explizit genannte und industrieweit übliche Luftwechselrate von mindestens 20 h^{-1} tatsächlich erforderlich, um die Anforderungen an die Reinraumklasse C gemäß Annex 1 der EU-GMP-Richtlinie einzuhalten?
 - a. Welche Luftwechselrate ist erforderlich, um die geforderte Erholzeit von 15-20 Minuten zu erreichen?
 - b. Welche Luftwechselrate ist erforderlich, um die regulatorischen Erwartungen für den Status „in operation“ in einem pharmazeutischen Reinraum Klasse C zu erfüllen?
- 2) Sind Biofluoreszenz-Partikelzähler geeignet, um den mikrobiellen Status von Reinräumen zuverlässig zu überwachen und somit eine kontinuierliche Kontrolle der Partikel- und Keimbelastung mit dem Ziel der Reduzierung von Luftwechselraten zu gewährleisten?
 - a. Was ist ein angemessener Aktionsgrenzwert für mikrobentragende Partikel?
- 3) Welche Empfehlungen für regulatorische Anforderungen an Luftwechselraten für Reinräume der Klasse C ergeben sich auf wissenschaftlicher Basis?

Die Ergebnisse belegen, dass Räume der Reinraumklasse C mit einer Luftwechselrate von 10 h^{-1} nachhaltig und effizient betrieben werden können. Die kontinuierliche Kontrolle von Partikeln und mikrobentragenden Partikeln mittels Echtzeitkeimzählern kann dabei für die notwendige Sicherheit sorgen, dass die Reinräume innerhalb der regulatorisch vorgegebenen Grenzen bleiben. Signifikante Kosteneinsparungen durch reduzierten Energieverbrauch sowie eine verbesserte CO_2 -Bilanz wären der angestrebte Nutzen für die Wirtschaftlichkeit der Unternehmen und den Umweltschutz.

2 ABSTRACT

In this work, it was determined how the operation of pharmaceutical clean rooms can be optimized and thus increase efficiency and sustainability.

Based on a recommendation in a guideline from the American health authority FDA, values for air change rates of at least 20 h^{-1} for production rooms in the area of aseptic manufacturing are discussed and recommended in literature. However, there is no scientific basis for this value so far.

Following the thesis that it is possible to operate such clean rooms in accordance with regulatory requirements even with lower air change rates ($<20 \text{ h}^{-1}$), several test series were carried out in a clean room with adjustable ventilation at different air change rates. Laser particle counters, microbial air samplers and a biofluorescent particle counter, which can record microbe-carrying particles in real time, were used to carry out the tests. The air change rates as well as the garment and behavior of the staff in the room were varied.

The scientific questions for this dissertation were:

- 1) Is the air change rate of at least 20 h^{-1} , which is explicitly stated by the FDA and is common across the industry, actually necessary in order to comply with the requirements of clean room class C according to Annex 1 of the EU GMP directive?
 - a. What air change rate is necessary to achieve the required 15-20 minute recovery time?
 - b. What air change rate is required to meet regulatory expectations for status "in operation" in a Class C pharmaceutical cleanroom?
- 2) Are biofluorescent particle counters suitable for reliably monitoring of the microbial status of clean rooms and thus ensuring continuous control of particle and germ loads with the aim of reducing air exchange rates?
 - a. What is a reasonable action threshold for microbe-carrying particles?
- 3) What recommendations can be given on a scientific basis for regulatory requirements regarding air change rates in class C clean rooms?

The results show that class C cleanrooms can be operated sustainably and efficiently with an air change rate of 10 h^{-1} . The continuous control of particles and microbe-carrying particles using real-time viable particle counters can provide the necessary security for cleanrooms to remaining within regulatory limits. Significant cost savings through reduced energy consumption and an improved CO_2 balance would be the desired benefit for the company's profitability and environmental protection.

3 EINLEITUNG

Zum Betrieb von Reinräumen wird im Vergleich zu nicht klassifizierten Räumen etwa 25 mal mehr Energie verbraucht [1]. Dieser hohe Energieverbrauch resultiert zum einen aus den Luftwechselraten (LWR), die benötigt werden, um die geforderten Vorgaben an die Luftqualität zu erreichen. Zum anderen wird viel Energie benötigt, um die Luft im Reinraum für einen engen Temperatur- und Feuchtebereich gemäß der Herstellspezifikation aufzubereiten [2].

Der Aufbau und der Betrieb von Reinräumen unterliegt in der pharmazeutischen Industrie der Überwachung nationaler und internationaler Genehmigungsbehörden [3]. Grundlage hierfür sind in der Europäischen Union die Anforderungen der Richtlinie zur *Good Manufacturing Practice* (GMP) [4], sowie den Vorgaben der Food & Drug Administration (FDA) zur *Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals* [5] für den US-amerikanischen Markt. Beide Regelwerke verweisen auf weitergehende Vorgaben für die Herstellung steriler Arzneiformen, die mittels aseptischer Prozessführung in einem klassischen oder biopharmazeutischen Herstellverfahren produziert werden. Im Bereich der EU ist dies der Annex 1 in der derzeit noch gültigen Fassung von 2008 [6]¹. Die FDA stellt mit der *Guidance for Industry - Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing* [8], dem sogenannten Aseptic Guide, den Arzneimittelherstellern eine weitere Richtlinie zur Verfügung.

Hierin werden genaue Grenzwerte für die Zahl zulässiger Partikel sowie Keime pro m³ Luft vorgegeben. Diese Vorgaben können nur durch eine kontinuierliche Zuführung von gefilterter, partikelarmer Luft und Abführung partikelbelasteter Raumluft erreicht werden [3]. Damit steht die Luftqualität in direktem Zusammenhang mit der LWR des betreffenden Raumes, also dem Wert, wie oft pro Stunde die komplette Raumluft rechnerisch ausgetauscht wird [3, 9, 10].

Der Fokus der regulatorischen Anforderungen im GMP regulierten Umfeld liegt dabei nicht auf einem energieeffizienten Betrieb, sondern stets auf der Patientensicherheit und damit der Produktqualität sowie dem Schutz des Personals [1].

¹ Eine Revision des Annex 1 ist bereits seit 2017 in Arbeit, eine Freigabe wird für 2022 erwartet [7].

Beide genannten Richtlinien empfehlen identische Grenzwerte für eine maximale Anzahl luftgetragener Partikel mit Größen $\geq 0,5 \mu\text{m}$ sowie koloniebildende Einheiten (KBE) pro m^3 Luft innerhalb von Reinräumen. Bezüglich weiterer Grenzwerte sind zwei wesentliche Unterschiede zwischen dem Annex 1 und dem Aseptic Guide wichtig:

Erstens: Der Annex 1 gibt auch Grenzwerte für Partikel $\geq 5 \mu\text{m}$ an [6].

Zweitens: Während der Aseptic Guide die Grenzwerte nur für den Betriebszustand „in operation“ von Produktionsräumen definiert, beschreibt der Annex 1 auch einen Ruhezustand „at rest“, bei dem im Raum keine Produktion stattfindet und kein Personal anwesend ist.

Im Entwurf der angekündigten Überarbeitung dieser Richtlinie wird eine anzustrebende Dauer, die sogenannte Erholzeit (engl. „clean up period“), vom Zustand „in operation“ bis zum Zustand „at rest“ wie folgt angegeben [7, S. 10]: ‘The particulate limits ... for the “at rest” state should be achieved after a “clean up” period on completion of operations. The “clean up” period should be determined during the classification of the rooms (guidance value of 15 to 20 minutes).’

Der Annex 1 definiert die Reinraumklassen A bis D [6, S. 2-3]:

Grade A: The local zone for high risk operations, e.g. filling zone, stopper bowls, open ampoules and vials, making aseptic connections. Normally such conditions are provided by a laminar air flow work station. Laminar air flow systems should provide a homogeneous air speed in a range of 0.36 – 0.54 m/s (guidance value) at the working position in open clean room applications. The maintenance of laminarity should be demonstrated and validated.

A uni-directional air flow and lower velocities may be used in closed isolators and glove boxes.

Grade B: For aseptic preparation and filling, this is the background environment for the grade A zone.

Grade C and D: Clean areas for carrying out less critical stages in the manufacture of sterile products.”

Annex 1 und Aseptic Guide referenzieren die DIN ISO 14644-1 „Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche“, die seit 2015 den Industriestandard für Reinräume in allen Branchen darstellt [11]. Die im Pharmabereich relevanten Reinraumklassifizierungen sind hierin mit Bereichen von ISO 5 bis ISO 8 angegeben, wobei ISO 8 den Grenzwerten der Klasse C „in operation“ und ISO 7 den Grenzwerten der Klasse C „at rest“ entspricht. Im FDA Aseptic Guide werden ISO 8 Räume auch mit Class 100.000 entsprechend der zulässigen Anzahl von Partikeln $\geq 0,5 \mu\text{m}$ pro Kubikfuß bezeichnet.

Im Rahmen dieser Dissertation wird im Folgenden nur die Bezeichnung Reinraumklasse C für diese Räume verwendet, wobei gilt:

Reinraumklasse C „at rest“ = ISO 7

Reinraumklasse C „in operation“ = ISO 8 = Class 100.000

Zusätzlich zu den Grenzwerten für Partikelzahlen geben die Richtlinien noch Grenzwerte für die zulässige mikrobielle Kontamination anhand der Anzahl von KBE pro m^3 Luft sowie auf Sedimentationsplatten im Zeitraum von 4 Stunden vor.

Keime in der Raumluft haften nahezu ausschließlich an Partikeln [3, 12]. Diese mikrobentragenden Partikel haben dann eine Größe im Bereich von mindestens $1 \mu\text{m}$ [12]. Die größte Keimquelle ist dabei in den meisten Fällen der Mensch, also das Betriebspersonal im Reinraum [13]. Da Keime naturgemäß eine besondere Gefahr für die aseptische Prozessführung darstellen, muss auch deren Abgabe weitestgehend verhindert sowie die effiziente Abführung sichergestellt werden [3].

Bei einer von Moschner [14] durchgeführten Untersuchung wurde ermittelt, dass Personal in reinraumuntauglicher Kleidung (Jogginganzug) bei Bewegung etwa 70 mal mehr Keime emittiert, als mit reinraumgerechter Kleidung (Overall). Dies zeigt die klare Notwendigkeit geeigneter Reinraumbekleidungen, die aus dicht gewebten Polyesterfasern bzw. Folien gefertigt sind und somit keine Partikel oder Keime abgeben.

Zusammengefasst müssen Hersteller steriler Arzneimittel im EU-Raum demnach folgende Reinraumparameter überwachen:

- Anzahl Partikel / m³ Luft der Partikelgrößen $\geq 0,5 \mu\text{m}$ und $\geq 5 \mu\text{m}$
- Anzahl KBE / m³ Luft
- Anzahl KBE / 90mm Sedimentationsplatte nach 4 h
- Einhaltung der Erholzeit von max. 20 Minuten nach Produktionsende

In der pharmazeutischen Industrie sind die Bereiche für die Herstellung steriler Arzneimittel in einer Umgebung der Reinraumklasse C üblicherweise deutlich größer als die kritischen Bereiche für die Endproduktabfüllung in Klasse A mit den umgebenden Bereichen in Reinraumklasse B [15, 16]. Diese Abfüllbereiche werden aufgrund des höheren Kontaminationsrisikos für das Endprodukt bei (offenen) Abfüllprozessen auf ein Minimum reduziert.

In den Vorstufen der Produktion befinden sich Prozessanlagen, wie zum Beispiel Rührbehälter, Chromatographiesäulen und Reinigungsanlagen, die einen großen Raumbedarf haben. Diese Räume werden anforderungsgerecht in Reinraumklasse C betrieben und haben somit aufgrund ihres Volumens auch den größten Anteil an der Luftversorgung und am Energiebedarf. Vor dem Hintergrund der angestrebten Energieeinsparung sollten deshalb primär die Klasse C – Bereiche auf eine mögliche Optimierung des HVAC-Betriebs untersucht werden.

Die Grenzwerte für Partikelzahlen und mikrobielle Kontamination für die Reinraumklasse C sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Zulässige Partikel- und Keimbelastung in einem Reinraum der Klasse C gem. Annex 1 [6].

Parameter	„In operation“ (ISO 8)	„At rest“ (ISO 7)
Partikel $\geq 0.5 \mu\text{m}/\text{m}^3$	3,520,000	352,000
Partikel $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$	29,000	2,900
Luftkeime KBE/m ³	100	
Sedimentationsplatten \varnothing 90 mm KBE/4 h	50	

In Bezug auf die „clean up period“ wird von den Inspektionsbehörden für die Klasse C eine Abreicherung der Partikelzahl von maximal 3.920.000 /m³ auf 392.000 /m³ (Faktor 10) innerhalb von 15-20 Minuten erwartet [13, 17–19]. Dies wird als 10:1 Erholzeit bezeichnet. Whyte berechnete hierfür eine theoretisch erforderliche LWR von 9,2 h⁻¹ für eine Erholzeit von 15 Minuten [20].

Im Annex 1 wird kein konkreter Wert für eine geeignete LWR zur Einhaltung der Grenzwerte angegeben. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt für unsterile Produktionsstätten eine LWR von 6 – 20 h⁻¹, gibt aber keinen Richtwert für die Sterilproduktion an [21].

Im Aseptic Guide der FDA wird folgende Aussage zu LWR getroffen [8, S. 7] „Air change rate is another important cleanroom design parameter. For Class 100,000 (ISO 8) supporting rooms, airflow sufficient to achieve at least 20 air changes per hour is typically acceptable.“ Obwohl der Begriff “typically acceptable” keine strenge regulatorische Anforderung darstellt, legen viele Pharmaunternehmen den Wert von 20⁻¹ als minimal erforderliche LWR für ihre aseptischen Produktionsbereiche der Klasse C fest. Dies lässt sich erfahrungsgemäß in den Qualifizierungsunterlagen der Reinräume feststellen.

Bieber [22] stellt fest, dass die „geforderte ‚Clean-up‘-Periode von 15 bis 20 Minuten ... nur mit einem etwa 20-fachen Luftwechsel zu erreichen“ ist [22, S. 1322]. Auch deutlich höhere Werte als 20 h⁻¹ werden in der Literatur diskutiert und empfohlen [23, 24]. Eine wissenschaftliche Grundlage für diese Empfehlung ist jedoch bisher nicht gegeben. Angesichts des hohen Energiebedarfs für die Luftaufbereitung und im Hinblick auf das allgemeine öffentliche Interesse an der Verringerung der Treibhausgasemission sowie auf die Energieeffizienz muss eine solche pauschale Vorgabe kritisch hinterfragt werden [3].

Veröffentlichungen anderer Wissenschaftler zu diesem Themengebiet beziehen sich entweder auf theoretische Berechnungen erforderlicher LWR, wie insbesondere von Whyte, Chen und Sun [9, 25–31], oder betrachten nur die Einhaltung der Partikelgrenzwerte bzw. der Erholzeit, ohne die KBE zu berücksichtigen [32, 33]. Eine umfassende experimentelle Studie aller reinraumrelevanten Parameter bei realen Bedingungen

und unter Berücksichtigung verschiedener LWR ist bisher nicht durchgeführt worden. Diese Forschungslücke zu schließen ist das Ziel dieser Arbeit.

Um Energiekosten zu senken, sollte ein Hauptaugenmerk auf der Reduzierung der LWR liegen. Dabei ergibt sich eine zweite Forschungslücke im Bereich der Überwachung des mikrobiellen Status' eines Reinraums:

Während Partikel in verschiedenen Größen mit Laser-Partikelzählern in Echtzeit nachgewiesen werden können, erfordert der behördlich akzeptierte Nachweis von KBE eine Luftkeimsammlung auf Agarplatten oder -streifen mit anschließender, mehrtägiger Inkubation [34]. Ergebnisse liegen damit erst nach 4-5 Tagen vor. Diese Verzögerung birgt ein Risiko für die Hersteller: Bei unerwartet hohen Ergebnissen könnten die produzierten Chargen kontaminiert sein. Da die Produktion zum Zeitpunkt der Vorlage von Ergebnissen aber bereits abgeschlossen ist, kann das nicht mehr vermieden werden. Um für diese Phase der Unsicherheit einen ausreichenden Sicherheitspuffer zu haben, sind die Hersteller bei der Entscheidung, die LWR zu reduzieren, sehr zurückhaltend [35]. Sie müssen sich auf die Ergebnisse der Partikelzählung für die Reinraumkontrolle verlassen bis KBE-Ergebnisse vorliegen. Dies ist in der Herstellungspraxis ausreichend sicher, da eine gute Korrelation zwischen luftgetragenen Partikeln und Mikroorganismen gegeben ist [36]. Eine Erhöhung des Risikos, KBE-Grenzwerte durch die Verringerung von LWR zu überschreiten, kommt aber für die Hersteller nicht in Frage. Um diese Unsicherheit zu eliminieren, können Echtzeitkeimzähler helfen [34].

Seit 2009 sind kontinuierliche mikrobielle Überwachungssysteme für Reinräume verfügbar [35, 37]. Obwohl diese Echtzeitkeimzähler, auch als Biofluoreszenz-Partikelzähler (engl. Biofluorescent Particle Counter, BFPC) bezeichnet, erhebliche Vorteile bei der Erkennung von Keimquellen bieten, ist ihre Verwendung zur kontinuierlichen Kontrolle von microbe-carrying particles (MCPs) in der pharmazeutischen Industrie gering [38]. Ein Hauptgrund dafür sind die nichtexistierenden regulatorischen MCP-Grenzwerte für diese Art von Messtechnik [34].

Bisherige Forschungsarbeiten zu BFPCs beziehen sich auf die Vergleichbarkeit der Messmethode zur klassischen Luftkeimsammlung bzw. zur Korrelation mit gemessenen Partikeln [35, 39–41]. Es wurde bisher jedoch noch nicht erforscht, bei welchen

MCP-Werten eine Überschreitung der zulässigen KBE-Werte zu erwarten ist. Eine Untersuchung zur Anwendbarkeit des Systems in Klasse C Reinräumen „in operation“ unter Berücksichtigung verschiedener LWR bei gleichzeitiger Evaluierung von mikrobiellen Grenzsituationen hat demzufolge bisher nicht stattgefunden. Dies stellt die zweite Forschungslücke dar.

Aus diesem Grund liegt ein weiterer Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der Einsatzmöglichkeiten für BFPCs für die Produktion in Reinraumklasse C.

Aus den beschriebenen Forschungslücken ergeben sich folgende wissenschaftlichen Fragestellungen für die Dissertation:

- 1) Ist die von der FDA explizit genannte und industrieweit übliche Luftwechselrate von mindestens 20 h^{-1} tatsächlich erforderlich, um die Anforderungen an die Reinraumklasse C gemäß Annex 1 der EU-GMP-Richtlinie einzuhalten?
 - a. Welche Luftwechselrate ist erforderlich, um die geforderte Erholzeit von 15-20 Minuten zu erreichen?
 - b. Welche Luftwechselrate ist erforderlich, um die regulatorischen Erwartungen für den Status „in operation“ in einem pharmazeutischen Reinraum Klasse C zu erfüllen?
- 2) Sind Biofluorescent Particle Counter geeignet, um den mikrobiellen Status von Reinräumen zuverlässig zu überwachen und somit eine kontinuierliche Kontrolle der Partikel- und Keimbelastung mit dem Ziel der Reduzierung von Luftwechselraten zu gewährleisten?
 - a. Was ist ein angemessener Aktionsgrenzwert für MCPs?
- 3) Welche Empfehlungen für regulatorische Anforderungen an Luftwechselraten für Reinräume der Klasse C ergeben sich auf wissenschaftlicher Basis?

Die Vorgehensweise zur Beantwortung dieser Fragen ist im Abschnitt 5 beschrieben.

4 STAND VON WISSENSCHAFT UND TECHNIK

Betrachtet man den Ursprung der Forderung nach einem Luftwechsel von mindestens 20 h^{-1} wird deutlich, dass diese Vorgabe nicht unter Berücksichtigung von Energieverbrauch- und -kosten festgelegt wurde [3]. Die Forderung stammt aus späten 1950er Jahren [1]. In dieser Zeit wurde in den USA eine LWR von mindestens 20 h^{-1} in Operationssälen und von 25 h^{-1} in Räumen, in denen nicht operiert wurde, gefordert. Die Vorgabe von 20 h^{-1} wurde dann 1960 zum ersten Mal in der frühen Version des Federal Standards 209B aufgegriffen. Später wurde die Forderung von 20 h^{-1} für die Klasse 100.000 (ISO 8) widerrufen, da erkannt wurde, dass für die Aufrechterhaltung der Reinheitsklasse auch ein geringerer Luftwechsel ausreicht. Dennoch übernahm die FDA 1987 den Wert von 20^{-1} im Aseptic Guide und beließ diese Empfehlung auch in der 2004er Revision des Guides [1].

Die LWR beschreibt, wie oft in einer bestimmten Zeit (typischerweise pro Stunde) das Raumluftvolumen ausgetauscht wird [25].

$$N = \frac{v * A}{V} = \frac{\dot{V}}{V} \quad (1)$$

In Gleichung (1) bezeichnet N die Anzahl der Luftwechsel pro Stunde, v die Luftgeschwindigkeit (m/h), A die Filterfläche (m^2), V das gesamte Raumluftvolumen (m^3) und \dot{V} den Luftdurchsatz (m^3/h) [16].

Die Verpflichtung zur Einhaltung der Richtwerte führt in vielen Pharmaunternehmen zu der Entscheidung, Reinnräume 24 h/d unabhängig von der tatsächlichen Nutzung mit einer konstanten LWR zu betreiben [42]. Tschudi et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass die Belüftung von Reinnräumen bis zu 50% des gesamten Energiebedarfs für Produktionsgebäude ausmacht [43]. Fedotov ermittelte einen 25-fach höheren Verbrauch für pharmazeutische Reinnräume gegenüber nicht klassifizierten Räumen [1]. Tschudi geht noch weiter und schreibt, dass je nach erforderlicher Reinnraumklasse Reinnräume 10 bis 100 mal energieintensiver sind als Bürogebäude [43]. Wird darüber hinaus die

Leistung des Heating, Ventilation and Air Conditioning (HVAC) - Systems höher ausgelegt als eigentlich nötig, führt das wiederum zu einem erhöhten Energiebedarf von bis zu 75% des gesamten Anlagenenergieverbrauchs im Produktionsbetrieb [44]. Diese überdimensionierte Ausführung von HVAC-Anlagen resultiert aus einer falschen Interpretation der vorgegebenen normativen Dokumente [1]. Ein Beispiel dafür ist die Auslegung der Formulierung „typically acceptable“ als „behördlich erwartet“. Ein weiteres Beispiel betrifft die Messung der Erholzeit bzw. „clean up period“. Die Formulierung, auf die sich die Vorgabe von 15-20 Minuten bezieht, betrifft die Zeit vom Ende der „in operation“ Phase mit maximal 3.520.000 Partikeln $\geq 0,5 \mu\text{m}^3$ bis zum Erreichen des „at rest“-Grenzwerts von 352.000 Partikeln $\geq 0,5 \mu\text{m}^3$, entsprechend einer 10:1 Abreicherung der Partikel durch die Lüftungsanlage. Im Aide mémoire [45] der Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten (ZLG) zur Überwachung von Sterilherstellern wird im Kapitel „Erholzeit“ auf das Verfahren nach EN ISO 14644-3 verwiesen, welches jedoch die Messung einer 100:1 Erholzeit, also einer 100-fachen Partikelabreicherung, beschreibt. Das Aide mémoire formuliert explizit, dass die in der Norm beschriebene Prüfung der Erholzeit nicht für die ISO-Klasse 8 empfohlen wird. Dennoch wird das 100:1 Messverfahren standardmäßig bei der Bestimmung der Erholzeit auch in Klasse C Räumen angewendet, wobei ein zu strenges Akzeptanzkriterium von 20 Minuten spezifiziert wird.

Die Auslegung der Klimaanlage für einen großen Arbeitsbereich mit Maximal- und Minimalwerten im Sommer- und Winterbetrieb führt im Normalbetrieb zu einer ineffizienten Arbeitsweise, bei der die Luftmengen überdimensioniert und die Toleranzbereiche für Temperatur und Feuchte zu eng sind [2]. Die Betreiber wissen teilweise nicht, welche LWR optimal sind und orientieren sich an der These, dass höhere LWR stets besser sind, auch wenn dies zu keinem Zeitpunkt auf wissenschaftlicher Basis begründet wurde [46]. Bei der Auslegung des Lüftungssystems wird implizit davon ausgegangen, dass mit der Partikelabreicherung auch die Belastung des Raumes mit Luftkeimen linear sinkt. Hierbei gilt die Devise „viel hilft viel“, was in Bezug auf das Ziel der Partikelabreicherung auch scheinbar richtig ist [3]. Zu hohe LWR wirken sich jedoch nicht nur negativ auf die Energiekosten aus, sondern können auch zur Verwirbelung der luftgetragenen Partikel beitragen und somit eine Abreicherung dieser Partikel erschweren [32, 47].

Angesichts des öffentlichen Interesses, Treibhausgasemissionen zu senken, sowie die Energieeffizienz zu verbessern, hat ein Umdenken eingesetzt, das auch in Leitfäden zum Ausdruck kommt [16, 48, 49]. Die *International Society for Pharmaceutical Engineering* (ISPE) hat bis April 2018 in ihrer weit verbreiteten zweiten Auflage des *Guide for Sterile Manufacturing Facilities* eine LWR von 20 h^{-1} empfohlen [50]. Auf diese zweite Auflage wird auch noch in neueren Forschungsarbeiten verwiesen [51, 52]. In der 2018 erschienenen dritten Auflage zieht ISPE diesen spezifischen Wert zurück [49]. Der Vorschlag lautet nun, die Lüftungsanlagen auf Basis der zu erwartenden Partikel- und Keimbelastung von Räumen in Kombination mit anderen Parametern wie beispielsweise der Erholzeit auszulegen. Die ISPE verweist hierzu ausdrücklich auf Sun et al. die ein Modell für die Reinraumtechnik beschreiben [31]. Dies eröffnet die Möglichkeit, mit reduzierten LWR-Anforderungen unterhalb der FDA-Empfehlung von 20 h^{-1} auszukommen.

Dennoch werden HVAC-Anlagen für pharmazeutische Reinräume der aseptischen Produktion weiterhin nach veralteten Parametern ausgelegt und betrieben. Dies lässt sich insbesondere in Planungs- und Qualifizierungsunterlagen von Reinraum-Lüftungsanlagen feststellen, aber auch auf Webseiten von Planungsbüros finden sich solche Angaben [53]. Dadurch werden Möglichkeiten zur Energieeinsparung durch eine passende, anforderungsgerechte Einstellung von LWR für individuelle Reinräume nicht genutzt.

Branchenübergreifend bildet die EN ISO Norm 14644 den Stand der Technik ab [14]. Sie behandelt in ihren Teilen 1-14 die Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche [11]. Ergänzend dazu dient die VDI-Richtlinie 2083 „Reinraumtechnik“ als technisches Regelwerk für Anforderungen an Reinräume [3, 54].

Das Pendant zum deutschen VDI bildet das *Institute of Environmental Sciences and Technology* (IEST) [55] mit ihren Ausarbeitungen zu reinraumtechnischen „Recommended Practices“. Die FDA stützt sich in ihren Gesetzgebungen weitestgehend auf die Ausarbeitungen der IEST. Auch die „Recommended Practices“ der IEST stützen sich auf die aktuelle Fassung der ISO-Norm 14644 und erweitern bzw. ergänzen diese [3, 56].

Eine Möglichkeit, den gesamten Luftvolumenstrom und damit den Energiebedarf zu reduzieren, wäre die Minimierung des Raumvolumens, wie es zum Beispiel in kritischen Bereichen der Reinraumklassen A und B mit Restricted Access Barrier Systems (RABS) oder Isolatoren erfolgt [16]. Dadurch wird der benötigte Volumenstrom zur Raumbelüftung deutlich kleiner und der Energiebedarf für die Luftaufbereitung vertretbar. RABS und Isolatoren sind jedoch in vielen Klasse C - Prozessschritten mit großen Anlagen, wie z.B. Prozessbehälter, Waschmaschinen und Autoklaven, nicht anwendbar. Wo der Einsatz von RABS und Isolatoren jedoch auch in niedrigeren Reinraumklassen möglich ist, sollte deren Einsatz im Sinne der Qualitätssicherung und der Energieeinsparung berücksichtigt werden. Wenn dies nicht möglich ist, können andere Wege der Energieeinsparung besprochen werden [16].

Die bedarfsgesteuerte Filtration, engl. Demand Controlled Filtration (DCF) ist eine solche Möglichkeit, Energie zu sparen. Die HVAC arbeitet dann im Ruhezustand des Reinraums mit reduzierter Leistung. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass DCF ein erhebliches Potenzial zur Energieeinsparung hat [51, 52, 57]. Molenaar untersuchte in Reinräumen das Einsparpotential unter Anwendung dreier Faktoren [57]: Genauere Abstimmung der raumluftechnischen Anlage, bedarfsgesteuerte Ventilation und Optimierung des Strömungsverhaltens. Die bedarfsgesteuerte Ventilation könnte mit bis zu 93% Energiekosteneinsparung den größten Beitrag leisten. Dies wird durch Loomanns et. al. [51, 52] bestätigt. In diesen Studien ist die LWR auf bis zu 4 h^{-1} abgesenkt worden. Da im „at rest“ Zustand keine Partikelgeneration stattfindet, kann die HVAC-Anlage die LWR deutlich reduzieren. Dies ist besonders effektiv in Reinräumen, die oft nicht besetzt sind [57].

Die DCF wird aus Qualitätssicherungssicht kritisch betrachtet. Jede Veränderung der Luftwechselrate auch nur eines Raumes kann in einem laufenden Produktionsbetrieb die eingestellte Druckkaskade zu Korridoren oder Nachbarräumen zumindest während einer An- und Abfahrtphase verändern. Eine mögliche Umkehrung der Druckkaskade, die üblicherweise höhere Drücke in den Produktionsräumen gegenüber den Korridoren und Schleusen vorsieht, birgt dann das Risiko einer Kreuzkontamination durch veränderte Luftströmungen. Regelungstechnisch ließe sich dieses Risiko zwar vermei-

den, die kontinuierliche Einhaltung der Raumdruckdifferenzen muss dann aber aufwendig in der Reinraumqualifizierung nachgewiesen werden. So wird DCF in pharmazeutischen Unternehmen, wenn überhaupt, nur zur nächtlichen Abschaltung des kompletten Produktionsbereichs eingesetzt.

Bei einer reduzierten LWR steigt die Gefahr einer unentdeckten Überschreitung der mikrobiellen Kontamination. Um dieses Risiko zu kontrollieren, ist die kontinuierliche Überwachung nicht nur der Partikel, sondern auch der Anzahl der MCPs in der Reinraumluft durch den Einsatz von BFPCs von großem Nutzen [34]. Diese Geräte ermöglichen eine sofortige Erkennung erhöhter Keimbelastungen und bieten so die Chance, entsprechend zu reagieren. Ein Nachteil ist, dass Aktionsgrenzen für MCPs, die von BFPC-Systemen gemessen werden, noch nicht verfügbar sind [34, 58].

BFPC-Systeme arbeiten mit einem laserinduzierten Fluoreszenzprinzip [59]. Anders als klassische Laser-Partikelzähler, die Partikel durch Streulichtanalyse detektieren und klassifizieren, misst ein BFPC auch die Wellenlänge des gestreuten Lichts. In allen Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen) vorkommende Substanzen sind Dipicolinsäure, Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und Riboflavin [39, 60, 61]. Sie erzeugen ein Fluoreszenzsignal, das vom Gerät erkannt werden kann. Die unterschiedliche Wellenlänge unterscheidet lebensfähige Partikel von anderen. Allerdings werden auch abgestorbene Keime nachgewiesen, da sie diese Substanzen ebenfalls enthalten [58].

Ein Nachteil des Messprinzips ist die Möglichkeit einer falschen Detektion. Einige Substanzen, die nicht zur Gruppe der lebensfähigen Partikel gehören, verursachen dennoch ein Fluoreszenzsignal im BFPC und werden somit als „lebensfähig“ detektiert [34]. Eine dieser Substanzen ist 2-Propanol, welches zu Desinfektionszwecken in der aseptischen Herstellung weit verbreitet ist. Der Effekt eines falschen MCP-Nachweises durch die Verwendung von 2-Propanol wurde in früheren Studien beobachtet [41, 60].

Ein direkter Vergleich von BFPC-Messwerten mit konventionell auf Agarplatten oder -streifen gewachsenen KBE ist kaum möglich, wie von mehreren Wissenschaftlern beschrieben wird [60, 62–64]. Grund dafür ist die Abhängigkeit der KBE-Methoden von möglichem Wachstum auf Agarplatten. Allerdings wachsen nicht alle Mikroben auf

Agar, und Standardverfahren zur Inkubation unterstützen nicht das Wachstum aller lebensfähigen Partikel. Aus diesem Grund sind die gemessenen Werte von BFPC-Systemen typischerweise viel höher als die von herkömmlichen mikrobiellen Tests ermittelten Werte [34]. Dies erweist sich als großer Vorteil der BFPC-Systeme, da ein sofortiges MCP-Ergebnis angezeigt wird und dadurch Erkenntnisse über den allgemeinen mikrobiellen Status eines Reinraums gewonnen werden können. Obwohl der genaue Keimtypus zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt ist, sind diese Daten nicht nur im pharmazeutischen Betrieb, sondern auch für die Bewertung der Betriebsbereitschaft eines Reinraums im Zuge der Qualifizierung wertvoll. Sie minimieren die Zeit, die zum Auffinden von Keimquellen in der Reinrauminstallation erforderlich ist [34, 37, 65].

5 ZIELSETZUNG

Zur Beantwortung der definierten Forschungsfragen wurde die Vorgehensweise wie folgt strukturiert:

1. **Recherche zum Stand der Anforderungen an pharmazeutische Reinräume**

Der Fokus dieser Untersuchung lag auf den Unterschieden der Anforderungen nationaler und internationaler Richtlinien und Normen sowie auf der Theorie der LWR. Weiterhin wurde der Stand von Wissenschaft und Technik für den Bereich der Energieeinsparung beim Betrieb von Reinräumen sowie zur Anwendung von BFPC-Systemen untersucht.

2. **Durchführung und Analyse von Versuchen in einem Test-Reinraum der Reinraumklasse C bei unterschiedlichen LWR zur Bewertung der Erholzeit.**

In dieser Studie wurde untersucht, welche Erholzeiten bei verschiedenen LWR in der Praxis zu erwarten sind. Die Forschungsfrage bei diesen Versuchen lautete: Welche LWR ist erforderlich, um die geforderte Erholzeit von 15-20 Minuten zu erreichen? Zu diesem Zweck wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: Bei der ersten Versuchsreihe lag der Fokus auf dem Verhalten der 0,5 µm Partikel, die zweite Versuchsreihe betrachtete die 5 µm Partikel.

3. **Durchführung und Analyse von Versuchen in einem Test-Reinraum der Reinraumklasse C bei unterschiedlichen LWR und verschiedenen Bekleidungen zur Bewertung der Partikel- und Keimbelastung „in operation“ unter Verwendung von Partikelzählern, Luftkeimsammlern und eines BFPC - Echtzeitkeimzählers.**

Die erste Forschungsfrage für diese experimentelle Studie lautete: Welche LWR ist erforderlich, um die regulatorischen Erwartungen für den Status „in operation“ in einem pharmazeutischen Reinraum Klasse C zu erfüllen? Diese Frage führte zu einem Studiendesign mit vier verschiedenen LWR kombiniert mit vier unterschiedlichen Reinraumbedingungen bezüglich Kleidung und Verhalten des Personals.

Ziel der Versuchsreihe war, die erforderliche Mindest-LWR zu ermitteln, um die Grenzwerte der behördlichen Richtlinien in Bezug auf 0,5 µm und 5 µm Partikel sowie KBE / m³ und auf Sedimentationsplatten einzuhalten.

Zeitgleich wurde bei den Versuchen ein Echtzeitkeimzähler zum Vergleich der MCPs mit den ermittelten KBE eingesetzt. Die zweite Forschungsfrage für diesen Teil der Studie lautete daher: Sind BFPCs geeignet, um den mikrobiellen Status von Reinräumen zuverlässig zu überwachen und somit eine kontinuierliche Kontrolle der Partikel- und Keimbelastung mit dem Ziel der Reduzierung von Luftwechselraten zu gewährleisten, und was ist ein angemessener Aktionsgrenzwert für MCPs?

4. **Durchführung und Analyse von Versuchen in einem Produktions-Reinraum der Reinraumklasse C bei einem biopharmazeutischen Unternehmen unter Verwendung eines Partikelzählers und eines Echtzeitkeimzählers.**

Diese Studie diente dem Vergleich mit den Versuchen aus dem Test-Reinraum und zum Nachweis der Replizierbarkeit der Ergebnisse. Zusätzlich wurde ein Versuch in einer Personenschleuse zur Analyse der Partikel- und MCP-Belastung während des Umkleideprozesses durchgeführt.

6 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien wurden anschließend in insgesamt sechs Publikationen in vier unterschiedlichen, peer-reviewten Journalen veröffentlicht.

6.1 Erste Publikation: „Optimale Luftwechselraten in Reinräumen“

Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Optimale Luftwechselraten in Reinräumen. <i>TechnoPharm</i> 10, Nr. 1. Editio Cantor Verlag 2020 S. 6-15

Anteil an der Publikation: 50%: Konzeptionierung des Beitrags, Prüfung der Rohfassung und Vollständige Überarbeitung des Manuskripts.

In der ersten Publikation zu dieser Dissertation wurde zunächst ein Überblick zum Stand der regulatorischen Anforderungen an Reinräume und deren Umsetzung in der Praxis gegeben [3]. Die Literaturrecherche zeigte, dass LWR in pharmazeutischen Reinräumen häufig höher eingestellt werden als tatsächlich zur Einhaltung der GMP-Anforderungen erforderlich sind. Dies hat seine Ursache in veralteten, nicht wissenschaftlich belegten Vorgaben, die jedoch noch immer bei Planung und Betrieb von HVAC-Anlagen Anwendung finden [1]. Darüber hinaus werden Anlagen durch die Auslegung für zu große Arbeitsbereiche oft überdimensioniert und auch dauerhaft, ohne die Nutzung von DCF, betrieben, was zu einer weiteren Erhöhung des Energiebedarfs führt [42].

6.2 Zweite und dritte Publikation „Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate“

Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.:
Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate
Teil 1. *Technopharm* 10, Nr. 5. Editio Cantor Verlag 2020, S. 284–288.

Anteil an der Publikation: 50%: Konzeptionierung des Beitrags, Methodenentwicklung, Durchführung der Versuche, Prüfung der ermittelten Daten, Prüfung der Rohfassung und Vollständige Überarbeitung des Manuskripts.

Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.:
Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate
Teil 2. *Technopharm* 11, Nr. 2. Editio Cantor Verlag 2021, S. 94-99.

Anteil an der Publikation: 70%: Konzeptionierung des Beitrags, Methodenentwicklung, Versuchsdurchführung, Analyse und Visualisierung der ermittelten Daten. Anteilige Erstellung der Rohfassung des Manuskripts. Vollständige Überarbeitung des Manuskripts.

Für die zweite und dritte Publikation (Veröffentlichung in zwei Teilen) wurden Versuche in einem Test-Reinraum mit dem Ziel der Ermittlung der Erholzeit bei unterschiedlichen LWR durchgeführt [18, 19].

In dieser experimentellen Studie wurde nachgewiesen, dass die empfohlene Erholzeit sowohl für 0,5 µm als auch für 5 µm große Partikel selbst an kritischen Messpunkten, z.B. unter der Reinraumwerkbank, bereits mit einer LWR von 10 h⁻¹ eingehalten werden kann. Sie widerlegen damit auch die Aussage von Bieber, dass die „geforderte ‚Clean-up‘-Periode von 15 bis 20 Minuten ... nur mit einem etwa 20-fachen Luftwechsel zu erreichen“ sei [22, S. 1322]. Selbst bei maximaler Partikelbelastung im „in operation“ – Status wurde der „at rest“ Status an der ungünstigsten Position mit LWR 10 innerhalb von 19 Minuten erreicht. Hierbei muss außerdem berücksichtigt werden, dass die maximale Partikelbelastung im realen Produktionsbetrieb praktisch nicht auftritt, da dies bereits eine Abweichung von der Spezifikation darstellen würde und genau das durch die HVAC verhindert wird. Die tatsächliche Erholzeit wird also immer geringer sein. In den beiden Versuchsreihen zu dieser Studie wurde ein deutlicher Unterschied der Erholzeiten für Partikel ≥0,5 µm und ≥5,0 µm festgestellt. Die großen Partikel wurden nahezu doppelt so schnell abgereichert, was auf zwei Gründe zurückzuführen ist: Eine schnellere Sedimentation der schwereren Partikel und eine

verzögerte Abreinigung der kleineren Partikel durch eine stärkere Verwirbelung im Raum.

Die bei dieser Publikation zugrunde liegende Forschungsfrage: „Welche LWR ist erforderlich, um die geforderte Erholzeit von 15-20 Minuten zu erreichen?“, wird auf Basis der Versuchsergebnisse mit 10 h^{-1} beantwortet.

6.3 Vierte Publikation: “Effects of different air change rates on cleanroom ‘in operation’ status”

Behrens, D., Schäfer, J., Keck, C., Runkel, F.: Effects of different air change rates on cleanroom ‘in operation’ status. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Taylor and Francis 2022, S. 1–13. DOI: 10.1080/03639045.2022.2043352

Anteil an der Publikation: 80%: Konzeptionierung des Beitrags, Methodenentwicklung, Durchführung der Versuche, Analyse und Visualisierung der ermittelten Daten. Vollständige Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts.

Der vierten Publikation liegen sehr umfangreiche Versuche im Test-Reinraum zugrunde. Hierbei wurden vier unterschiedliche LWR (20 h^{-1} , 15 h^{-1} , 12 h^{-1} , 10 h^{-1}) mit vier unterschiedlichen Bekleidungen vom Reinraumoverall bis zu kurzer Freizeitkleidung kombiniert und in insgesamt 32 Versuchen die Partikelzahlen und KBE ermittelt [16]. Darüber hinaus wurden verschiedene Betriebszustände „at rest“ und „in operation“ in produktionsähnlicher Umgebung gemessen und im Falle der Freizeitbekleidung durch eine zusätzliche Phase unangemessenem Reinraumverhaltens des Personals (Rennen, Armwedeln) auch im Hinblick auf bewusst erzeugte Partikel- und Keimemission in Grenzsituationen betrachtet. Die Partikelzahlen wurden an vier verschiedenen Punkten im Raum, und die koloniebildenden Einheiten mit zwei unterschiedlichen Luftkeimsammlern sowie zusätzlich ausgelegten Sedimentationsplatten aufgenommen.

Die Auswertung der Partikelmessungen führte zu dem sehr deutlichen Ergebnis, dass bereits mit 10-fachem Luftwechsel der „in operation“ Grenzwert für die $0,5 \mu\text{m}$ Partikel um den Faktor 104 und für die $5 \mu\text{m}$ Partikel um den Faktor 18 unterschritten wurde. Tatsächlich wurde bei reinraumgerechter Kleidung nicht einmal der Grenzwert für den

„at rest“ Status überschritten. Besonders deutlich zeigten auch die Daten für die nicht reinraumgerechte Kleidung (kurze Hose, T-Shirt), dass eine LWR von 10 h^{-1} kein Problem für einen Reinraum darstellt. Hier wurde der „in operation“ Grenzwert für die $0,5 \mu\text{m}$ Partikel um den Faktor 37 und für die $5 \mu\text{m}$ Partikel um den Faktor 3 unterschritten. Dies belegt die hohe Sicherheit des Reinraumbetriebs mit LWR 10.

Höhere LWR können jedoch individuell für Räume mit speziellen Prozessbedingungen, z. B. Wärmeerzeugung der Ausrüstung, erforderlich sein. Für diese Räume muss dann die LWR zum Zwecke der Wärmeabfuhr angepasst werden, sofern keine andere technische Lösung, wie zum Beispiel eine Wasserkühlung des Equipments, angewendet werden kann.

Bei den KBE zeigte sich dann, dass reinraumgerechte Kleidung, wie z.B. ein Tyvek®-Einweg-Overall oder wiederverwendbare Overalls aus Polyestergewebe, erforderlich ist, um Keimemissionen zu minimieren. Bei den in der Studie als Reinraumkleidung verwendeten Tyvek®-Overalls wurden im Mittel bei LWR 10 nur 3 von maximal 100 erlaubten KBE/ m^3 gefunden. Bei kurzer Freizeitkleidung stieg dieser Wert auf 129 an einer Messstelle an, was eine Überschreitung des zulässigen Grenzwerts bedeutet. Die andere Messstelle zur Luftkeimsammlung blieb selbst bei dieser Konstellation mit ungeeigneter Bekleidung mit 59 KBE/ m^3 noch im zulässigen Bereich des Annex 1.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Versuche lässt sich die Forschungsfrage „Welche LWR ist erforderlich, um die regulatorischen Erwartungen für den Status „in operation“ in einem pharmazeutischen Reinraum Klasse C zu erfüllen?“ eindeutig mit 10 h^{-1} beantworten. Die ermittelten Daten belegen, dass die FDA-Empfehlung eines 20-fachen Luftwechsels für Reinräume der Klasse C als nicht mehr dem Stand von Wissenschaft und Technik entsprechend angesehen werden kann.

6.4 Fünfte Publikation: „Application of biofluorescent particle counters for real-time bioburden control in aseptic cleanroom manufacturing”

Behrens, D., Schäfer, J., Keck, C., Runkel, F.: Application of biofluorescent particle counters for real-time bioburden control in aseptic cleanroom manufacturing. *Applied Sciences*. MDPI 2022. Under review.

Anteil an der Publikation: 80%: Konzeptionierung des Beitrags, Methodenentwicklung, Durchführung der Versuche, Analyse und Visualisierung der ermittelten Daten. Vollständige Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts.

Die Daten für die fünfte Publikation wurden bei den gleichen Versuchen wie zuvor ermittelt. Hierbei wurden die zusätzlich durch den BFPC erfassten Daten ausgewertet und mit den Partikel- und Keimzahlen verglichen [34].

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die gute Anwendbarkeit von BPFC-Systemen in pharmazeutischen Reinräumen für die aseptische Produktion. Dies zeigt sich insbesondere in der schnellen Erkennung einer absichtlich erzeugten MCP-Generation während der Testläufe mit kurzer Freizeitkleidung im Reinraum. In einer fünfminütigen zusätzlichen Testphase wurde bewusst eine hohe Last an Partikeln und Keimen erzeugt, indem das Personal im Reinraum hin- und herlief und dabei mit den Armen wedelte. Diese schnellen Bewegungen in kurzer Freizeitkleidung (kurze Hose und T-Shirt) wurden unmittelbar von den Partikelzählern und dem BFPC detektiert. Auch auf den Agarplatten und -streifen konnte die erhöhte KBE-Belastung nach der Inkubation festgestellt werden. Die sofortige Erkennung einer mikrobiellen Kontamination durch einen BFPC kann von großem Vorteil gegenüber den klassischen, Agar-basierten Methoden sein, um Abweichungen wie die diese im laufenden Betrieb zu erkennen. Sie ermöglicht dem Hersteller, Reinräume mit einem reduzierten LWR von 10 h^{-1} zu betreiben, um Energie zu sparen, ohne die Qualitätsanforderungen für Reinräume nach Klasse C zu beeinträchtigen.

Aus diesen Versuchen wurde ein MCP-Wert von max. $1.000 / \text{m}^3$ als möglicher Grenzwert für MCP/ m^3 in Reinräumen der Klasse C ermittelt. Es ist der Messwert des BFPCs, bei dem durch die Luftkeimsammler gerade noch keine Überschreitung der KBE-Grenzwerte aufgenommen werden konnte. Er stellt demnach einen Aktions-

grenzwert dar. Dieser Wert kann als Ausgangswert für Validierungsstudien in individuellen Reinräumen eines Betreibers herangezogen werden. Damit kann im Anschluss der Wert von max. 1.000 MCP/m³ aus dieser Studie bestätigt oder gegebenenfalls angepasst werden. Zusätzlich sollte ein Warnwert in Höhe von 75-80% des Aktionsgrenzwerts festgelegt werden, um erhöhte MCP-Belastungen frühzeitig zu erkennen. Bei Überschreitung von Warnwerten kann dann noch rechtzeitig eingegriffen werden, was durch die Inkubationszeit bei der KBE-Ermittlung nicht möglich ist. Darüber hinaus kann die Frequenz des Luftkeim-Monitoring bei kontinuierlicher Unterschreitung der MCP-Warnwerte reduziert werden, was zusätzlich kostensparend wirken kann. Weber et al. [60] zeigen eine Rechnung von ca. \$ 1 pro Agarplatte zuzüglich \$ 6-10 für Laborkosten auf. Die Anzahl jährlich verbrauchter Monitoring-Platten beziffern die Autoren für zahlreiche Standorte auf über 500.000 [60]. Bei Kosten in Höhe von ca. € 90.000 für einen BFPC kann sich aus einer möglichen Reduzierung des Luftkeim-Monitoring die Anschaffung schnell amortisieren.

Ein zweiter Vorteil kann die beschleunigte Inbetriebnahme und Qualifizierung von Reinräumen bei Renovierungs- oder Neubauprojekten sein. „Keimherde“ in einem Reinraum können durch gezielte Suche mit der Messsonde schnell gefunden werden, wie von Bhupathiraju et al. beschrieben wird [40]. Auch für die Schulung von Mitarbeitern zum Verhalten im Reinraum können BFPCs anschaulich eingesetzt werden [60]. Der Einfluss möglichen Fehlverhaltens kann dabei ohne Risiko vorgeführt und den Mitarbeitern veranschaulicht werden.

Bei der Reinraumqualifizierung kann eine mehrtägige Phase der Luftkeimsammlung und Inkubation zur Ermittlung des Keimstatus vor dem Beginn der Leistungsqualifizierung entfallen, da mittels BFPC-Messung der Reinraum direkt zur Leistungsqualifizierung freigegeben werden kann [40, 58]. Dies hat unmittelbaren Einfluss auf den Termin zum Abschluss der Qualifizierung und somit auch auf den Beginn der kommerziellen Produktion.

Wie von anderen Autoren berichtet, wurde auch während dieser Experimente der Effekt einer falsch positiven Detektion von MCPs durch fluoreszierende Substanzen wie 2-Propanol sichtbar [41, 60, 62]. Eaton et al. bewerten in ihrer Studie von 2012 diesen Effekt als so schwerwiegend, dass sie BFPCs nicht zur kontinuierlichen

Überwachung empfehlen [41]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestätigen diese Einschätzung nicht. Der Einfluss von 2-Propanol auf die Messergebnisse ließ sich eindeutig zuordnen. Bei Verzicht auf Sprühflaschen können solche Effekte auch ausgeschlossen werden. Daher sollten Hersteller die Verwendung von Desinfektionssprühflaschen in Räumen vermeiden, in denen solche Detektionssysteme verwendet werden.

Die Forschungsfrage: „Sind BFPCs geeignet, um den mikrobiellen Status von Reinräumen zuverlässig zu überwachen und somit eine kontinuierliche Kontrolle der Partikel- und Keimbelastung mit dem Ziel der Reduzierung von Luftwechselraten zu gewährleisten, und was kann ein angemessener Aktionsgrenzwert für MCPs sein?“, kann im ersten Teil bejaht werden. Der Aktionsgrenzwert, ab dem auch eine Überschreitung der zulässigen KBE/m³ zu erwarten ist, wurde in dieser Arbeit mit 1000 /m³ ermittelt.

Sobald ein allgemein anwendbarer MCP-Grenzwert für Reinräume der Klasse C gefunden ist, wird dies sehr wahrscheinlich die Verwendung und Akzeptanz von BFPC-Systemen in der pharmazeutischen Industrie verbessern.

6.5 Sechste Publikation: „Anwendung eines Echtzeit-Keimzählers zur Überwachung des Reinraumstatus“

Behrens, D., Große Jäger, J., Elter, P., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.:
Anwendung eines Echtzeit-Keimzählers zur Überwachung des Reinraumstatus.
cleanroom & processes 2/2022. Editio Cantor Verlag

Anteil an der Publikation: 50%: Konzeptionierung des Beitrags, Methodenentwicklung, Anteilige Erstellung der Rohfassung und vollständige Überarbeitung des Manuskripts.

Die sechste Publikation beschreibt die vergleichenden Messungen mit einem Partikelzähler und einem BFPC in einem Produktionsraum eines biopharmazeutischen Herstellers [66]. Der Versuchsablauf wurde dabei ähnlich gehalten wie zuvor im Test-Reinraum. Zusätzlich wurde noch die Partikel- und MCP-Emission in der Personalschleuse während des Umkleideprozesses untersucht. Das Ziel dieser Studie war die

Überprüfung, ob die zuvor im Test-Reinraum ermittelten Daten auch in Räumen der pharmazeutischen Routineproduktion auf gleichem Niveau liegen. Der Produktionsraum wurde mit LWR 20 h^{-1} betrieben. Sowohl bei den gemessenen Partikeln als auch bei den MCPs war eine gute Vergleichbarkeit der beiden Klasse C – Reinräume gegeben. Somit konnte auch gezeigt werden, dass in gleichartigen Räumen mit gleichartiger Kleidung bei der Anwendung dieser Messtechnik reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können.

Zusammengefasst geht aus dieser Dissertation hervor, dass Werte von 20 h^{-1} und mehr Luftwechsell für die Einhaltung der geforderten Partikelkonzentration in Reinraumklasse C deutlich zu hoch angesetzt sind. In Kombination mit einem bedarfsgesteuerten Betrieb der Lüftungsanlage besteht demnach ein großes Potential, Energiekosten einzusparen. Sofern eine höhere LWR nicht aufgrund besonderer Anforderungen, zum Beispiel zum Zwecke der Wärmeabfuhr, eingestellt werden muss, ist eine Reduzierung der LWR zur Nutzung dieses Potentials nach den vorliegenden Ergebnissen sinnvoll und realisierbar [16].

Eine Halbierung der weit verbreiteten LWR von 20 h^{-1} auf einen tatsächlichen wissenschaftlich fundierten Wert von 10 h^{-1} würde den Energiebedarf von HVAC-Systemen in der pharmazeutischen Industrie um 25–30% senken, weil dadurch die erforderliche Lüfterleistung, Heizung, Kühlung und Befeuchtung reduziert würden [1].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine enorme Differenz zwischen gesetzlichen Grenzwerten und tatsächlich gemessenen Werten – selbst bei nicht reinraumtauglicher Kleidung [16]. Die hohe Abweichung zwischen gemessenen und geforderten Werten schafft einen enormen Sicherheitspuffer, der andere Probleme im Reinraumbetrieb, wie zum Beispiel fehlerhaftes Verhalten durch nicht ausreichend geschultes Personal, überdecken kann. Dies ähnelt dem „Sea of Inventory“-Prinzip im Operations Management, wie es von Slack [67] beschrieben wird: Ein höherer Speicherbestand kann potenzielle Lieferprobleme vermeiden, verschleiert aber auch die Probleme selbst [16]. Dadurch wird die eigentliche Problemerkennung und Problemlösung

behindert. Ein besserer Weg wäre, die Grenzwerte zu senken, um eine Problemaufdeckung im Sinne eines kontinuierlichen Verbesserungsprozesses für das Qualitätsmanagement zu ermöglichen.

Als weiteres Ergebnis dieser Forschungsarbeit kann auch eine Neudefinition der Anforderungen für die Grenzwerte der Klasse C von den Regulierungsbehörden mit den folgenden Parametern in Betracht gezogen werden [16]:

- (1) Keine Anforderung oder Empfehlung für Mindest-LWR.
- (2) Reduzierung der Klasse-C-Grenzwerte für 0,5- μm -Partikel „im Betrieb“ von 3.5200.000 auf 352.000 (Faktor 10).
- (3) Reduzierung der Grenzwerte der Klasse C für 5 μm „in operation“-Partikel von 29.000 auf 14.500 (Faktor 2).
- (4) Reduzierung der Grenzwerte für Luftkeime in der Klasse C von 100 KBE/ m^3 auf 50 KBE/ m^3 (Faktor 2).

Mit diesen Maßnahmen würde der Betrieb von Lüftungsanlagen im GMP-regulierten Bereich nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Versteckte Probleme kämen jedoch zum Vorschein und könnten dann im Rahmen des Qualitätsmanagementsystems effektiv behandelt werden [16].

Reinräume können mit einer LWR von 10 h^{-1} nachhaltig und effizient betrieben werden. Die kontinuierliche Kontrolle von Partikeln und MCPs mittels BFPC-Messgeräten kann dabei für die notwendige Sicherheit sorgen, dass die Reinräume innerhalb der regulatorisch vorgegebenen Grenzen bleiben [34]. Signifikante Kosteneinsparungen durch reduzierten Energieverbrauch sowie eine verbesserte CO_2 -Bilanz wären der angestrebte Nutzen für die Wirtschaftlichkeit der Unternehmen und den Umweltschutz.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACR	Air Change Rate
AHU	Air Handling Unit
BFPC	Biofluorescent Particle Counter
CFU	Colony Forming Units
DCF	Demand-Controlled Filtration
DIN	Deutsches Institut für Normung
EN	Europäische Norm
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration
GMP	Good Manufacturing Practice
HVAC	Heating, Ventilation and Air Conditioning
IEST	Institute of Environmental Sciences and Technology
ISO	International Organization for Standardization
ISPE	International Society for Pharmaceutical Engineering
KBE	Koloniebildende Einheiten
LWR	Luftwechselrate
MCP	Microbe Carrying Particle
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
QM	Qualitätsmanagement
RABS	Restricted Access Barrier System
TSA	Tryptic Soy Agar
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
WHO	World Health Organization

8 REFERENZEN

- [1] A. Fedotov, Saving energy in cleanrooms, *Cleanroom Technology*, Nr. 8, S. 14–18, 2014.
- [2] J. Feddern, Innovative Lösungen für bessere Energieeffizienz in Reinräumen, *Contamination Control Report*, S. 4–9, 2009.
- [3] D. Behrens, J. Bachhofer, B. S. Zipp, C. Keck, J. Schäfer und F. Runkel, Optimale Luftwechselraten in Reinräumen: Spannungsfeld zwischen Partikelanreicherung und Wirtschaftlichkeit, *Technopharm*, Nr. 01, S. 6–15, 2020.
- [4] European Commission, *Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines*. [Online]. Verfügbar unter: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_de (Zugriff am: 9. Juli 2022).
- [5] Food & Drug Administration, *CFR - Code of Federal Regulations Title 21: Part 211 Current Good Manufacturing Practice For Finished Pharmaceuticals*. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=211> (Zugriff am: 9. Juli 2022).
- [6] European Commission, *Guide to Good Manufacturing Practice, Annex 1*, 2008.
- [7] European Commission, *Annex 1 draft 2020 - Manufacture of sterile medicinal products*. Brussels: Belgium. Verfügbar unter: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/gmp/2020_annex1ps_sterile_medicinal_products_en.pdf (Zugriff am: 9. Juli 2022).
- [8] Food and Drug Administration, *Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice*. Rockville: MD.
- [9] S. Chen, A. Butterworth und L. Jiang, Air quality indices and cleanroom ventilation equations, and their application in a cleanroom HVAC system, Part one: theoretical considerations, *Clean Air and Containment Review*, Nr. 37, S. 4–10, 2019.
- [10] W. Whyte, T. Eaton, W. M. Whyte, N. Lenegan, S. Ward und K. Agricola, Calculation of air supply rates and concentrations of airborne contamination in non-UDAF cleanrooms, *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, Nr. 4, S. 126–138, 2017.
- [11] *ISO 14644-1 Cleanrooms and associated controlled environments-Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration*, DIN EN ISO, Berlin.
- [12] H. Reinhardt, Reinigung der Außenluft verbessert Innenluft, *HLH*, Nr. 7, S. 445–449, 1993.

-
- [13] T. Krebsbach, Hg., *Reinraum in der pharmazeutischen Industrie : Anwendung und Technik*, 1. Aufl. Editio-Cantor-Verlag, Aulendorf. 2019.
- [14] C. Moschner, Keimmessungen in der Body-Box, S. 1–4, Apr. 2015. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.reinraum.de/news.html?id=3170> (Zugriff am: 6. Juni 2022).
- [15] L. Schnieder, C. Panhans und T. Höltker, Fabrikplanung im GMP-Umfeld, *Technopharm*, Nr. 2, S. 76–83, 2018.
- [16] D. Behrens, J. Schaefer, C. M. Keck und F. E. Runkel, Effects of different air change rates on cleanroom 'in operation' status, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, S. 1–13, 2022, doi: 10.1080/03639045.2022.2043352.
- [17] L. Gail und D. Stanischewski, Facts and Fiction in Cleanroom Metrology, *Journal of the IEST*, Nr. 1, S. 1–8, 2010, doi: 10.17764/jiet.53.1.1347kx8001212686.
- [18] D. Behrens, J. Bachhofer, B. Zipp, C. Keck, J. Schäfer und F. Runkel, Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Pt.2, *Technopharm*, Nr. 02, 2021.
- [19] D. Behrens, J. Bachhofer, B. Zipp, C. Keck, J. Schäfer und F. Runkel, Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Pt.1, *Technopharm*, Nr. 05, S. 284–288, 2020.
- [20] W. Whyte, N. Lenegan und T. Eaton, Ensuring the air supply rate to a cleanroom complies with the EU GGMP and ISO 14644-3 recovery rate requirements, *Clean Air and Containment Review*, Jg. 26, S. 22–24, 2016.
- [21] *World Health Organization, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: Forty-fifth Meeting Report*. Geneva: World Health Organization, 2011. [Online]. Verfügbar unter: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=975399> (Zugriff am: 9. Juli 2022).
- [22] U. Bieber, FDA-gerechte Qualifizierung lufttechnischer Anlagen, *pharmind*, Nr. 8, S. 1321–1329, 2012.
- [23] M. Hirlinger, *Basisinformationen zur Reinraumtechnik*. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.novum-reinraumtechnik.de/reinraumtechnik-2/basisinformationen-reinraumtechnik/#toggle-id-6> (Zugriff am: 10. Juni 2022).
- [24] T. Schroerie, Basic Clean Room Requirements | Designs for GMP Clean Rooms, *PharmOut*, 5. Okt. 2021, 2021. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.pharmout.net/basic-cleanroom-requirements/> (Zugriff am: 10. Juni 2022).
- [25] W. Whyte, The application of the ventilation equations to cleanrooms - Part 2: decay of contamination, *Clean Air and Containment Review*, October, S. 4, 2014.

-
- [26] W. Whyte, M. W. Whyte und T. Eaton, The application of the ventilation equations to cleanrooms Part 1: The equations, *Clean Air and Containment Review*, Nr. 12, 2012.
- [27] W. Whyte, W. M. Whyte, T. Eaton und N. Lenegan, Calculation of air supply rates for nonunidirectional airflow cleanrooms, *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, Nr. 4, S. 121–129, 2014.
- [28] W. Whyte, S. Ward, W. M. Whyte und T. Eaton, Decay of Airborne Contamination and Ventilation Effectiveness of Cleanrooms, *International Journal of Ventilation*, Nr. 3, S. 211–220, 2014, doi: 10.1080/14733315.2014.11684049.
- [29] W. Whyte, N. Lenegan und T. Eaton, Calculation of airborne cleanliness and air supply rate for non-unidirectional airflow cleanrooms, *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, Nr. 3, S. 79–88, 2016.
- [30] W. Whyte, W. M. Whyte, S. Ward und K. Agricola, Ventilation effectiveness in cleanrooms and its relation to decay rate, recovery rate, and air change rate, *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, Nr. 4, S. 126–134, 2018.
- [31] W. Sun *et al.*, Development of cleanroom required airflow rate model based on establishment of theoretical basis and lab validation, *ASHRAE Transactions*, 87, 2010.
- [32] P. Mičko *et al.*, Impact of the Speed of Airflow in a Cleanroom on the Degree of Air Pollution, *Applied Sciences*, Nr. 5, S. 2466, 2022, doi: 10.3390/app12052466.
- [33] C. Appleby, *Applying QRM to Air Change Reduction*. 2017. [Online]. Verfügbar unter: <https://ispe.org/pharmaceutical-engineering/july-august-2017/applying-qrm-air-change-reduction> (Zugriff am: 9. Juli 2022).
- [34] D. Behrens, J. Schaefer, C. M. Keck und F. E. Runkel, Application of biofluorescent particle counters for real-time bioburden control in aseptic cleanroom manufacturing, *Applied Sciences*. (July 2022: Under review).
- [35] M. J. Miller, H. Lindsay, R. Valverde-Venura und M. J. O'Conner, Evaluation of the BioVigilant IMD-A, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles (Pt.1), *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, S. 245–258.
- [36] S. Parat, Contribution of particle counting in assessment of exposure to airborne microorganisms, *Atmospheric Environment*, Nr. 6, S. 951–959, 1999, doi: 10.1016/S1352-2310(98)00218-0.
- [37] T. Sandle, Real-time counting of airborne particles and microorganisms: A new technological wave?, *Clean Air and Containment Review*, Nr. 9, 2012.
-

-
- [38] A. Scott *et al.*, A Discussion on Bio-Fluorescent Particle Counters: Summary of the Process and Environmental Monitoring Methods Working Group Meeting with the FDA Emerging Technology Team, *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, Nr. 2, S. 207–212, 2021, doi: 10.5731/pdajpst.2020.012419.
- [39] T. Sandle, C. Leavy, H. Jindal und R. Rhodes, Application of rapid microbiological methods for the risk assessment of controlled biopharmaceutical environments, *Journal of applied microbiology*, Nr. 6, S. 1495–1505, 2014, doi: 10.1111/jam.12487.
- [40] V. K. Bhupathiraju, B. Varnau, J. R. Nelson, J. P. Jiang und C. Bolotin, Evaluation of an Instantaneous Microbial Detection System in Controlled and Cleanroom Environments, *BioPharm International*, Nr. 20, S. 35–46, 2007.
- [41] T. Eaton, C. Davenport und W. Whyte, Airborne microbial monitoring in an operational cleanroom using an instantaneous detection system and high efficiency microbiological samplers, 2012. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.semanticscholar.org/paper/f1a3b5229facc31cc564b9788ebd4036acda9574> (Zugriff am: 9. Juli 2022).
- [42] D. Faulkner, Energy savings in cleanrooms from demand-controlled filtration, *J. Inst. Environ. Sci.*, Nr. 6, S. 21, 1996.
- [43] W. Tschudi, K. Benschine, S. Fok und P. Rumsey, Cleanroom energy benchmarking in high-tech and biotech industries, Lawrence Berkeley National Lab., CA (US) LBNL-47729; HT-428.
- [44] W. Tschudi, Cleanroom energy benchmarking results, *ASHRAE Trans*, S. 733, 2002.
- [45] Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten, *Aide mémoire 07120606: Überwachung von Sterilherstellern*. Verfügbar unter: <https://www.zlg.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=2595&token=bea27a94f3c61bb105cff2b109178c2ae3349937> (Zugriff am: 13. Juli 2022).
- [46] W. Tschudi, K. Benschine, S. Fok und P. Rumsey, Cleanroom energy benchmarking in high-tech and biotech industries, Lawrence Berkeley National Lab., CA (US) LBNL-47729; HT-428.
- [47] H. Flechl, R. Röcker und H. Schicht, *Raumlufttechnik im pharmazeutischen Herstellungsbetrieb: GMP-konforme Gestaltung der Lüftungstechnik für die Arzneimittelherstellung*, 1. Aufl. Maas & Peither GMP Verlag, Schopfheim. 2017.
- [48] *VDI 2083 Part 4.2: Cleanroom technology: Energy efficiency*, VDI, Berlin. 2011.
- [49] ISPE, *Baseline Pharmaceutical Engineering Guide: Volume 3: Sterile Product Manufacturing Facilities, 3rd ed.* Tampa, FL: ISPE, 2018.
- [50] ISPE, *Baseline Pharmaceutical Engineering Guide: Volume 3: Sterile Product Manufacturing Facilities, 2nd ed.* 2nd ed. Tampa, FL: ISPE, 2011.
-

-
- [51] M. Loomans, T. Ludlage, H. van den Oever, P. Molenaar, H. Kort und P. Joosten, Experimental investigation into cleanroom contamination build-up when applying reduced ventilation and pressure hierarchy conditions as part of demand controlled filtration, *Building and Environment*, 2020, doi: 10.1016/j.buildenv.2020.106861.
- [52] M. Loomans, P. Molenaar, H. Kort und P. Joosten, Energy demand reduction in pharmaceutical cleanrooms through optimization of ventilation, *Energy and Buildings*, 2019, doi: 10.1016/j.enbuild.2019.109346.
- [53] M. Mayer, *Grundbegriffe GMP*. [Online]. Verfügbar unter: <https://mmi-gmp.de/grundbegriffe-gmp/> (Zugriff am: 13. Juli 2022).
- [54] *VDI 2083 Part 1 Cleanroom Technology - Particulate air cleanliness classes*, VDI 2083, VDI, Berlin. 2013.
- [55] *Institute of Environmental Sciences and Technology*. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.iest.org/> (Zugriff am: 13. Juli 2022).
- [56] L. Gail und U. Gommel, *Reinraumtechnik*. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [57] P. Molenaar, Ventilation efficiency improvement in pharmaceutical cleanrooms for energy demand reduction, Eindhoven University of Technology, 2017. [Online]. Verfügbar unter: https://pure.tue.nl/ws/portalfiles/portal/58774864/molenaar_0785502.pdf (Zugriff am: 13. Juli 2022).
- [58] F. Ayers *et al.*, Biofluorescent particle counter-based real-time feedback and control of processing conditions, *European Pharmaceutical Review*, Nr. 4, S. 54–57, 2019.
- [59] S. C. Hill *et al.*, Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles, *Field Analytical Chemistry & Technology*, 4-5, S. 221–239, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1520-6521(1999)3:4/5<221::AID-FACT2>3.0.CO;2-7.
- [60] J. Weber *et al.*, Continuous Microbiological Environmental Monitoring for Process Understanding and Reduced Interventions in Aseptic Manufacturing, *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, Nr. 2, S. 121–134, 2019, doi: 10.5731/pdajpst.2018.008722.
- [61] B. M. Andon, Active air vs. passive air (settle plate) monitoring in routine environmental monitoring programs, *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, 2006.
- [62] Sandle, T. Leavy, C. Rhodes, R., Assessing airborne contamination using a novel rapid microbiological method, *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*, 19 (4), S. 131–141, 2014.
- [63] A. Prasad *et al.*, Practical Applications of Biofluorescent Particle Counting in Environmental Monitoring Investigations, *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, Nr. 3, S. 318–323, 2020, doi: 10.5731/pdajpst.2019.009969.
-

- [64] T. Eaton, C. Wardle und W. Whyte, Use of a real-time microbial air sampler for operational cleanroom monitoring, *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, Nr. 2, S. 172–184, 2014, doi: 10.5731/pdajpst.2014.00952.
- [65] J.-M. Montenegro-Alvarado, J. Salvás, J. Weber, S. Mejías und R. Arroyo, *Pfizer Case Study Rapid Microbial Methods For Manufacturing Recovery After Hurricane María*. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/pfizer-case-study-rapid-microbial-methods-for-manufacturing-recovery-after-hurricane-mar-a-0001> (Zugriff am: 9. Juli 2022).
- [66] D. Behrens, J. Grosse Jaeger, P. Elter, C. M. Keck, J. Schaefer und F. E. Runkel, Anwendung eines Echtzeit-Keimzählers zur Überwachung des Reinraumstatus, *cleanroom & processes*, Nr. 2, 2022 (Erscheint am 30.09.22).
- [67] N. Slack, S. Chambers und R. Johnston, *Operations management*, 6. Aufl. Harlow, England, New York: Financial Times Prentice Hall, 2010.

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name. Detlef Behrens

Geburtsdatum: 25.02.1966

E-Mail: detlef.behrens@behrens-pm.de

Schule, Ausbildung, Studium und Weiterbildung

1972 – 1976	Grundschule in Hildesheim
1976 – 1982	Gymnasium in Hildesheim Abschluss nach Klasse 10: Erweiterter Sekundarabschluss I
1982 – 1985	Berufsausbildung zum Chemiefacharbeiter bei der K+S AG im Werk Bad Salzdetfurth
1985 – 1986	Fachoberschule am Oberstufenzentrum Chemie, Physik und Biologie in Berlin
1986 - 1990	Studium der Verfahrens- und Umwelttechnik an der Technischen Fachhochschule Berlin. Abschluss: Dipl. Ing. (FH) Note: Gut
1990 – 1991	Immatrikuliert an der Technischen Universität Berlin im Studiengang Energie- und Verfahrenstechnik. Ohne Abschluss
2003 - 2005	Studium zum Master of Business Administration (MBA) an der Aston University, Birmingham, UK. Abschluss: „With Distinction“ (Mit Auszeichnung)
2008	Zertifizierter Projektmanagement-Fachmann (PM-ZERT / IPMA Level D)
2012	Zertifizierter Senior-Projektmanager (PM-ZERT / IPMA Level B)

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend

Beruflicher Werdegang

- 06 / 1991 – 04 / 1996 **Henning Berlin GmbH**
Mittelständischer Hersteller von Schilddrüsen therapeutika
- Betriebsingenieur (Pharma- und Wirkstoffproduktion)
 - Technische Projektplanung und Inbetriebnahme von neuen Prozess- und Verpackungsanlagen für Tabletten und Filmtabletten
 - Fachkraft für Arbeitssicherheit
 - Immissions- und Gewässerschutzbeauftragter
- 05 / 1996 – 06 / 2001 **Lichtwer Pharma AG, Berlin**
Mittelständischer Hersteller pflanzlicher Arzneimittel
- Leitung der Pharma-Anlagenplanung im Rahmen eines Neubauprojektes in Berlin, Budget ca. € 37 Mio.
 - Technischer Projektleiter für den Bau einer Fabrik zur Extrakterstellung in Cork, Irland; Budget: € 19,0 Mio.
 - Leiter der technologischen Entwicklung
- 07 / 2001 – 07 / 2006 **Aventis Behring GmbH, Marburg**
Heute: CSL Behring, Hersteller therapeutischer Proteine aus Blutplasma
- Senior Project Manager für strategische Projekte z.B.: Plasmafraktionierung, Aseptische Abfüllung
- 08 / 2006 – 04 / 2007 **Fresenius Kabi Deutschland GmbH**
Hersteller von Infusions- und Ernährungslösungen
- Leiter der Herstellung gem. Arzneimittelgesetz für die Produktion und Verpackung von sterilen Infusionsbeuteln und -flaschen
- 05 / 2007 – 06 / 2007 **Lohmann Animal Health GmbH, Cuxhaven**
Mittelständischer Hersteller von Tierarzneimitteln
- Leiter der Herstellung für die Produktion verschiedener parenteraler und enteraler Tierarzneimittel
 - Entwicklung einer Verbesserungsstrategie zur Optimierung des GMP-Status sowie der Produktionseffizienz
- 07 / 2007 – 09 / 2011 **Novartis Behring GmbH, Marburg**
Heute: GSK, Hersteller von Humanimpfstoffen
- Standort-Projektleiter und Leiter der Inbetriebnahme und Qualifizierung für den Neubau einer Impfstofffabrik, Projektbudget ca. € 168 Mio.

Selbstständige Tätigkeiten

- 02.10.2011 **Gründung der Firma Behrens Projektmanagement**
zunächst als Einzelunternehmen
- 26.11.2013 Rechtsformänderung Behrens Projektmanagement GmbH
www.behrens-pm.de
- 10 / 2011 – 03 / 2012 **Warner Chilcott GmbH, Weiterstadt**
Hersteller von festen Darreichungsformen
- Projektleitung für das Basic Engineering einer Werkserweiterung, Projektumfang ca. € 30 Mio.
- 10 / 2011 – 03 / 2012 **Rhein Biotech GmbH / Dynavax Europe, Düsseldorf**
Hersteller von Humanimpfstoffen
- Projektleitung für das Upgrade eines aseptischen Produktionsbereichs in eine höhere Reinraumklasse, inkl. Qualifizierung
- 05 / 2012 – 10 / 2012 **Aeropharm, Rudolstadt (Sandoz-Tochtergesellschaft)**
Hersteller von inhalativen und aseptischen Darreichungsformen
- Projektleitung für die Vorbereitung einer FDA-Inspektion zur Abnahme eines Kombinationsprodukts (Inhalationsspray)
- 12 / 2012 – 09 / 2013 **Haupt-Pharma Amareg, Regensburg**
Auftragshersteller
- Consultant bei der Konstruktion, Abnahme und Qualifizierung einer Spezial-Abfüllmaschine für nasale Gelzubereitungen in Dosierspendern
- 01 / 2013 – 05 / 2013 **Pascoe GmbH, Gießen**
Hersteller von festen und flüssigen Darreichungsformen im Bereich Naturmedizin
- Leitung der Konzeptstudie und Site Master Planung für ein neues Produktionsgebäude zur Herstellung fester Darreichungsformen
- 11 / 2012 – 05 / 2013 **Rhein Biotech GmbH / Dynavax Europe, Düsseldorf**
Hersteller von Humanimpfstoffen
- Projektleitung in einem Investitionsprojekt für die Beschaffung, Installation und Qualifizierung neuer Prozessanlagen

- 06 / 2013 – 02 / 2014 **Boehringer Ingelheim**
- Projektkoordination verschiedener Änderungs- und Investitionsprojekte, z.B.: Wirbelschichtgranulator
- 03 / 2014 – 11 / 2014 **Rhein Biotech GmbH / Dynavax Europe, Düsseldorf**
Hersteller von Humanimpfstoffen
- Interim-Leitung Engineering
- 12 / 2014 – 05 / 2015 **Bayer Pharma AG, Berlin (Ehemals Schering AG)**
- Projektmanagement – Beratung und Unterstützung in einem Entwicklungsprojekt für Fertigspritzen
- 03 / 2015 – 05 / 2015 **Mucos Emulsionsgesellschaft mbH, Berlin**
- Qualifizierung (DQ, IQ, OQ, PQ inkl. GMP-Risikoanalyse) einer Trocknungsanlage für Tabletten
- 04 / 2015 – 12 / 2015 **Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt**
- Projektmanager im Bereich R&D für dermale Filler (Injektabilia) gem. ISO 13485 (Medizinprodukt)
- 05 / 2016 – 10 / 2016 **Britax Römer Kindersicherheit GmbH, Ulm**
- Gesamtverantwortlicher Projektmanager für ein Neubauprojekt (Produktion, Logistik) in Leipheim
- 11 / 2016 – 03 / 2018 **Novartis Manufacturing GmbH, Marburg**
- Projektmanager für Inbetriebnahme und Qualifizierung (C&Q) einer Biotech-Pharmaproduktion
- 09 / 2018 – 11 / 2018 **Catalent Schorndorf GmbH, Schorndorf**
- Interim-Projektmanager für die Produktentwicklung inkl. Stickpack - Verpackung fester Darreichungsformen im Kundenauftrag
- 06 / 2019 – 05 / 2021 **Ferring GmbH, Kiel**
- Projektmanager für zwei Projekte im Rahmen der Optimierung Pharmaproduktion
- Seit 01 / 2022 **Auftraggeber vertraulich**
- Grundlagenermittlung, Machbarkeitsstudie und Konzeptplanung für den Neubau einer pharmazeutischen Produktionsanlage

Lehrtätigkeiten

- Lehrauftrag am Fachbereich Pharmazie der Universität Marburg:
„Qualitätssicherung bei der Herstellung und Prüfung von Arzneimitteln“
(seit Wintersemester 2011/2012)
- Lehraufträge am Fachbereich LSE der Technischen Hochschule Mittelhessen
„Qualitätsmanagement“ (B.Sc.) und „Risiko- und Qualitätsmanagement“ (M.Sc.)
(seit Wintersemester 2015/2016)
- Lehrauftrag im Studiengang „Insect Biotechnology and Bioresources“ an der
Justus-Liebig-Universität Gießen „Quality Management“ (M.Sc.)
(seit Sommersemester 2019)

Publikationen

Behrens, D.: GMP-gerechte Herstellung von Filmcoating- und Dragiersuspensionen. *Pharma International*, Ausgabe 2/2000, Verlag Coating Thomas & Co., St. Gallen. S. 68-70.

Behrens, D.: Das Ei des MARS. *P & A*, Ausgabe 4/2011, publish-industry Verlag, München. S. 63-67.

Behrens, D. Müller, N.: Management von Investitionsprojekten in Pharmaunternehmen. *pharmind* Nr. 8. Editio Cantor Verlag 2012, Aulendorf

Behrens, D., Bruch, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Anwendung verschiedener Risikoanalysen in der Pharma-Praxis. *Pharmind* Nr. 7; Editio Cantor Verlag, Aulendorf 2020

Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Optimale Luftwechselraten in Reinräumen. *TechnoPharm* 10, Nr. 1. Editio Cantor Verlag 2020 S. 6-15

Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Teil 1. *Technopharm* 10, Nr. 5. Editio Cantor Verlag 2020, S. 284–288.

Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Teil 2. *Technopharm* 11, Nr. 2. Editio Cantor Verlag 2021, S. 94-99.

Inderthal, N., Behrens, D., Keck, C., Runkel, F., Ganashalingam, Y., Raab, C., Schesny, C., Sengupta, S.: Virusabreicherung in öffentlichen Räumen - Einsatz eines mobilen Luftreinigers zur Reduzierung der Aerosolbelastung in Innenräumen zur Verminderung des SARS-CoV-2 Infektionsrisikos. *ReinRaumTechnik* Nr. 4. Wiley 2021. S. 24-31

Behrens, D., Schäfer, J., Keck, C., Runkel, F.: Effects of different air change rates on cleanroom 'in operation' status. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Taylor and Francis 2022, S. 1–13. DOI: 10.1080/03639045.2022.2043352

Behrens, D., Schäfer, J., Keck, C., Runkel, F.: Quality assurance in aseptic cleanroom operations – airborne viable particle control with real-time biofluorescent particle counters. *Applied Sciences*. MDPI 2022, Submitted – Under Review.

Behrens, D., Große Jäger, J., Elter, P., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Anwendung eines Echtzeit-Keimzählers zur Überwachung des Reinraumstatus. *cleanroom & processes* 2/2022. Editio Cantor Verlag

10 ORIGINAL – PUBLIKATIONEN

Die im Rahmen der Dissertation erstellten Publikationen sind im Folgenden mit den Seitenzahlangaben des jeweiligen Journals in der Reihenfolge der Erstellung angehängt.

1.	Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Optimale Luftwechselraten in Reinräumen. <i>TechnoPharm</i> 10, Nr. 1. Editio Cantor Verlag 2020 S. 6-15
2.	Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Teil 1. <i>Technopharm</i> 10, Nr. 5. Editio Cantor Verlag 2020, S. 284–288.
3.	Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Teil 2. <i>Technopharm</i> 11, Nr. 2. Editio Cantor Verlag 2021, S. 94-99.
4.	Behrens, D., Schäfer, J., Keck, C., Runkel, F.: Effects of different air change rates on cleanroom ‘in operation’ status. <i>Drug Development and Industrial Pharmacy</i> . Taylor and Francis 2022, S. 1–13. DOI: 10.1080/03639045.2022.2043352
5.	Behrens, D., Schäfer, J., Keck, C., Runkel, F.: Application of biofluorescent particle counters for real-time bioburden control in aseptic cleanroom manufacturing. <i>Applied Sciences</i> . MDPI 2022. (Status 26.07.2022: Under review).
6.	Behrens, D., Große Jäger, J., Elter, P., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Anwendung eines Echtzeit-Keimzählers zur Überwachung des Reinraumstatus. <i>cleanroom & processes</i> 2/2022. Editio Cantor Verlag. (Erscheint am 30.09.2022)

Optimale Luftwechselraten in Reinräumen

Spannungsfeld zwischen Partikelanreicherung und Wirtschaftlichkeit

Detlef Behrens • Behrens Projektmanagement GmbH, Marburg

Jessica Bachhofer und Benjamin Stefan Zipp • Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen

Prof. Dr. Cornelia Keck und Dr. Jens Schäfer • Philipps-Universität Marburg, Marburg

Prof. Dr. Frank Runkel • Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen



Korrespondenz: Detlef Behrens, Behrens Projektmanagement GmbH, Hasenberg 6, 35041 Marburg; **e-mail:** info@behrens-pm.de

Zusammenfassung

Bei Planung und Betrieb von Reinräumen stellt die Luftwechselrate einen Zielkonflikt dar: Einerseits sind Mindestwerte erforderlich, um die regulatorischen Vorgaben hinsichtlich Partikel und Keimbelastung eines Raumes einzuhalten. Andererseits werden für höhere Luftwechselraten auch hohe Mengen an Energie für die Aufbereitung, Zu- und Abführung der Luftmengen benötigt. Ein häufig genannter Wert für die Luftwechselrate ist dabei 20 h^{-1} . Damit werden Anlagen oftmals mit höheren als den tatsächlich benötigten Luftwechselraten betrieben. Dieser Beitrag gibt einen Überblick über den aktuellen Stand der Anforderungen und die Theorie zur Luftwechselrate. Ein weiterer Beitrag mit Versuchsergebnissen zur Möglichkeit der Reduzierung von Luftwechselraten ist geplant.

Key Words

- Reinraum
- Luftwechselrate
- DIN EN ISO 14644
- Clean-up-Phase
- Erholzeit

1. Einleitung

Die Luftqualität in pharmazeutischen Reinräumen, insbesondere in solchen für die Herstellung steriler Arzneiformen, unterliegt in der pharmazeutischen Industrie den regulatorischen Vorgaben nationaler und internationaler Genehmigungsbehörden [1, 2, 3]. Hierfür geben die behördlichen Richtlinien genaue Grenzwerte für die Konzentration zulässiger Partikel der Größen $\geq 0,5 \mu\text{m}$ und $\geq 5 \mu\text{m}$ sowie Keime pro m^3 Luft vor. Diese Vorgaben können nur durch eine kontinuierliche Zuführung von gefilterter, partikelarmer Luft und eine Abführung partikelbelasteter Raumluft erreicht werden. Damit steht die Luftqualität in direktem Zusammenhang mit der Luftwechselrate des betreffenden Raumes, also dem Wert, wie oft pro Stunde

die komplette Raumluft rechnerisch ausgetauscht wird.

Zum Betrieb von Reinräumen werden im Vergleich zu anderen Räumen große Mengen an Energie verbraucht [4]. Pharmazeutische Reinräume haben z. T. einen 25-fach höheren Verbrauch als nicht klassifizierte Räume [5]. Der Fokus der regulatorischen Anforderungen im GxP-Umfeld liegt jedoch nicht auf einem energieeffizienten Betrieb, sondern stets auf der Patientensicherheit sowie der Produktsicherheit und dem Schutz des Personals [4, 5]. Die Notwendigkeit zur Einhaltung der Forderungen führt bei vielen Unternehmen dazu, dass die Reinräume unabhängig von der tatsächlichen Nutzung aus Sicherheitserwägungen dauerhaft mit der gleichen Luftwechselrate betrieben werden [6], was wiederum zur Folge hat, dass das Heating-Venti-

lation-Air-Conditioning(HVAC)-System 50–75 % der gesamten Energiekosten verursacht [7]. Zudem werden häufig höhere Luftwechselraten als erforderlich verwendet, was die Energiekosten weiter erhöht.

Dieser hohe Energieverbrauch resultiert zum einen aus den Luftwechselraten, die benötigt werden, um die im EU-GMP-Leitfaden geforderte Reinraum-Klassifizierung zu erreichen. Zum anderen wird viel Energie benötigt, um die Luft im Reinraum für einen engen Temperatur- und Feuchtebereich aufzubereiten [8].

Im Zuge des allgemeinen öffentlichen Interesses an der Verringerung der Treibhausgasemissionen sowie zum Thema Energieeffizienz findet diesbzgl. ein Umdenken statt. Die Auslegung der HVAC-Anlagen für einen großen Arbeitsbereich mit Maximal- und Minimalwerten im Som-

mer- und Winterbetrieb führt im Normalbetrieb oft zu einer ineffizienten Arbeitsweise, bei der die Luftmengen überdimensioniert und die Toleranzbereiche für Temperatur und Feuchte zu eng ausfallen [8].

Der Grund dafür ist häufig eine falsche Interpretation der vorgegebenen normativen Dokumente, die z. T. zu allgemein gehalten sind und nicht die spezifische Ausstattung der Reinnräume sowie die Prozessbedingungen widerspiegeln [9]. Die Betreiber wissen z. T. nicht, welche Luftwechselraten für ihren spezifischen Reinnraum optimal sind und orientieren sich an der These, dass höhere Luftwechselraten stets besser sind – auch wenn dies auf keiner wissenschaftlichen Basis begründet ist [7].

Regelungstechnische Schwierigkeiten führen außerdem dazu, dass eine mögliche Nacht- oder Wochenendabsenkung in Zeiten ruhender Produktion aufgrund der Gefahr potenzieller Kreuzkontamination durch Umkehr der Druckkaskade während der Ab- und Anfahrphase unterlassen wird.

Um die Energiekosten zu senken, sollte demzufolge ein Hauptaugenmerk auf der Reduzierung der Luftwechselraten liegen [9]. Darüber hinaus haben natürlich auch Umgebungsvariablen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit einen großen Einfluss auf die Energiekosten.

Zu hohe Luftwechselraten wirken sich jedoch nicht nur negativ auf die Energiekosten aus, sondern können auch zur Verwirbelung der luftgetragenen Partikel beitragen und somit eine Abreicherung dieser Partikel erschweren [10]. Letztere kann auch einen Einfluss auf den mikrobiologischen Status des Reinnraumes haben, da Keime an den luftgetragenen Partikeln haften können.

Die hohen Luftwechselraten werden meist durch Drallausslässe erreicht, die eine gute Durchmischung der Raumluft generieren. Drallausslässe sind jedoch nicht immer von Vorteil, da sie ebenfalls zur Verwir-

belung der Luft im Raum beitragen [10].

Für Luftwechselraten bestehen in der Literatur Empfehlungen, die in der Praxis bei Auslegung und Betrieb von Anlagen umgesetzt und von Behörden mindestens indirekt erwartet werden [4]. Ein dabei oft genannter Wert ist ein mindestens 20-facher Luftwechsel pro Stunde, um die entstehenden Partikel abzureichern und damit die angestrebte Reinnraumklasse zu erreichen. Eine wissenschaftliche Grundlage ist für diesen Wert jedoch bisher nicht gegeben! Auch deutlich höhere Werte als 20 h^{-1} sind in Abhängigkeit von der geforderten Reinnraumklasse in der Industrie anzutreffen. Angesichts des hohen Energiebedarfs für die Luftaufbereitung muss eine solche pauschale Vorgabe kritisch hinterfragt werden.

Verschiedene Studien bzgl. der Luftwechselraten in Reinnräumen haben ergeben, dass eine akzeptable Kontaminationskontrolle bereits mit niedrigeren Luftwechselraten erreicht werden kann [7].

Betrachtet man den Ursprung der Forderung nach einem Luftwechsel von mindestens 20 h^{-1} , wird deutlich, dass diese Vorgabe nicht unter Berücksichtigung von Energieverbrauch- und -kosten festgelegt wurde. Vielmehr galt über lange Zeit hinweg die Devise „Viel hilft viel“, was in Bezug auf das Ziel der Partikelabreicherung auch scheinbar richtig ist. Inzwischen ist zwar insbesondere im Geltungsbereich der EU-Guidelines [2] ein Umdenken erfolgt und die Forderung nach 20 h^{-1} nicht mehr direkt gegeben. Dennoch werden die meisten HVAC-Anlagen weiterhin nach diesen Parametern ausgelegt und betrieben. Bei diesen Auslegungen wird implizit davon ausgegangen, dass mit der Partikelabreicherung auch die Belastung des Raumes mit Luftkeimen linear sinkt.

Keime in der Raumluft haften nahezu ausschließlich an Partikeln. Die Partikel wiederum haben eine Größe im Bereich von $5 \mu\text{m}$. Der

größte Keimemittent ist dabei in den meisten Fällen der Mensch, also das Betriebspersonal im Reinnraum. Da Keime naturgemäß eine besondere Gefahr für die aseptische und ggf. biopharmazeutische Prozessführung darstellen, müssen auch deren Abgabe weitestgehend verhindert sowie die effiziente Abführung der Keime sichergestellt werden.

Der Luftwechsel (Zuluft- und Raumluftwechsel) stellt innerhalb der Qualifizierung eines Reinnraumes einen wichtigen Parameter dar. Unerwünschte Kontaminationen werden z. B. je nach Luftwechsel unterschiedlich schnell ausgetragen, was sich auf die Erholzeit des Raumes auswirkt. Bei der Festlegung der Luftwechselraten in der Design-Phase werden Erfahrungswerte aus der Praxis berücksichtigt. Die festgelegten Luftwechselraten müssen dann innerhalb der Operation Qualification (OQ) nachgewiesen werden. Hierbei werden alle Einzelzuluftvolumenströme pro Raum separat bestimmt und anschließend durch das jeweilige Raumvolumen geteilt [11]. Ein weiterer wichtiger Punkt innerhalb der Qualifizierung ist die Bestimmung der Erholzeit des Reinnraumes. Um diese zu messen, wird der Raum mit Aerosol beaufschlagt und die Zeit gemessen, die die Lüftungsanlage benötigt, um den Raum auf 1 % der Ausgangskonzentration zu bringen.

2. Regulatorische Vorgaben, Normen und Guidelines

Die Anforderung an die Bereitstellung geeigneter Räume für die Herstellung von Arzneimitteln wird im Arzneimittelgesetz [1] gefordert und insbesondere im Annex 1 der EU-Guideline zur Herstellung steriler Arzneiformen, definiert [2]. Die US-Amerikanische Food and Drug Administration (FDA) hat ebenfalls Anforderungen definiert, die ähnlich, aber nicht immer identisch sind. Beide Richtlinien referenzieren jedoch die DIN EN ISO 14644 „Rein-

Tabelle 1

Klassifizierung der Luftreinheit [3]; modifiziert.

Klassifizierung der Luftreinheit ^a				
Reinraumklassifizierung 0,5 µm Partikel/ft ³	ISO- Bezeichnung ^b	0,5 µm Parti- kel/m ³	Grenze für mikrobiolo- gische Luft- kontamination ^c (KBE/m ³)	Grenze für mikrobiologische Kontamination auf Sedimen- tationsplatten ^{c,d} (Durchmes- ser 90 mm; KBE/4 h)
100	5	3 520	1 ^e	1 ^e
1 000	6	35 200	7	3
10 000	7	352 000	10	5
100 000	8	3 520 000	100	50

- a Alle Klassifizierungen basierend auf Daten, die in der Nähe des exponierten Materials/Artikels während der Dauer der Fertigung gemessen wurden.
- b Bezeichnungen gemäß DIN EN ISO 14644-1 ermöglichen einheitliche Werte für Partikelkonzentrationen für Reinräume in verschiedenen Industrien. Eine ISO-5-Partikelkonzentration ist gleich der Klasse 100 und ungefähr gleich der EU-Klasse A.
- c Die Werte repräsentieren die empfohlenen Grenzwerte der Umweltqualität. Alternative Grenzwerte können basierend auf dem Prozess oder der Analyseverfahren definiert werden.
- d Die zusätzliche Verwendung von Sedimentationsplatten ist optional.
- e Proben der Klasse-100(ISO-5)-Umgebungen sollten im Normalfall keine mikrobiologische Kontamination aufweisen.

räume und zugehörige Reinraumbereiche“, die seit 2015 den Industriestandard für Reinräume in allen Branchen darstellt [12].

Die DIN EN ISO 14644-1 [12] definiert einen Reinraum bzw. einen reinen Bereich als einen „Raum, in dem die Anzahlkonzentration luftgetragener Partikel geregelt und klassifiziert wird und der zur Regelung der Einschleppung, Entstehung und Ablagerung von Partikeln im Raum entsprechend konstruktiv geplant, baulich ausgeführt und betrieben wird“ (DIN EN ISO 14644-1, 3.1.1) [12]. Eine Zusammenstellung der für die aseptische Herstellung von Arzneimitteln relevanten Reinheitsklassen zeigt Tab. 1.

Die DIN-EN-ISO-Normen 14644 [12] und 14698 [13] bilden den Stand der Technik ab, besitzen jedoch keinen eigenständigen Rechtscharakter – wobei ein Verstoß gegen diese trotzdem regulatorische Folgen haben kann. Erfüllt ein Hersteller die Anforderungen nicht, kann dies bei behördlichen Inspektionen als schwerwiegender oder sogar kritischer Mangel bewertet werden. Dies kann bis hin zur Versagung der

Herstellungserlaubnis führen, da die Anforderung des §14.6 AMG [1] über den Nachweis des Vorhandenseins geeigneter Räume nicht gegeben ist.

Die DIN EN ISO 14644 mit ihren Teilen 1–14 behandelt die Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche [12].

Die DIN EN ISO 14698 behandelt Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche speziell in Hinblick auf Biokontaminationskontrolle [13].

Ergänzend dazu dient die VDI-Richtlinie 2083 „Reinraumtechnik“ als technisches Regelwerk für Anforderungen an Reinräume [14].

Das Pendant zum deutschen VDI stellt das Institute of Environmental Sciences and Technology (IEST) mit seinen Ausarbeitungen zur reinraumtechnischen „Recommended Practices“ dar. Die FDA stützt sich in ihren Gesetzgebungen weitestgehend auf die Ausarbeitungen der IEST. Auch die „Recommended Practices“ der IEST stützen sich auf die aktuelle Fassung der DIN-EN-ISO-Norm 14644 bzw. DIN EN ISO 14698 und erweitern bzw. ergänzen diese [11].

Im gültigen EU-GMP-Annex 1 [2] ist im Reinraum das Monitoring von 0,5 und 5 µm großen Partikeln gefordert. Zur Durchführung der Messung wird dort auf das technische Dokument DIN EN ISO 14644, Blatt 1 verwiesen. Aus diesem wurde aber inzwischen die Grenze für 5-µm-Partikel für die Klasse ISO 5 (ISO 4.8) gestrichen. Daher wird in der Industrie derzeit mit Spannung erwartet, ob im in Revision befindlichen Annex 1 zukünftig auch die Betrachtung der 5-µm-Partikel beim Nachweis der Reinraumklasse entfallen wird. Innerhalb der Pharmaindustrie sind die Meinungen hierzu unterschiedlich. Zum einen laufen die Trends für 0,5 und 5 µm große Partikel i. d. R. parallel. Zum anderen zeigen die 5-µm-Partikel es aber noch deutlicher an, wenn es im Reinraum bzw. in der Raumluft Probleme gibt [15].

3. Theorie der Luftwechselrate

3.1 Luftwechsel

Das Wort Luftwechsel wird in diesem Zusammenhang gleichbedeutend mit dem Begriff Luftwechsel-

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / For use with permission of the publisher

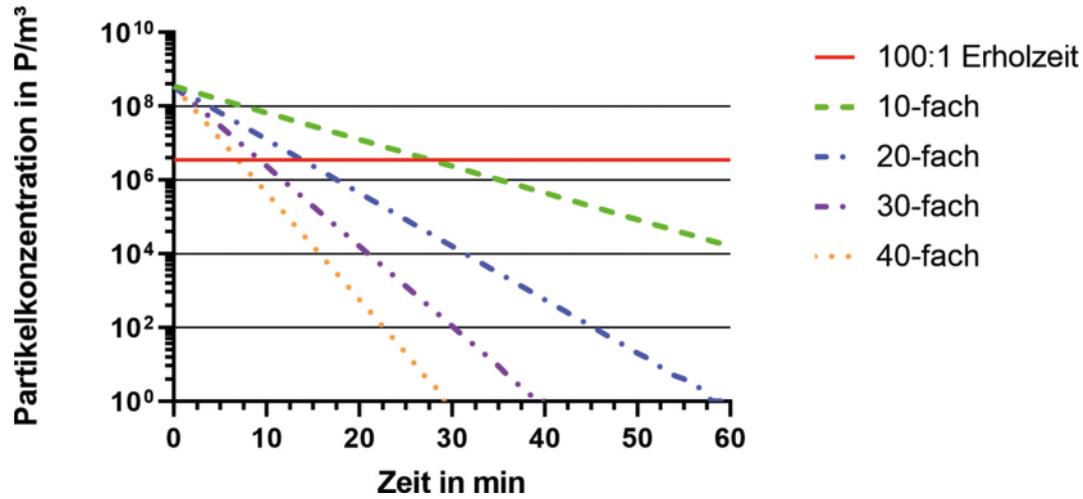


Abbildung 1: Theoretische Partikelabreicherung (logarithmisch) bei verschiedenen Luftwechselraten (40-, 30-, 20-, 10-fach) (Quelle: die Autoren).

zahl bzw. Luftwechselrate bzw. im Englischen mit dem Begriff Air Change Rate (ACR) verwendet. In der DIN EN ISO 14644-3:2005 (D) [16] ist die Luftwechselzahl wie folgt definiert:

„Rate des Luftaustauschs, beschrieben durch die Anzahl der Luftwechsel je Zeiteinheit und berechnet durch Division des je Zeiteinheit zugeführten Luftvolumenstroms durch das Volumen des Raums“ [16]. Die Luftwechselzahl gibt also an, wie oft in einer Zeiteinheit (i. d. R. pro Stunde) die Luft in einem Raum ausgetauscht wird.“

Dieser Definition folgend ergibt sich die Luftwechselrate nach der Gleichung:

$$N = \frac{v \cdot A}{V} = \frac{\dot{V}}{V}$$

N: Luftwechselzahl bzw. Luftwechselrate (h⁻¹)

v: Strömungsgeschwindigkeit (m/h)

A: Filterfläche (m²)

V: Rauminhalt (m³)

\dot{V} : Luftvolumenstrom (m³/h)

Abbildung 1 zeigt die logarithmische Auftragung der theoretischen Partikelabreicherung bei verschiedenen Luftwechselraten (40-, 30-, 20-, 10-fach). Die Partikelkonzentration bei t=0 beträgt 352 000 000 Partikel/ft³, was der 100-fachen Konzentra-

tion der maximal zulässigen Partikelkonzentration eines Reinraumes der Klasse C („in operation“) entspricht. Die Abreicherung der Partikel verläuft linear (bei einer logarithmischen Skalierung der Y-Achse) und nähert sich einem Wert, der gegen Null geht. Die Erholzeit ist erreicht, sobald die Partikelkonzentration unterhalb einer Partikelkonzentration von 3 520 000 Partikel/m³ sinkt, was der maximal zulässigen Partikelkonzentration eines Reinraumes der Klasse C („in operation“) entspricht. Zur Berechnung der theoretischen Partikelabreicherung wurden folgende Faktoren berücksichtigt:

- Partikelgröße: ≥0,5 µm
- Reinraumklasse C „in operation“ (3 520 000 Partikel/m³)
- Reinraumklasse C „at rest“ (352 000 Partikel/m³)
- Luftwechselraten N in h⁻¹: 10, 20, 30, 40

Welche genaue Luftwechselrate zum Erreichen einer gewissen Reinheitsklasse mit einem nicht-unidirektionalem Luftstrom benötigt wird, kann nicht pauschal gesagt werden, da dies von vielen Faktoren abhängt.

Verschiedene Richtlinien haben in der Vergangenheit versucht, Richtwerte festzulegen: In den 1950ern wurde im Standard für klinische Operationssäle eine Luft-

wechselrate von 12 h⁻¹ für bestehende Räume festgelegt; neue Räume sollten mit 25 Luftwechseln pro Stunde betrieben werden [4]. Eine frühe Version des Federal Standards legte im Jahr 1960 Luftwechselraten von 20 h⁻¹ für Reinräume fest, welche 1987 vom Aseptic Guide der FDA übernommen wurden. Im Federal Standard 209D von 1988 wurde die Forderung von 20 Luftwechseln pro Stunde für die Reinraumklasse 100 000 widerrufen, während der Aseptic Guide der FDA im Jahr 2004 weiterhin an 20 Luftwechseln pro Stunde festhielt [4].

Auch heute gibt es keine allgemein gültige Festlegung bzgl. der idealen Luftwechselrate. Die aktuelle Version des Aseptic Guides der FDA empfiehlt für die Klasse 100 000 (ISO 8) weiterhin mindestens 20 Luftwechsel in der Stunde [3], während die EU in ihrem GMP-Leitfaden keine genauen Vorgaben bzgl. der Luftwechselrate gibt. Sie beschreibt lediglich, dass der Betriebszustand „at rest“ nach einer kurzen Clean-up-Phase von 15–20 Minuten (Richtwert) erreicht werden soll [2]. Das IEST empfiehlt in seiner Recommended Practice PR-CC-012.3, 2015 verschiedene Werte für Reinräume im Betriebszustand. Für ISO-Klasse 8 sollen 2–20 Luftwechsel pro Stunde ausreichend sein, während für ISO-Klasse 7 Luftwechselraten

Tabelle 2

Vergleich der empfohlenen Luftwechselraten unterschiedlicher Richtlinien [4]; modifiziert.

Richtlinie	Empfohlene Luftwechselrate (1 h ⁻¹)			
	Sterile Produkte			Nichtsterile Produkte
	Aseptischer Prozess		Terminale Sterilisation	
Vor Sterilfiltration	Nach Sterilfiltration			
FDA Aseptic Guide	20	20	-	-
EU GMP	-	-	-	-
ISPE	20	20	20	-
WHO	-	6 - 20	-	-

von 20–200 vorgesehen sind [4]. Die International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE) empfiehlt 20 Luftwechsel pro Stunde – unabhängig davon, ob der Prozess aseptisch betrieben werden muss oder eine terminale Sterilisation erfolgt [4, 17]. In der US-Pharmacopeia sind ebenfalls empfohlene Luftwechselraten aufgeführt, diese liegen zwischen 20 h⁻¹ (ISO 8) und 100 h⁻¹ (ISO 5) [4].

Die empfohlenen Luftwechselraten listet Tab. 2 auf.

In der vorläufigen Version des Annex 1 (Draft) wird vorgeschrieben, dass der „at rest“-Status nach einer Clean-up-Phase erreicht werden sollte, diese Phase jedoch vom Betreiber selbst während der ersten Klassifizierung des Raumes festgelegt werden sollte (Annex 1 Draft, 5.26 e).

3.2 Bestimmung der Luftwechselrate

Zur Bestimmung der benötigten Luftwechselrate können 3 verschiedene Methoden verwendet werden, welche nachfolgend beschrieben werden.

Nicht-analytischer Ansatz

Beim nicht-analytischen Ansatz zur Bestimmung der Luftwechselrate wird eine „Daumenregel“ angewendet. Die Luftwechselrate wird dabei anhand verschiedener Vorgaben und Empfehlungen z. B. aus der Lite-

ratur festgelegt. Die Werte können dabei für den jeweiligen Anwendungsfall deutlich zu groß bzw. zu klein ausfallen [4].

Analytischer Ansatz

Der analytische Ansatz basiert auf der Verwendung von mathematischen Modellen, welche die verschiedenen Zustände eines Reinraumes beschreiben, um die benötigte Luftwechselrate für eine vorgegebene Reinheitsklasse zu bestimmen [18].

In einem Reinraum, welcher sich im „at rest“-Betriebszustand befindet, werden keine Operationen ausgeführt und es ist kein Personal anwesend. Folglich werden keine Partikel freigesetzt. In diesem Zustand beträgt die Partikelkonzentration nahezu null.

Betritt nun das Personal den Reinraum (Abb. 2), welcher sich vorher im „at rest“-Betriebszustand befunden hat, so steigt umgehend die Partikelkonzentration; es kommt zu einem „build-up“ partikulärer Verunreinigung. Durch das HVAC-System werden zeitgleich generierte partikuläre Kontaminationen ausgelesen, sodass sich ein Zustand einstellt, in welcher sich die Generierung und Abreicherung von Kontaminationen die Waage halten. Diese Phase kann auch als „steady-state“ bezeichnet werden [18].

Wenn das Personal den Raum verlässt und der Prozess beendet ist,

erfolgt keine weitere Freisetzung von Partikeln. Demzufolge verringert sich die Konzentration luftgetragener Partikel. Diese Clean-up-Phase soll, wie bereits oben erwähnt, maximal 20 Minuten dauern (Richtwert der EU-GMP-Guideline) [3, 18].

Durch diesen Ansatz können also unterschiedliche Luftwechselraten für die Zustände „at rest“ (z. B. 5 h⁻¹) und „in operation“ (z. B. 18 h⁻¹) für einen spezifischen Reinraum ermittelt und festgelegt werden.

Flexibler Ansatz

Im flexiblen Ansatz vertraut man auf das Sammeln genauerer Daten im Verlauf der Projektphasen zur Auslegung des HVAC-Systems und entsprechender Anpassung des Systems an neue Erkenntnisse im Projektverlauf. Dabei werden in der Planungsphase zunächst die Partikelgenerierung abgeschätzt und daran die voraussichtliche Luftwechselrate bestimmt. In der Testphase kann die Luftwechselrate bei Bedarf angepasst werden. Die Testphase sollte unter realen Prozessbedingungen durchgeführt werden. Eine weitere Anpassung der Luftwechselrate kann auch während der Betriebsphase vorgenommen werden, wenn z. B. das Ergebnis des kontinuierlichen Partikelmonitorings Grund zur Reduktion gibt [4]. Auch hier ist also das Ziel, die mindestens erforderliche Luftwechselrate zu ermitteln

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / For use with permission of the publisher



Abbildung 2: Personal im Reinraum der ISO-Klasse 8 (Quelle: GSK).

geringerer Leistungsaufnahme betreiben zu können.

3.3 Unterschied zwischen Erholzeitmessung und Clean-up-Phase

Der Annex 1 des EU-GMP-Leitfadens beschreibt eine Clean-up-Phase, während in der DIN EN ISO 14644-3 der Begriff der Erholzeit verwendet wird. Beide Begriffe werden häufig für das gleiche Verfahren verwendet, sind tatsächlich aber unterschiedlich zu verstehen [19].

Der Annex 1 des EU-GMP-Leitfadens fordert unter Punkt 14, dass der Zustand des Leerlaufs nach einer kurzen Clean-up-Phase von 15 bis 20 Minuten erreicht wird, nachdem der Zustand „in operation“ beendet wurde. Dazu muss das Personal nach Beendigung des Fertigungs-Betriebszustands den Raum verlassen. Die Clean-up-Phase entspricht in der Reinheitsklasse B einer 100:1-Verdünnung bzw. für Räume der Klasse C und D einer 10:1-Verdünnung der Partikelkonzentration. Dabei wird kein Hinweis auf die zu messende Partikelgröße gegeben [2].

Die DIN EN ISO 14644-3 empfiehlt die Prüfung der Erholzeit eines Raums anhand zweier Methoden, welche jedoch nur für Räume mit turbulenter Verdünnungsströmung angewandt werden sollten. Dabei

sollten sich die Räume im „at rest“-Betriebszustand befinden [16]:

- 100:1-Erholzeit
- Reinheitserholungsrate

Bei der 100:1-Erholzeit wird der Reinraum mit einem Aerosol beaufschlagt und die Partikelkonzentration mittels eines Partikelzählers gemessen. Zu Beginn muss die Partikelkonzentration mindestens um den Faktor 100 über dem Ziel-Reinheitsniveau liegen. Die Zeit, welche benötigt wird, um die Anfangspartikelkonzentration um den Faktor 100 zu verringern, wird als 100:1-Erholzeit bezeichnet [16].

Die Berechnung der Reinheitserholungsrate erfolgt durch Auftragen der Abklingkurve der Partikelkonzentration in einem rechtwinkligen Koordinatensystem. Dabei ist die Steigung der Kurve die Reinheitserholungsrate. Für 2 aufeinanderfolgende Messungen soll nachfolgende Gleichung verwendet werden [16]:

$$n = 2,3 \cdot \frac{1}{t_1} \log_{10} \left(\frac{c_1}{c_0} \right) \quad (1)$$

n : Reinheitserholungsrate (h^{-1})

t_1 : Zeit, die zwischen der ersten und zweiten Messung verstrichen ist (h)

c_0 : Anfangskonzentration (Partikel/ m^3)

c_1 : Konzentration nach der Zeit t_1 (Partikel/ m^3)

Die Clean-up-Phase beschreibt im Wesentlichen die Zeit, welche zum Erreichen des „at rest“-Betriebszustands nach vorheriger „in operation“-Phase benötigt wird. Die Erholzeit ist wiederum ein Verfahren, welches zur Ermittlung der Zeitspanne angewandt wird, in welcher eine 100-fache Verdünnung der Ausgangskonzentration erreicht wird [19].

4. Fazit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass:

- Luftwechselraten in der industriellen Praxis häufig höher sind, als tatsächlich zur Einhaltung der wesentlichen Reinraumkriterien Partikel- und Keimzahlen nötig wären.
- der historische Wert einer Luftwechselrate von 20 h^{-1} in Richtlinien noch immer auftaucht, obwohl eine wissenschaftliche Grundlage dafür nicht gegeben ist.
- für nicht-sterile Produkte keine Forderungen an die Luftwechselrate des Produktionsraumes gestellt werden.

In Reinräumen herrscht demnach großes Potenzial, Energiekosten einzusparen. Häufig werden die Räume hinsichtlich der benötigten Luftwechselraten zur Erhaltung bzw. Erreichung einer Reinheitsklasse zu hoch eingestellt. Molenaar [20] untersuchte in Reinräumen das Einsparpotenzial unter Anwendung dreier Faktoren: genauere Abstimmung der raumlufttechnischen Anlage, bedarfsgesteuerte Ventilation und Optimierung des Strömungsverhaltens. Die bedarfsgesteuerte Ventilation könnte mit bis zu 93 % Energiekosteneinsparung den größten Beitrag leisten. Dabei würde die HVAC-Anlage die Luftwechselrate nach Erreichen des „at rest“-Zustands – also ohne anwesendes Personal und laufende Prozesse – deutlich reduzieren, da keine Partikelgeneration stattfindet. Dies sei in

Reinräumen besonders effektiv, die oft nicht besetzt seien [20].

Es ist geplant, in einem weiteren Beitrag die Ergebnisse von Versuchsreihen in einem variabel einstellbaren Reinraum zu publizieren. Darin wird anhand umfangreicher Messungen gezeigt, dass die Einhaltung regulatorischer Grenzwerte mit signifikant niedrigeren Luftwechselraten nicht nur theoretisch möglich ist.

Literaturverzeichnis

- [1] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz, AMG) https://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/BjNR024480976.html, zuletzt aufgerufen am 04.12.2019.
- [2] European Commission: EudraLex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products. 2009.
- [3] US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice. 2004.
- [4] Fedotov, A., Air change rate for cleanrooms with non-unidirectional airflow. Clean Air and Containment Review 2016, 26; 12–20.
- [5] Fedotov, A., Saving energy in cleanrooms. Cleanroom Technol., vol. 22, no. 8, pp. 14–18, 2014.
- [6] Faulkner, D., Fisk, W., Walton, J., Energy savings in cleanrooms from demand-controlled filtration. Journal of the IES 1996, 39, 21–27.
- [7] Tschudi, W., Benschine, K., Fok, S., Rumsey P., Cleanroom Energy Benchmarking in High-Tech and Biotech Industries. ACEEE 2001.
- [8] J. Feddern, Innovative Lösungen für bessere Energieeffizienz in Reinräumen. contamination control report 2009, 4–9.
- [9] Fedotov, A., Energy saving in Cleanrooms. 45th R3Nordic Symposium. Cleanroom Technology, Contamination Control and Cleaning 2014, 23–30.
- [10] Flechl, H., Röcker, R., Schicht, H., Raumlufttechnik im pharmazeutischen Herstellungsbetrieb: GMP-konforme Gestaltung der Lüftungstechnik für die Arzneimittelherstellung, 1st edn., Maas & Peither, GMP Verlag, Schopfheim, 2017.
- [11] Gail, L., Gommel, U.: Reinraumtechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2018.
- [12] DIN EN ISO 14644-1:2016-06. Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche – Teil 1: Klassifizierung der Luftreinheit anhand der Partikelkonzentration.
- [13] DIN EN ISO 14698-1:2003. Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche – Biokontaminationskontrolle Teil 1: Allgemeine Grundlagen.
- [14] VDI 2083 Reinraumtechnik.
- [15] <https://www.gmp-navigator.com/gmp-news/der-neue-annex-1-und-die-5-um-partikel>, zuletzt aufgerufen am 04.12.2019.
- [16] EN ISO 14644-3:2005 (D). Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche – Teil 3: Prüfverfahren.
- [17] ISPE: Heating, ventilation, and air conditioning (HVAC). ISPE good practice guide. Tampa, Fla.: ISPE Headquarters 2009.
- [18] Whyte, W., Whyte, W.M. u. Eaton, T.: The application of the ventilation equations to cleanrooms part 1: The equations. Clean Air and Containment Review (2012) Issue 12.
- [19] Flechl, H.: Raumlufttechnik. http://www.gmp-berater.de/showdoc/GMP-BERATER/GMP-Praxiswissen/3-Raum-lume/3I-Raumlufttechnik?docId=docs/03i.html&alias=GMPPract_3_I_End_Ali&activeToolbarTab=document&startSite=false&f&l=false&event=navigation&from=tree, zuletzt aufgerufen am 04.12.2019.
- [20] Molenaar, P.C.A.: Ventilation efficiency improvement in pharmaceutical cleanrooms for energy demand reduction, Eindhoven University of Technology. Eindhoven 2017.

Chefredakteur: Claudius Arndt, Leitender Redakteur: Jens Renke. Verlag: ECV · Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Baendelstockweg 20, 88326 Aulendorf (Germany). Tel.: +49 (0) 7525-940 120. E-Mail: redaktion-tp@ecv.de. www.ecv.de. Herstellung: rdz GmbH. Alle Rechte vorbehalten.

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / For use with permission of the publisher

Kalibrierung,
Qualifizierung,
Validierung &
GxP-Services

Testo Industrial Services GmbH
gmp@testotis.de · Fon 07661 90901-8000

www.testotis.de



Be sure. **testo**

Mehr Service, mehr Sicherheit.
Full-Service für Ihre GMP Compliance
und Ihre Reinräume.

20
Testo Industrial Services
1999-2019

Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate

Teil 1

Detlef Behrens • Behrens Projektmanagement GmbH, Marburg
Jessica Bachhofer und Benjamin Stefan Zipp • Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen
Prof. Dr. Cornelia Keck und Dr. Jens Schäfer • Philipps-Universität, Marburg
Prof. Dr. Frank Runkel • Technische Hochschule Mittelhessen und Justus-Liebig-Universität, Gießen



Korrespondenz: Detlef Behrens, Behrens Projektmanagement GmbH, Hasenberg 6, 35041 Marburg; **e-mail:** info@behrens-pm.de

Zusammenfassung

Im gültigen Annex 1 des Good-Manufacturing-Practice(GMP)-Leitfadens sind Vorgaben für die maximal erlaubte Partikelzahl im Reinraum sowie eine Empfehlung für die „clean-up“-Zeit zwischen den Status „in operation“ und „at rest“ gegeben. Jedoch existiert keine Vorgabe für die Luftwechselrate. Hierfür wird in der Industrie für die Reinraumklasse C häufig ein Wert von mindestens 20 h^{-1} verwendet. Dieser Wert ist jedoch in vielen Fällen höher als erforderlich, wodurch Energieeinsparpotenziale nicht genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die zulässigen Grenzwerte und die empfohlene „clean-up“-Zeit bereits mit deutlich geringeren Luftwechselraten bis herunter auf 10 h^{-1} erreicht werden können.

1. Einleitung

Im gültigen Annex 1 des Good-Manufacturing-Practice(GMP)-Leitfadens der EU sind für die Partikelanzahl in einem Raum der Klasse C die Grenzwerte in Tab.1 vorgegeben [1].

Darüber hinaus wird im Annex 1 eine „clean-up“-Zeit vom „in-operation“- zum „at-rest“-Status von 15–20 Min. empfohlen [1]. Diese Vorgaben wurden auch im vorliegenden Entwurf der Annex-1-Revision [2] inhaltlich nicht geändert, aber präzisiert. Die überarbeitete Formulierung lautet:

„The particulate limits given in table 1 above for the “at rest” state

should be achieved after a “clean up” period on completion of operations. The “clean up” period should be determined during the classification of the rooms (guidance value of 15 to 20 minutes)” (EU GMP Annex 1 Revision: Manufacture of Sterile Medicinal Products (Draft), 4.31 iii [2]).

In einer früheren Arbeit der Autoren wurden weitere Anforderungen aus verschiedenen Regularien beschrieben und diskutiert [3]. In diesen Regularien werden für die erforderliche Belüftung von Reinräumen z. T. auch Anforderungen oder Empfehlungen für die erforderliche Luftwechselrate beschrieben, die für Reinräume der Klasse C oft 20 h^{-1}

Key Words

- Reinraum
- Luftwechselrate
- DIN EN ISO 14644
- Annex 1
- „Clean-up“-Zeit
- Erholzeit

beträgt, wobei eine wissenschaftliche Grundlage für diesen Wert bislang nicht vorliegt [3].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche „clean-up“-Zeiten bei verschiedenen Luftwechselraten zu erwarten sind. Dadurch sollten auch mögliche Einsparpotenziale im Energieverbrauch aufgezeigt werden.

Zu diesem Zweck wurden 2 Versuchsreihen in einem Reinraum der Klasse C durchgeführt: Bei der ersten Versuchsreihe lag der Fokus auf dem Verhalten der $0,5\text{-}\mu\text{m}$ -Partikel, die zweite Versuchsreihe betrachtete die $5\text{-}\mu\text{m}$ -Partikel. Letztere sind deshalb besonders interessant, da Keime nahezu ausschließlich an

Tabelle 1

Maximal erlaubte Anzahl an Partikel pro m³ (gleich oder größer als die angegebene Größe) für Reinraumklasse C [1], modifiziert.

	Leerlauf („at rest“)		Fertigung („in operation“)	
Klasse	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000

Tabelle 2

Theoretische „clean-up“-Zeiten und „100:1-Erholzeiten“ mit Einfluss der Sedimentation von Partikeln, berechnet nach [5].

Luftwechselrate [h ⁻¹]	Theoretische Erholzeiten (min)			
	„clean-up“-Zeit (10:1)		„100:1-Erholzeit“	
	<0,5 µm	5 µm	<0,5 µm	5 µm
10	14	10	28	20
20	7	6	14	12
30	5	5	10	9

Partikeln haften und diese aufgrund ihrer Größe zu den Makropartikeln >5 µm zählen.

Weiterhin wurde in beiden Versuchsreihen der Einfluss von Drallaussäßen auf die Abreicherung von Partikeln untersucht.

1.1 Definition „100:1-Erholzeit“ und „clean-up“-Zeit

Die Messung der Partikelabreicherung als „100:1-Erholzeitmessung“ wird in DIN EN ISO 14644-3 beschrieben [4]. Dabei muss zu Beginn die Partikelkonzentration mindestens um den Faktor 100 über dem Ziel-Reinheitsniveau liegen. In welchem Bereich das Ziel-Reinheitsniveau liegt, gibt die Norm nicht vor, da dies vom jeweiligen Anwendungsfall abhängt. Für den Geltungsbereich des Annex I ist dafür der Partikelgrenzwert für den „at-rest“-Status ein sinnvoller Zielwert. Die Zeit, welche benötigt wird, um die Anfangspartikelkonzentration um den Faktor 100 zu verringern,

wird als „100:1-Erholzeit“ bezeichnet [4].

In diesem Faktor liegt der Unterschied zwischen der „100:1-Erholzeit“ und der „clean-up“-Zeit für die Reinraumklasse C. Zwischen den Status „at rest“ und „in operation“ ist im Annex I nur der Faktor 10 gegeben. Die Erwartung der Inspektionsbehörden gemäß Annex I für die Klasse C ist also eine 10:1-Erholzeit, entsprechend einer Abreicherung der Partikelzahl um den Faktor 10 innerhalb von 15–20 Min.

Die Auswertung der Ergebnisse in dieser Arbeit fokussiert sich deshalb auf die regulatorisch geforderte „clean-up“-Zeit.

2. Theoretische Partikelabreicherung bei verschiedenen Luftwechselraten

Die theoretisch zu erwartende Abreicherungszeit kann für die jeweilige Luftwechselrate rechnerisch er-

mittelt werden [5]. Dabei kann für Partikel <0,5 µm der Einfluss der Sedimentation vernachlässigt werden, bei größeren Partikeln ist jedoch auch die Abreicherung von Partikeln durch Sedimentation zu berücksichtigen.

Tabelle 2 zeigt die theoretischen 10:1-„clean-up“-Zeiten und die „100:1-Erholzeiten“ in Minuten für Partikel verschiedener Größen in Abhängigkeit der Luftwechselrate.

Bei der Abreicherung von Makropartikeln von 5 µm übt neben der eigentlichen Luftwechselrate des Reinraums auch die Ablagerung dieser Partikel auf Oberflächen einen Einfluss auf die theoretische Partikelabreicherung und die Erholzeit des Raumes aus. Weiterhin ist zu erkennen, dass mit einer geringeren Luftwechselrate der Einfluss durch Sedimentation steigt, weil die Erholzeit kürzer ist als theoretisch berechnet.

3. Durchführung

3.1 Raum und Equipment

Der Versuchsraum entspricht in Bezug auf Ausstattung und Gestaltung von Wänden, Decken und Fußboden den Anforderungen an einen Reinraum der Klasse C. Der Raum hat eine Fläche von 38,4 m² bei einem Volumen von 99,84 m³. Vorgelagert ist eine Schleuse mit einer Größe von 11,8 m². Die Differenzdrücke von Versuchsraum zu Schleuse und Schleuse zu Außenbereich betragen zum Versuchszeitpunkt jeweils 15 Pa.

Die Luftwechselrate kann für den Versuchsraum variabel zwischen 10 h⁻¹ und 70 h⁻¹ eingestellt werden.

In Abb. 1 ist der Versuchsraum dargestellt. Die Einrichtungen darin sind:

1. Zuluftöffnungen mit endständigem H14-Filter, wahlweise mit/ohne aufgesetztem Drallaussäßen
2. Bodennahe Absaugöffnungen
3. Reinraumwerkbank
4. Versuchsanlage mit Pharma-Edelstahlbehälter
 - 4a. Standort bei Versuchsreihe 1
 - 4b. Standort bei Versuchsreihe 2



Abbildung 1: Panoramaaufnahme des Versuchs-Reinraums bei der Firma Testo Industrial Services, Kirchzarten (Quelle aller Abbildungen: Behrens Projektmanagement GmbH).

5. Kühlschrank in der Raumecke
6. Edelstahl-Arbeitstische
7. Personalschleuse

Zur Durchführung der Messungen wurden folgende kalibrierte Geräte verwendet:

- Optischer Partikelzähler: MET ONE 3400
- Aerosolgenerator: Topas ATM 226
- Volumenstrommesshaube: TSI AccuBalance 8375

3.2 Durchführung der Erholzeitmessung

Die Messung der Partikelabreicherung wurde als „100:1-Erholzeitmessung“ gemäß DIN EN ISO 14644-3 mit optischen Partikelmessern und einem Aerosolgenerator durchgeführt [4].

Vor Beginn der Messungen wurden die optischen Partikelzähler an ausgewählten Messpunkten platziert (s. Kap. 4.3) und eine isokinetische Messsonde angebracht.

Anschließend wurde der Reinraum mit einem Aerosol beaufschlagt und die Partikelkonzentration mittels eines Partikelzählers gemessen. Um hierfür eine möglichst lange Abreicherungszeit zu erzielen, wurde bei der ersten Versuchsreihe die Partikelzahl auf das 100-fache

des „in-operation“-Grenzwerts eingestellt, also das 1000-fache des Grenzwerts für den „at-rest“-Status. Ziel dieser Vorgehensweise war, die Gleichförmigkeit der Abreicherung für jede Luftwechselrate über einen großen Bereich der Partikelbelastung hinweg analysieren zu können.

Bei laufender Lüftungsanlage wurde gewartet, bis an allen Messpunkten die Partikelkonzentration unterhalb der Klassengrenze „at rest“ lag. Anschließend wurden die Schläuche beider Aerosolgeneratoren vor den Luftauslass gehalten, um eine möglichst gleichmäßige Partikelverteilung im Raum zu gewährleisten. Als Aerosol wurde Diethyl-Hexyl-Sebacat (DEHS) verwendet. Die Messung wurde gestartet, nachdem alle Partikelzähler die 100-fache Konzentration der erlaubten Partikel im Zustand „in operation“ (bei Versuchsreihe 1) bzw. „at-rest“-Zustand (bei Versuchsreihe 2) anzeigten. Da dies bei den 0,5-µm-Partikeln in Versuchsreihe 1 die Höchstleistungsfähigkeit der Partikelzähler überschritten hätte, wurde bei diesen Messungen zusätzlich ein Verdünnungssystem (100:1-Verdünnung) verwendet, um die Konzentration im Partikelzähler zur Vermeidung

der Koinzidenz – also die fehlerhafte Detektion eines großen Partikels aufgrund zeitgleicher Überlagerung zweier oder mehrerer kleiner Partikel in der Messkammer des Partikelzählers – zu verringern.

Die Messungen wurden beendet, nachdem alle Partikelzähler die Klassengrenze „at rest“ erreicht hatten.

In Abb. 2 ist beispielhaft der Verlauf der Partikelabreicherung von 0,5-µm-Partikeln anhand der Messwerte des Messpunkts 1 bei 10-fachem Luftwechsel pro Stunde ohne Drallauslass aufgezeigt.

Zum Zeitpunkt t_0 wurde die Messung gestartet und die Lüftungsanlage eingeschaltet. Kurz darauf wurde der Raum mit Aerosol beaufschlagt (Zeitpunkt t_1). Die Partikelkonzentration stieg bis zum Erreichen der vordefinierten Maximalbelastung an. Am Zeitpunkt t_{max} an dem dieser Wert an allen Partikelzählern erreicht bzw. überschritten ist, wurde die Aerosolzufuhr gestoppt. Die Partikelbelastung im Raum wurde danach durch die Aktivität der Lüftungsanlage abgereichert. Die graphische Auswertung zeigt bei logarithmischer Skalierung der Y-Achse einen

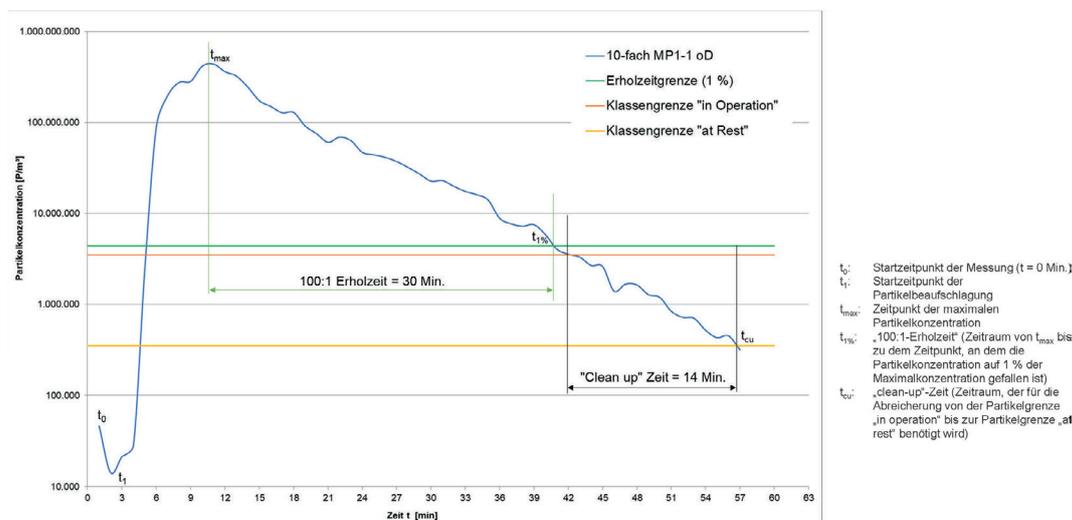


Abbildung 2: Bestimmung der Erholzeit und der „clean-up“-Zeit für 0,5- μm -Partikel anhand des Messpunkts 1 bei 10-fachem Luftwechsel ohne Drallausslass (Messsystem: Optischer Partikelzähler).

annähernd linearen Verlauf bis zum Ende der Messung. Bei $t_{1\%}$ wird die „100:1-Erholzeit“ bestimmt. Die Zeit zur Partikelabreicherung von den Klassengrenze „in operation“ bis zu „at rest“ ist die „clean-up“-Zeit t_{cu} .

3.3 Auswahl geeigneter Messpunkte

Die Messungen wurden mit den Luftwechselraten 10 h^{-1} , 20 h^{-1} und 30 h^{-1} jeweils mit und ohne Drallausslass durchgeführt.

Für die Partikel $<0,5\ \mu\text{m}$ wurden in Versuchsreihe 1 folgende Messpunkte (MP) gewählt:

- MP1-1: in der Raummitte auf Höhe des Behälters der Versuchsanlage
- MP1-2: unter der Reinraumwerkbank

In Versuchsreihe 2 wurde für die Messung der $5\text{-}\mu\text{m}$ -Partikel die Anzahl der Messpunkte erhöht, um weitere kritische Bereiche des Raumes zu erfassen. Die dafür gewählten Messpunkte waren:

- MP2-1: Raumecke
- MP2-2: mittig auf Höhe des Behälters
- MP2-3: hinter dem Kühlschrank
- MP2-4: auf der Reinraumwerkbank
- MP2-5: unter der Reinraumwerkbank
- MP2-6: neben Reinraumwerkbank und Arbeitstisch

Teil 2 dieses Beitrags wird in Ausgabe 2/2021 erscheinen.

Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate

Teil 2*)

Detlef Behrens • Behrens Projektmanagement GmbH, Marburg
Jessica Bachhofer und Benjamin Stefan Zipp • Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen
Prof. Dr. Cornelia Keck und Dr. Jens Schäfer • Philipps-Universität, Marburg
Prof. Dr. Frank Runkel • Technische Hochschule Mittelhessen und Justus-Liebig-Universität, Gießen



Korrespondenz: Detlef Behrens, Behrens Projektmanagement GmbH, Hasenberg 6, 35041 Marburg; **E-Mail:** info@behrens-pm.de

4. Ergebnisse

4.1 Experimentelle Partikelabreicherung (0,5 µm) bei unterschiedlichen Luftwechselraten

In Tab. 3 sind die verschiedenen Erholzeiten bei unterschiedlichen Luftwechselraten mit bzw. ohne Drallausslass dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die tatsächlichen „clean-up“-Zeiten und die „100:1-Erholzeiten“ bei allen Luftwechselraten und Messpunkten länger dauerten als die theoretischen Zeiten. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Partikelabreicherung bei einer Luftzufuhr ohne aufgesetztem Drallausslass schneller war als mit Drallausslass.

In Abb. 3 ist die experimentell ermittelte „clean-up“-Zeit bei unterschiedlichen Luftwechselraten (10 h⁻¹, 20 h⁻¹, 30 h⁻¹) mit Drallausslass nach den Filtern aufgetragen.

Insgesamt fällt die Partikelzahl bei allen Luftwechselraten sehr gleichmäßig ab. Die Schwankungen wer-

den nur zum Ende hin etwas ausgeprägter. Der Ort der Messung hat nur geringen Einfluss auf die Partikelabreicherung. Bei einem 10-fachen Luftwechsel ist die „clean-up“-Zeit unterhalb der Werkbank etwas länger als in der Mitte des Raumes. Bei höheren Luftwechselraten spielt der Ort der Messung keine Rolle mehr, da sich hier die „clean-up“-Zeit und auch die „100:1-Erholzeit“ der verschiedenen Messpunkte kaum noch unterscheiden.

Abbildung 4 zeigt die experimentell ermittelte „clean-up“-Zeit bei unterschiedlichen Luftwechselraten (10 h⁻¹, 20 h⁻¹, 30 h⁻¹) ohne Drallausslass.

Auch hier fällt die Partikelanzahl kontinuierlich ab, jedoch im Vergleich zu den Versuchen mit Drallausslässen weniger linear. Zudem sind Schwankungen in den Partikelkonzentrationen erkennbar. Die „clean-up“-Zeiten erfüllen alle die Vorgaben des Annex I. Unterschiede zwischen den Messpunkten sind in geringem Maß vorhanden. Bei 10 h⁻¹ erreicht der Messpunkt mitten im Raum (MP1-1) die Klassengrenze „at rest“ schneller, bei höheren Luftwechselraten wird diese

Grenze am Messpunkt unter der Reinraumwerkbank (MP1-2) früher erreicht.

4.2 Experimentelle Partikelabreicherung von 5-µm-Partikeln bei unterschiedlichen Luftwechselraten

In Tab. 4 sind die ermittelten Erholzeiten beider Versuchsreihen (mit und ohne Drallausslass) dargestellt.

Die experimentellen „100:1-Erholzeiten“ sind hierbei in allen Messreihen kürzer als die theoretische Erholzeit. Es fällt auf, dass im Mittelwert die „100:1-Erholzeit“ ohne die Verwendung von Drallausslässen kürzer ist als mit Drallausslass. Die „clean-up“-Zeit hingegen ist ohne Drallausslass im Mittel länger bzw. gleich lang ist wie mit Drallausslass. Bei 5 von 6 Vergleichsmessungen geschieht die Abreicherung gleichmäßiger, wenn Drallausslässe installiert sind. Dies zeigt sich in den geringeren Standardabweichungen. Mit steigenden Luftwechselraten wird der Raum sowohl mit als auch ohne Drallausslass homogener abgereichert, wodurch die lokalen Unterschiede der „clean-up“-Zeit kürzer ausfallen. Bei 30-fachem Luftwech-

*) Teil 1 dieses Beitrags ist erschienen in TechnoPharm 10, Nr. 5, 284–288 (2020).

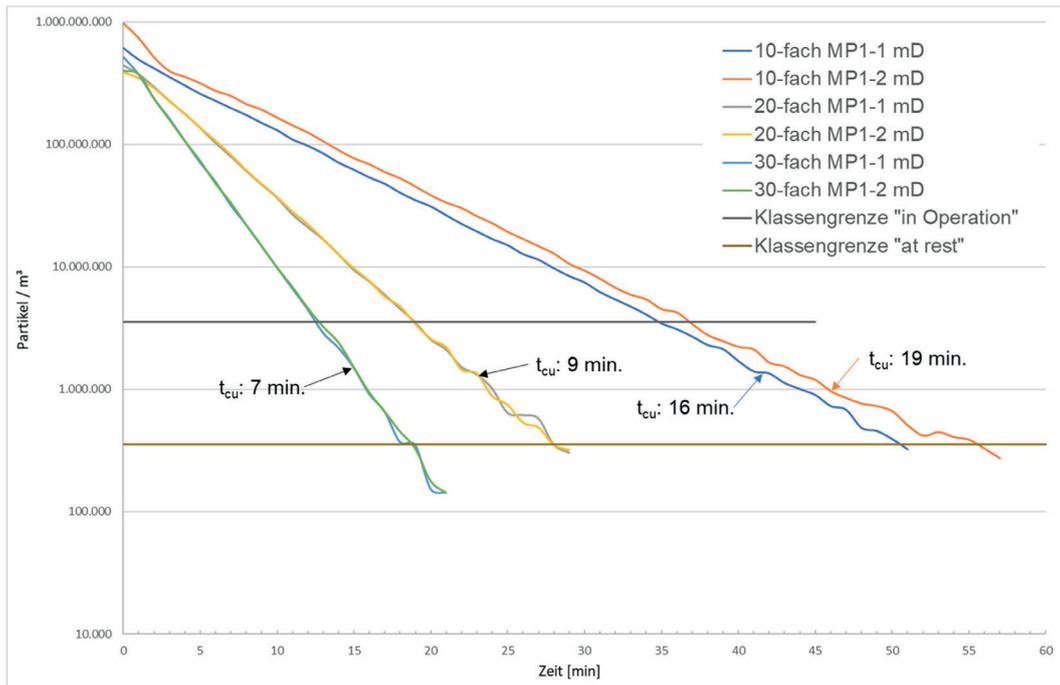


Abbildung 3: „clean-up“-Zeiten bei unterschiedlichen Luftwechselraten (10 h⁻¹, 20 h⁻¹, 30 h⁻¹) an den Messpunkten MP1-1 und MP1-2 mit Drallausslass.

sel ist die „clean-up“-Zeit nicht mehr abhängig vom Messpunkt, sie liegt bei allen Messpunkten zwischen 3 und 4 Min. Der Verlauf der Abreicherung ist relativ linear.

Für niedrige Luftwechselraten ist eine deutliche Abhängigkeit der „clean-up“-Zeiten vom Messpunkt erkennbar. Dies ist in Abb. 5 dargestellt.

Die „clean-up“-Zeit auf der Werkbank (MP2-4) ist bei 10 h⁻¹ Luftwechseln mit 14 Min. fast doppelt so lang wie unter der Reinraumwerkbank (MP2-5). Weiterhin wird der Einfluss der Sedimentation zum Beginn der Abreicherung sichtbar, da hier die Kurve schneller abfällt als theoretisch zu erwarten wäre. Dagegen zeigen sich zum Ende der Messungen deutlichere Wellen in den Abreicherungskurven.

Abbildung 6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Abreicherung als Vergleich der Mittelwerte der jeweiligen Luftwechselraten mit und ohne Drallausslass.

Bei 10-fachem Luftwechsel ist der Unterschied mit/ohne Drallausslass im Rahmen der Messungenauigkeiten vernachlässigbar. Bei 20-fachem

Luftwechsel tritt eine größere Differenz auf, die jedoch aufgrund eines Anstiegs der Werte am Ende der Messung ohne Drallausslass länger ausfällt als vom Kurvenverlauf zu erwarten wäre. Hier könnte auch die Aktivität des Personals im Raum den kurzzeitigen Wiederanstieg der Partikelzahlen bewirkt haben.

5. Diskussion

Der EU-GMP-Leitfaden empfiehlt eine „clean-up“-Zeit für die Errei-

chung der vorgegeben Partikelkonzentration im „at-rest“-Status von 15–20 Min. [2, 3]. Diese Empfehlung konnte mit allen getesteten Luftwechselraten in einem Reinraum der Klasse C eingehalten werden – unabhängig davon, ob ein Drallausslass zur Verwirbelung der Luft eingesetzt wurde oder nicht. Die längste benötigte „clean-up“-Zeit betrug 19 Min. bei 10-fachem Luftwechsel pro Stunde für Partikel <0,5 µm unter Verwendung von Drallausslässen. Dies entspricht der Obergrenze der

DOSTMANN electronic GmbH

DEGraphBlue die „Kalibrierapp“

passend zu Dostmann Referenzinstrumenten

DOSTMANN electronic GmbH · Waldenbergweg 3b · D-97877 Wertheim
info@dostmann-electronic.de · www.dostmann-electronic.de

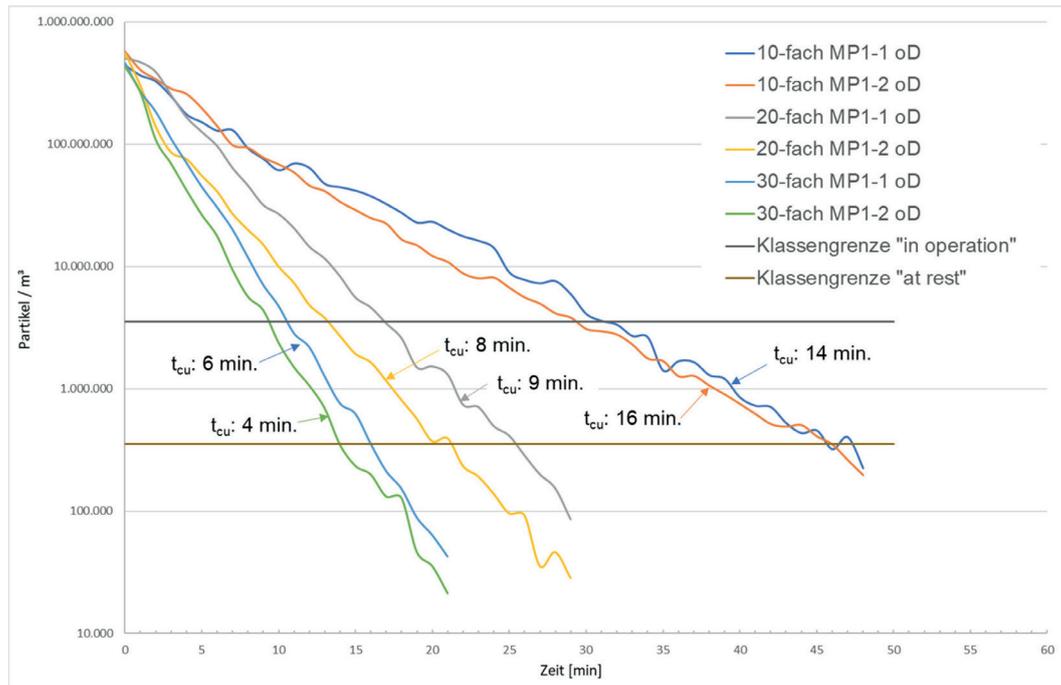


Abbildung 4: „clean-up“-Zeiten bei unterschiedlichen Luftwechselraten (10 h^{-1} , 20 h^{-1} , 30 h^{-1}) an den Messpunkten MP1-1 und MP1-2 ohne Drallausslass.

Empfehlung. Mit diesen Ergebnissen wäre es möglich, die Luftwechselrate eines Klasse-C-Raums auf 10 h^{-1} zu senken, was eine signifikante Reduktion der Energiekosten bedeutete.

Die Richtwerte, an denen sich viele Betreiber orientieren, sind demzufolge nicht immer korrekt. Häufig werden die Räume hinsichtlich der benötigten Luftwechselraten zur Erhaltung bzw. Erreichung einer Reinheitsklasse auch für den Status „in operation“ zu hoch eingestellt. Molenaar [6] zeigte darüber hinaus weitere Einsparpotenziale. Er untersuchte in Reinräumen 3 Faktoren: genaue Abstimmung der Lüftungsanlage, bedarfsgesteuerte Ventilation und Optimierung des Strömungsverhaltens. Die bedarfsgesteuerte Ventilation könnte mit bis zu 93 % Energiekosteneinsparung den größten Beitrag leisten. Dabei würde die Lüftungsanlage die Luftwechselrate nach Erreichen des „at-rest“-Zustands (also ohne anwesendes Personal und laufende Prozesse) deutlich reduzieren, da keine Partikelgeneration stattfindet. Dies sei in

Reinräumen besonders effektiv, die oft nicht besetzt seien [6].

Bei niedrigen Luftwechselraten konnte eine Abhängigkeit der Erholzeit vom jeweiligen Messpunkt festgestellt werden. Bei 10-fachem Luftwechsel pro Stunde ohne Verwendung von Drallausslässen betrug für $5\text{-}\mu\text{m}$ -Partikel die Differenz zwischen der schnellsten und lang-

samsten „clean-up“-Zeit 7 Min., wobei selbst an der langsamsten Stelle die „clean-up“-Zeit mit 14 Min. bereits unter der empfohlenen Zeit von 15–20 Min. lag. Die „clean-up“-Zeiten und die „100:1-Erholzeiten“ auf der Werkbank (MP2-4) waren bei 10-fachem Luftwechsel pro Stunde am längsten und zeigten große Differenzen zu den Zeiten der ande-

Tabelle 3

Vergleich von „clean-up“-Zeiten und „100:1-Erholzeiten“ bei unterschiedlichen Luftwechselraten mit bzw. ohne Drallausslass.

Luftwechselrate [h^{-1}]	Messpunkt	„clean-up“-Zeit 10:1 [min]		„100:1-Erholzeit“ [min]	
		mit Drall	ohne Drall	mit Drall	ohne Drall
10	MP1-1	16	14	32	30
	MP1-2	19	16	30	26
20	MP1-1	9	9	19	16
	MP1-2	9	8	19	12
30	MP1-1	7	6	12	11
	MP1-2	7	4	13	10

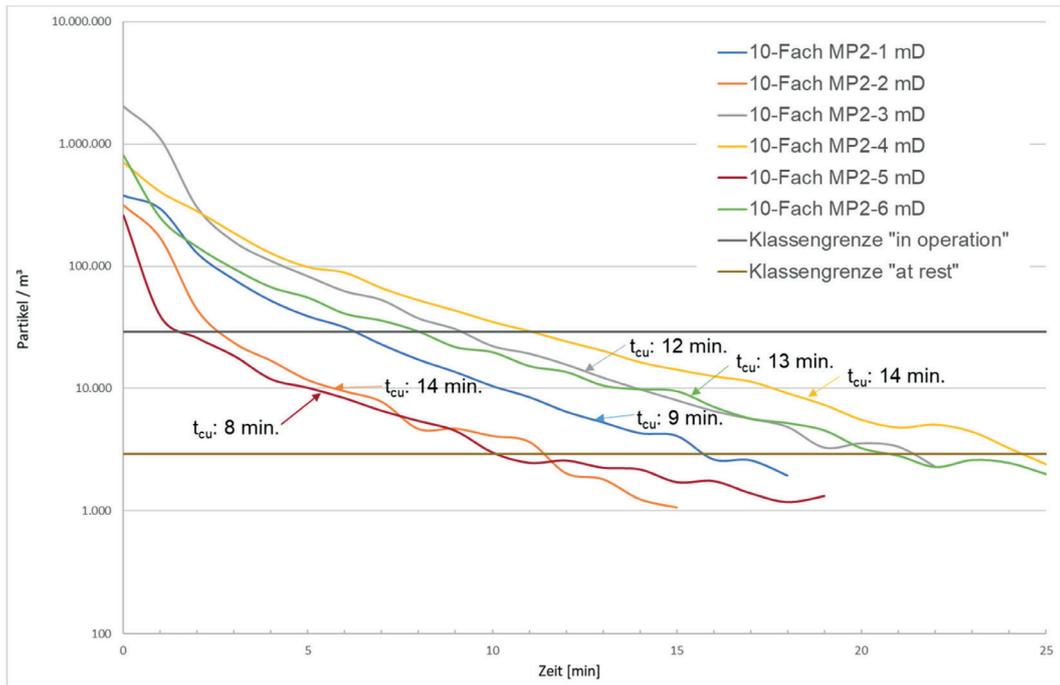


Abbildung 5: Einfluss des Messpunktes auf die 5- μ m-Partikelabreicherung bei 10-fachem Luftwechsel und montiertem Drallauslass.

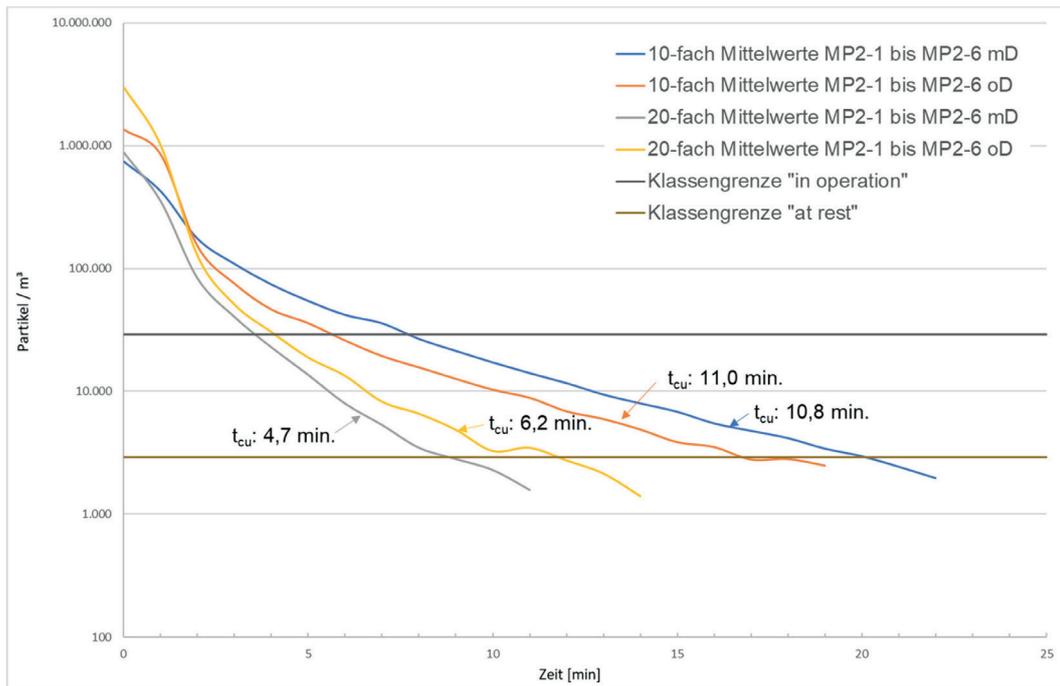


Abbildung 6: Einfluss des Drallauslasses als Darstellung der Mittelwerte (MP2-1 bis MP2-6) für 10- und 20-fachen Luftwechsel mit und ohne Drallauslass.

ren Messpunkte. Diese Differenz relativierte sich jedoch mit zunehmender Luftwechselrate – der Unterschied zwischen den einzelnen Messpunkten wurde geringer. Ein Grund dafür ist, dass die Durch-

mischung des Raums bei niedrigen Luftwechselraten nicht an allen Punkten ideal bzw. homogen ist.

Die ermittelten „100:1-Erholzeiten“ bei den Experimenten mit und ohne Drallauslass zeigen, dass die

Abreicherung ohne Drallauslass schneller abläuft. In den Abreicherungskurven ist dann jedoch auch eine deutliche Ungleichmäßigkeit erkennbar. Die schnellere Partikelabreicherung ohne Verwendung

Tabelle 4

Ermittelte „clean-up“-Zeiten und „100:1-Erholzeiten“ (mit und ohne Drallauslass) bei verschiedenen Luftwechselraten (10 h⁻¹; 20 h⁻¹; 30 h⁻¹; SD: Standardabweichung).

Luftwechselrate [h ⁻¹]	Messpunkt	„clean-up“-Zeit 10:1 [min]		„100:1-Erholzeit“ [min]	
		mit Drall	ohne Drall	mit Drall	ohne Drall
10	MP2-1	9	10	16	14
	MP2-2	9	7	12	6
	MP2-3	12	12	11	7
	MP2-4	14	14	21	9
	MP2-5	8	11	11	14
	MP2-6	13	12	16	17
	σ ± SD	10,8 ± 2,3	11,0 ± 2,2	14,5 ± 3,6	11,2 ± 4,1
20	MP2-1	5	5	7	5
	MP2-2	4	4	7	6
	MP2-3	5	6	6	3
	MP2-4	6	7	6	4
	MP2-5	4	7	5	11
	MP2-6	4	8	6	6
	σ ± SD	4,7 ± 0,7	6,2 ± 1,3	6,2 ± 0,7	5,8 ± 2,5
30	MP2-1	4	4	6	3
	MP2-2	4	4	5	5
	MP2-3	4	4	5	6
	MP2-4	4	3	5	3
	MP2-5	3	3	5	4
	MP2-6	4	4	6	6
	σ ± SD	3,8 ± 0,4	3,7 ± 0,5	5,3 ± 0,5	4,5 ± 1,3

von Drallauslässen kann demnach auch Nachteile mit sich bringen. Eine Studie von Whyte et al. [7] kam zu dem Ergebnis, dass durch Verwendung eines Drallauslasses die Raumluft gleichmäßiger durchmischt wird als ohne einen solchen. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn Temperaturdifferenzen zwischen Raumluft und warmen Oberflächen im Raum auftreten (z. B. durch das Betreiben von Maschinen), da hierdurch eine beschleunigte Wärmeabfuhr stattfinden könnte [7]. Gleichzeitig könnte diese homogenere Verteilung der Luft auch zu einer gleichmäßigeren Ab-

reicherung der Partikel führen, wie in den durchgeführten Experimenten bestätigt wurde. Ohne Drallauslass wurden deutliche lokale Unterschiede zwischen den einzelnen Messpunkten festgestellt. Dabei strömt die Luft fast senkrecht nach unten. Die Strömungsgeschwindigkeit fällt allerdings nach einer Entfernung von ca. 2 m stark ab. Whyte et al. stellten fest, dass die Konzentration luftgetragener Partikel direkt unter dem Luftauslass 25-fach geringer ist als die durchschnittliche Konzentration im Raum [7]. Dies erklärt die vergleichsweise kurzen Erholzeiten in

der Mitte des Raumes (MP2-2), welche sich relativ nahe am Luftauslass befand.

Ein Vergleich der theoretischen Erholzeiten mit den gemessenen Werten zeigt einen deutlichen Unterschied bei den unterschiedlichen Partikelgrößen. Während die „clean-up“-Zeiten und die „100:1-Erholzeiten“ bei den Partikeln <0,5 µm bei den Versuchen immer über den theoretisch zu erwartenden Werten lagen, ist dies bei den 5-µm-Partikeln genau umgekehrt. Bei der Betrachtung der theoretischen Erholzeiten werden nicht alle Faktoren einbezogen, welche die Abreicherung der Partikel beeinflussen. So werden kleine Partikel durch auftretende Turbulenzen an Kanten der Geräte und Einrichtungen im Raum leichter abgelenkt. Sie bleiben aber dennoch von der Luft getragen, was deren Abreicherung verzögert. Bei Partikeln ab einer Größe von 1 µm kommt es hingegen zur Ablagerung auf Oberflächen, da diese aufgrund ihrer Trägheit und Masse abgeschieden werden. Mit steigender Turbulenz wird dieses Phänomen verstärkt, was zu der größeren Differenz mit höheren Luftwechselraten beiträgt [8]. Außer Acht gelassen wurden auch elektrostatische Effekte, welche eine Adhäsion der Partikel auf Oberflächen bewirken können.

Bei der Partikelmessung kann es außerdem zu Messfehlern und verfälschten Ergebnissen durch die verwendete Messtechnik kommen. Bei der Streulichtmessung, mittels der die optischen Partikelzähler messen, wird nicht der Partikel selbst, sondern dessen Streulicht beim Durchtritt durch die Messkammer erfasst. Über den gemessenen Streulichtimpuls kann keine direkte Aussage über die Form und Größe des Partikels getroffen werden, da reale Teilchen keine ideale Form aufweisen. Bei der Messung kann es somit zu Fehlern durch falsche Größenermittlung je nach Form und Lage des Partikels zum Zeitpunkt der Erfassung durch das Messgerät kommen. Weiterhin ist eine Koinzidenz möglich, wenn 2 oder mehrere Partikel sich in der

Messkammer des Partikelzählers überlagern. Das Gerät „erkennt“ in diesem Fall ein großes Partikel anstatt zweier kleiner, sodass die Zählung und Größenklassifizierung nicht die exakte reale Partikelverteilung im Raum widerspiegelt [9].

6. Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass die empfohlene „clean-up“-Zeit von 15–20 min in einem Reinraum der Klasse C nach Annex 1 selbst an kritischen Messpunkten bereits bei niedrigen Luftwechselraten für alle Partikelgrößen erreicht werden kann. Lokale Unterschiede bzgl. der Erholzeiten fallen mit steigenden Luftwechselraten geringer aus. Dennoch können nach den vorliegenden Ergebnissen weniger als 20 Luftwechsel pro Stunde verwendet werden, um den Betriebszustand „at rest“ in der vorgegebenen Zeit zu erreichen. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst mit einem 10-fachen Luftwechsel die regulatorischen Anforderungen an die „clean-up“-Zeit eingehalten werden können. Mit Einbeziehung eines Sicherheitsaufschlags ist für Reinräume der Klasse C eine Luftwechselrate von 12–15 h⁻¹ ausreichend.

Daraus folgt, dass die Empfehlungen in der Literatur von 20 h⁻¹ und mehr Luftwechseln für die Einhaltung der geforderten Partikelkonzentration in Reinraumklasse C zu hoch angesetzt sind. In Kombination mit einer bedarfsgesteuerten Aktivität der Lüftungsanlage herrscht für diese Reinnräume demnach ein großes Potential, Energiekosten einzusparen. Sofern eine höhere Luftwechselrate nicht aufgrund besonderer Anforderungen (z. B. zum Zwecke der Wärmeabfuhr) eingestellt werden muss, ist eine Reduzierung der Luftwechselrate zur Nutzung dieses Potenzials nach den vorliegenden Ergebnissen sinnvoll und realisierbar.

7. Danksagung

Die Autoren danken der Firma Testo Industrial Services GmbH in Kirchzarten für die Bereitstellung des Versuchsraumes und der Messtechnik sowie die Beratung und Unterstützung bei den Messungen.

Literatur

- [1] European Commission: EudraLex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products, 2009
- [2] EU GMP Annex 1 Revision: Manufacture of Sterile Medicinal Products (Draft). https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/gmp/2020_annex1ps_sterile_medicinal_products_en.pdf (zuletzt aufgerufen am 15.04.2020)
- [3] Behrens, D., Bachhofer, J., Zipp, B., Keck, C., Schäfer, J., Runkel, F.: Optimale Luftwechselraten in Reinnräumen/Sperrungsfeld zwischen Partikelabreicherung und Wirtschaftlichkeit. *TechnoPharm* 10, Nr. 1, 6–15 (2020)
- [4] DIN EN ISO 14644-3:2005 (D). Reinnräume und zugehörige Reinnraumbereiche – Teil 3: Prüfverfahren
- [5] Whyte, W., Whyte, W.M. u. Eaton, T.: The application of the ventilation equations to cleanrooms part 1: The equations. *Clean Air and Containment Review* (2012) Issue 12
- [6] Molenaar, P.C.A.: Ventilation efficiency improvement in pharmaceutical cleanrooms for energy demand reduction, Eindhoven University of Technology. Eindhoven 2017
- [7] Whyte, W., Hejab, M., Whyte, W. M. u. Green, G.: Experimental and CFD Air-flow Studies of a Cleanroom with Special Respect to Air Supply Inlets. *International Journal of Ventilation* 9 (2010) 3, S. 197–209
- [8] Whyte, W., Agricola, K. u. Derks, M.: Airborne particle deposition in cleanrooms: Calculation of product contamination and required cleanroom class. *Clean Air and Containment Review* (2016) 26, S. 4–10
- [9] Kahlden, T. von: Was ist Partikelmonitoring? Ein Auszug aus dem GMP-Berater. Maas & Peither AG – GMP-Verlag 2015.

Chefredakteur: Claudius Arndt, Leitender Redakteur: Jens Renke. Verlag: ECV · Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Baendelstockweg 20, 88326 Aulendorf (Germany). Tel.: +49 (0) 7525-940 120. E-Mail: redaktion-tp@ecv.de. www.ecv.de. Herstellung: rdz GmbH. Alle Rechte vorbehalten.

Kalibrierung,
Qualifizierung,
Validierung &
GxP-Services



Testo Industrial Services GmbH
gmp@testotis.de · Fon 07661 90901-8000
www.testotis.de

Mehr Service, mehr Sicherheit.
Full Service für Ihre GMP Compliance und Ihre Reinnräume.

RESEARCH ARTICLE



Effects of different air change rates on cleanroom ‘in operation’ status

Detlef Behrens^{a,b} , Jens Schaefer^c, Cornelia M. Keck^c and Frank E. Runkel^{a,c}

^aTechnische Hochschule Mittelhessen, Giessen, Germany; ^bBehrens Projektmanagement GmbH, Marburg, Germany; ^cPhilipps-Universität, Marburg, Germany

ABSTRACT

The objective of this experimental study is to analyze non-viable and viable particle loads in a pharmaceutical cleanroom under ‘in operation’ conditions using different air change rates (ACRs). Regulatory guidelines give limit values for particles/m³ and colony forming units (CFUs)/m³. A widely used ACR is 20 h⁻¹ as this value is recommended by the Food and Drug Administration (FDA) in its guidance for industry on sterile drug products. However, this value may be too high, resulting in increased costs for energy. A typical pharmaceutical cleanroom was used for this study, and operations were simulated with a process unit and two operators in the room. The experiments were conducted twice with four different ACRs and four different types of operator garments, resulting in 32 trials in total. Particle load and CFUs were measured by calibrated particle counters and microbial air samplers. The results give evidence that an ACR of 20 h⁻¹ is not required. ACR 10 h⁻¹ is sufficient without compromising the demanded air quality. Furthermore, it was found that regulatory agencies should reevaluate the expected limits as these currently give a high buffer between the required and actual values, which potentially cover up problems in aseptic manufacturing.

ARTICLE HISTORY

Received 31 May 2021
Revised 11 January 2022
Accepted 7 February 2022

KEYWORDS

Cleanroom ventilation; air change rate; ISO 8; Class C; aseptic processing; cleanroom ‘in operation’; energy saving; HVAC systems; Annex 1; aseptic guide

Introduction

The cleanroom conditions for sterile drug manufacturing by means of aseptic processing in a classic or biopharmaceutical facility are regulated by national and international regulatory guidelines [1–3]. Specific requirements are given for the quality of air in pharmaceutical cleanrooms. The guidelines recommend limit values for a maximum number of airborne particles with sizes $\geq 0.5 \mu\text{m}$ as well as colony-forming units (CFUs) per m³ air within cleanrooms. Two major differences between both guidelines regarding limit values are important: first: in addition, the Annex 1 also gives limit values for particles $\geq 5 \mu\text{m}$. Second: while the FDA aseptic guide defines limits only for the ‘in operation’ status of processing rooms [3], the European Annex 1 also describes an ‘at rest’ status [2]. In the draft of the announced revision of this guideline, an expected duration from the ‘in operation’ to the ‘at rest’ status is given [4]: ‘The particulate limits ... for the ‘at rest’ state should be achieved after a ‘clean up’ period on completion of operations. The ‘clean up’ period should be determined during the classification of the rooms (guidance value of 15–20 min)’ [4,p.10]. Annex 1 defines cleanroom classes A–D [2]. Cleanroom classifications are also given in Deutsches Institut fuer Normung (German Institute for Norming) (DIN) European Norm (EN) International Organization for Standardization (ISO) 14644-1 with ranges from ISO 5 to ISO 8 (relevant for pharmaceutical cleanrooms), where ISO 8 equal Class C limits ‘in operation’, and ISO 7 equal Class C limits ‘at rest’ [5].

In Annex 1 Class C, the allowed limits for particulate and microbial contamination are recommended as shown in Table 1 [2].

These regulatory expectations can only be achieved by a continuous supply of filtered, clean air, and an extraction of contaminated air. Hence, the quality of air in the cleanroom is in a direct relation to the air change rate (ACR). ACR describes how often in a given time (typically per hour) the room volume of air is exchanged [6].

$$N = \frac{v \cdot A}{V} = \frac{\dot{V}}{V} \quad (1)$$

In Equation (1), N denotes the number of air changes per hour, v the air velocity (m/h), A the filter surface (m²), V the total room volume (m³), and \dot{V} the air flow rate (m³/h).

FDA’s aseptic guide states [3]: ‘Air change rate is another important cleanroom design parameter. For Class 100,000 (ISO 8) supporting rooms, airflow sufficient to achieve at least 20 air changes per hour is typically acceptable’ wherein the term ‘typically acceptable’ can be misinterpreted as ‘required’ [3,p.11]. In Annex 1, a specific value for a suitable ACR is not given. The WHO recommends an ACR of 6–20/h⁻¹ for non-sterile manufacturing facilities, but does not give a guidance value for sterile operations [7].

For the operation of cleanrooms, large amounts of energy are consumed compared to non-cleanrooms [8–10]. Heating, ventilation and air conditioning (HVAC) systems for pharmaceutical cleanrooms can have up to 25 times higher energy demands than standard rooms [8]. The focus of regulatory requirements in ‘Good Manufacturing Practice’ (GMP)-regulated environment, however, is always on patient, and product, as well as operator safety, and not on energy efficient production. The obligation to meet the

CONTACT Detlef Behrens  behrens1@behrens-pm.de  Technische Hochschule Mittelhessen, Giessen, Germany

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/03639045.2022.2043352>

© 2022 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

Table 1. Annex 1 Class C limits.

Parameter	'In operation' limit (ISO 8)	'At rest' limit (ISO 7)
Particles $\geq 0.5 \mu\text{m}/\text{m}^3$	3,520,000	352,000
Particles $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ (Annex 1 Class C only)	29,000	2,900
Air sample CFU/ m^3	100	
Settle plates (diameter 90 mm) CFU/4 h	50	

guidance values leads to strict decisions in many pharmaceutical companies: Cleanrooms are operated 24 h with a constant ACR, independent from actual use [11]. Furthermore, the defined ACR is often designed higher than actually needed, which again leads to an increased energy demand of up to 50–75% of the total facility energy consumption [12]. The reason for this is an over-interpretation of regulatory guidelines, which are generic and do not reflect specific cleanroom process conditions [8]. The operating companies do not always know which ACR is required for a specific room, and, thus, decide to design the air handling unit (AHU) on the 'safe side', with higher ACRs for the cleanrooms than technically required [12]. Opportunities for energy saving by a correct and not overdesigned setting of ACR per individual cleanroom are thereby missed.

In the pharmaceutical industry, the areas for preparation of sterile drug products within an ISO 8/Class C environment are typically much larger than the critical areas for final product filling in ISO 5-7/Class A-B. These filling areas are typically kept to a minimum due to the higher contamination risk for the final product in (open) filling processes. Restricted access barrier systems (RABSs) or isolators with ACRs significantly higher than 20h^{-1} are used in these critical areas. By this, the volume of the ventilated room becomes much smaller and the energy demand for air conditioning acceptable. RABS and isolators however are not applicable in many preparation steps for the product which are performed in Class C/ISO 8 conditions such as large process vessels, washing machines, and autoclaves. Still, wherever the use of RABS and isolators is possible also in lower cleanroom classes their use should be considered in terms of quality management and energy saving purposes. If this is not possible other ways of energy saving can be followed.

Demand-controlled filtration (DCF) is such an opportunity to save energy. The AHU then operates with a reduced capacity during the 'at rest' status of the cleanroom. Various studies have shown that DCF has a significant potential for energy saving [13–15]. However, uncertainties with HVAC control systems lead to an avoidance of DCF for single rooms, due to the risk of cross-contamination in case of a reversed pressure cascade to corridors or neighbor rooms during an up and down phasing of the AHU. Thus, DCF is used in facilities only for an overnight shutdown of the complete production area.

In view of the public interest to decrease greenhouse gas emissions, as well as to improve energy efficiency, a re-thinking has started, which is also expressed in guidance documents [16,17]. Until April 2018, the International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE) also recommended an ACR of 20h^{-1} in its widely used second edition of the guide for sterile manufacturing facilities [18]. This second edition is still often referenced in research papers. In the current third edition, ISPE withdraws this specific value [17]. The suggestion is now to design the cleanroom HVAC systems based on the expected particle and microbe-carrying particle (MCP) load of rooms, in combination with other parameters as, for example, recovery time. For this, ISPE explicitly refers to Sun et al. who describe a model for cleanroom

engineering [19]. This opens the opportunity to come out with reduced ACR requirements below the FDA's recommendation of 20h^{-1} .

For the additional requirement on 'clean up periods', recent studies demonstrated, that even with an ACR of 10h^{-1} the requirement of 15–20 min for the 'clean up period' from 'in operation' to 'at rest' can be achieved [20,21].

If this obligation can be achieved with ACR 10, the scientific follow-up question for this experimental study is: Which ACR provides the minimum required to meet the regulatory expectations for the 'in operation' status in a pharmaceutical ISO 8/Class C cleanroom? Consequently, the objective of the test series was to determine the required minimum ACR to meet regulatory guideline limit values with respect to 0.5 and $5 \mu\text{m}$ particles, as well as CFUs/ m^3 , and on settle plates (SPs).

Methods

Study setup

In an experimental study, 16 different experiments were performed by simulation of 'in operation' conditions in a cleanroom with equipment and personnel, emitting particles and CFUs. This was simulated with four different garments:

- Personnel in garment for ISO 8: single use Tyvek[®]-cleanroom-overall, overshoes, hairnet, face mask, gloves;
- Personnel in garment for ISO 9: single use fabric cleanroom-overall, overshoes, hairnet, face mask, gloves;
- Personnel in covering street clothes, face mask, gloves;
- Personnel in T-Shirt and shorts, face mask, gloves;

Please review the [supplementary material](#) for a photo of the different garments (Figure S1).

Though there are differences in the make of cleanroom clothing in various countries, the objective and regulatory expectation remains the same: the gown should provide a barrier between the operator skin and the cleanroom environment to prevent particles and MCPs emitted by the operator from product contamination.

Garment A was chosen as a possible gown for Class 100,000/ISO 8/Class C 'in operation' cleanrooms. In contrast to that, Garment B is not recommended for aseptic processing as it consists of a porous fabric which does not provide a full barrier. This type of gown is for example used in non-sterile operations such as production of oral solid dosage forms. Garments C and D are not cleanroom adequate. They were included in this study to explicitly carve out the need of proper cleanroom clothing.

Face masks are usually not required in environments \geq ISO 9. However, for health reasons, due to the SARS-CoV-2 pandemic, it was decided to continuously wear face masks during the test series. Gloves were worn throughout all experiments, even though they are usually not used in garment situation B–D. This was done to minimize the risk of unintended (bio-)contamination of the used microbial air sampling probes. To simulate a potential microbial contamination by typically increased skin surface from hands in garment B as compared to A, the sleeves of the fabric overall were pulled up a bit.

Each of the four different garments was tested with four different ACR settings:

- 20h^{-1}
- 15h^{-1}
- 12h^{-1}

4. 10 h^{-1}

With variation of garment and ACR, this study focused on parameters that might lead to a violation of regulatory limits. No further investigation of contaminating species was performed in this experimental study as the mere number of MCPs, regardless of its kind is relevant for a deviation from guidance limits. However, in real aseptic production, any deviation should be followed by an extensive analysis, including the identification of the contaminating species, as part of the root cause analysis to define effective corrective and preventive actions.

Test design

The tests were started with garment A from ACR setting 1–4, followed by garment B 1–4, etc., to continuously increase the particle and CFU contamination in the previously cleaned and disinfected room. Each test was conducted twice, resulting in total 32 test runs. The test numbering is shown in Table S1 of the Supplementary material.

All experiments for garments A–C and ACR 10, 12, 15, and 20 were performed in the test design as shown in Table 2.

It was expected that at the beginning of the tests, the airborne particles that remained in the air from test preparation activities, would be in a steady state or slightly decay by sedimentation, as no HVAC was actively removing particles. With the entering of personnel after five minutes, an increase of particles should be observed (HVAC still off). By starting the HVAC after 10 minutes, a decay of particles was expected at a different speed, according to the applied ACR. A typical operation situation was anticipated five minutes after the HVAC start: operators performed their duties and emitted particles, while the AHU constantly removed these. This phase was held for further 10 minutes to monitor airborne particle levels at different room locations in the real ‘in operation’ status. After this phase, the operators left the room. Consequently, the particle generation by personnel was zero, and the total contamination was expected to decrease.

Table 2. Test design for garment A–C/All ACR.

Time (min)	Action
0	Test start HVAC off Instruments on
5	Two operators enter the room and do slow, cleanroom-adequate movements
10	HVAC is switched on. Operators continuously move slowly for 15 min; biomonitoring probes are regularly changed
25	Operators leave the room. HVAC and instruments remain on. Five minutes recovery time
30	Test end

Table 3. Test design for garment D/All ACR.

Time (min)	Action
0	Test start HVAC off Instruments on
5	Two operators enter the room and do slow, cleanroom-adequate movements
10	HVAC is switched on. Operators continuously move slowly for 15 min; biomonitoring probes are regularly changed
25	Operators move fast (running, jumping, waving) to intentionally generate a high emission of particles and CFUs
30	Operators leave the room. HVAC and instruments remain on. Five minutes recovery time
35	Test end

With garment D, one phase was added, as shown in Table 3.

The addition of a 5-min spiking phase after 25 min, was intended to boost the contamination with particles and MCPs in order to examine the increase and decay under different ACRs (Figure 1).

Not to be misunderstood: the involved test personnel was perfectly aware that neither the type of clothing, nor the way of (foolish) movements are adequate for a process operation in a cleanroom environment. This test was conducted to analyze the maximum achievable level of particles and CFUs in a cleanroom with running HVAC by different ACRs.

Cleanroom and equipment

The room used for the trials is a training room at *Testo Industrial Services* in Kirchzarten, Germany. Its design is a typical cleanroom as it can be found in many pharmaceutical companies. Floors, walls, doors, and ceiling are built with cleanroom components. Two H13 air filters with swirl diffusers are installed in the ceiling and two exhaust air grids are mounted slightly above floor level on the wall. The room has a surface area of $A=38.4\text{ m}^2$ and a volume of $V=99.8\text{ m}^3$. An air lock ($A=11.8\text{ m}^2$) is connected upstream. The HVAC system of the room enables variable ACRs from <10 to 70 h^{-1} , which allowed all tests in an ACR range that is typically used in the pharmaceutical industry.

The floor was cleaned and disinfected with Korsollin FF® the evening before test start. All equipment surfaces were treated with alcoholic wipe disinfection. Figure 2 shows a panoramic view of the room without process equipment.

To simulate typical operation processes, a process unit was placed in the middle of the room. It consisted of a tank filled with water, a circulation pump, pipes, as well as electrical and instrumentation equipment. During the test runs, the pump was continuously running. This caused heat generation and air turbulence from the motor. With the given size of the room, it was decided to conduct the experiments with two operators, which is also a typical occupancy in pharma process rooms of this space.

Figure 3 shows the room with the process equipment and allocated measuring instruments.

A Testo 420 volume flow hood for air supply rate measurement was used to individually adjust the correct ACR for all tests. All measuring instruments were calibrated prior to the experiments.

The four particle counters: particle counter 1, located high inside process unit (P1); particle counter 2, located low inside process unit (P2); particle counter 3, located on middle room



Figure 1. Fast movements after 25 min with garment D.

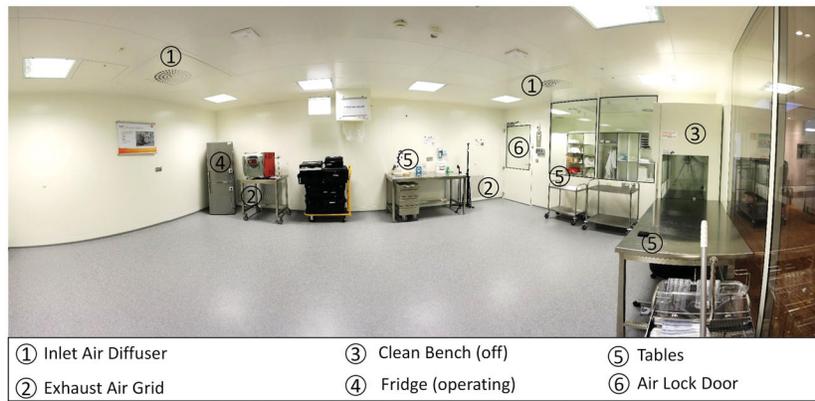


Figure 2. Panoramic view of test cleanroom prior to start without process equipment.

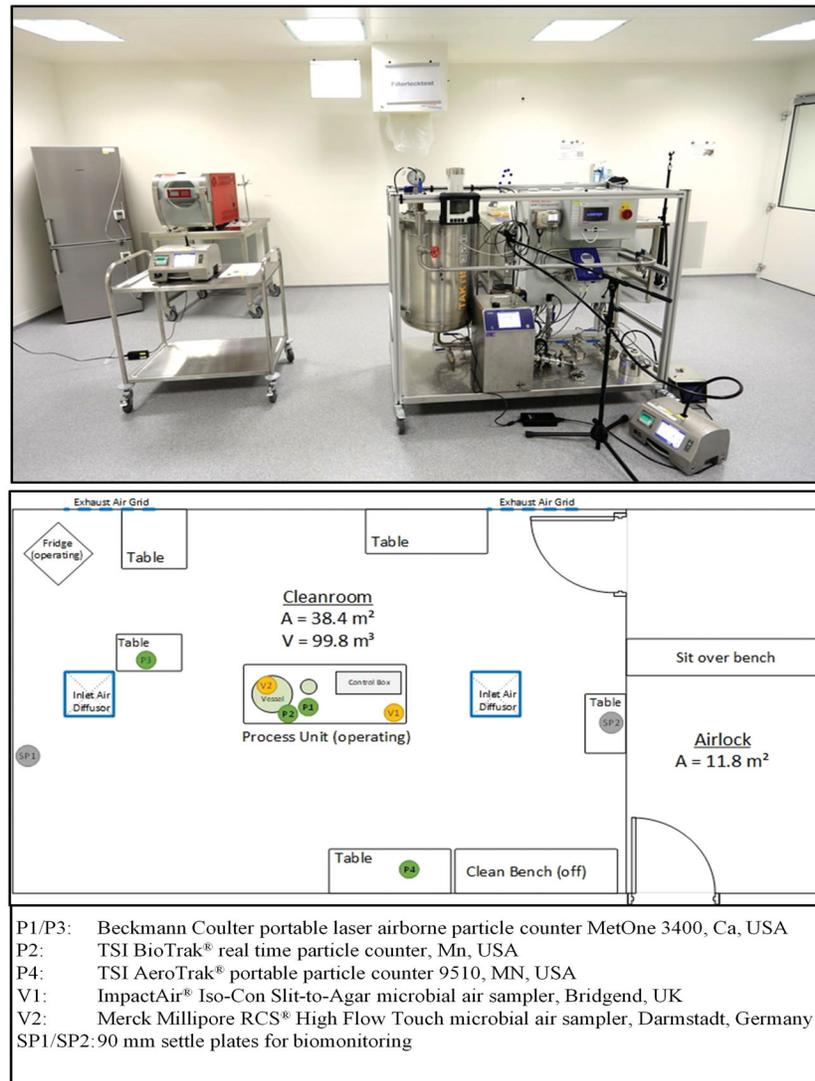


Figure 3. Room layout with process unit and allocated measuring instruments.

table (P3); particle counter 4, located high inside process unit (P4) are common laser-based systems using the effect of light scattering for particle counting. All four counters were set-up with an air flow rate of 28.3L/min, and a one-minute test duration, resulting in 4000 data points throughout all 32

experiments. Two counters were located in the process unit close to the vessel at the height of 0.6 m (P2) and 1.0 m (P1). The other two counters were placed on desks, below an inlet air swirl diffuser (P3), and on the cleanroom wall close to the (non-operational) clean bench (P4).

Merck Millipore tryptic soy agar (TSA) plates (90 mm/30 ml) and test stripes (for RCS[®] air sampler) were used for biomonitoring [22,23]. In addition, 90 mm SPs were laid out at positions settle plate 1, located on floor (SP1) and settle plate 2, located on table near air lock (SP2) to monitor the microbial contamination for four hours, according to EU GMP Annex 1. After sampling, all plates and stripes were incubated for four days at 32 °C. CFUs were counted on day 2, 3, and 4. No further CFUs could be detected between day 3 and 4.

The Merck Millipore RCS[®] High Flow Touch is a microbial air sampler, based on impaction by centrifugal force on test strips with an air flow rate of approximately 100 L/min [24]. The calibrated airflow of the used system was 97.6 L/min. The advantage of this system is the high sampling volume. The test duration and, thus, the sampling volume, was set-up as follows:

- 7 min/strip for tests with garments A–C, four stripes total (28 min/683 L);
- 7 min/strip for tests with garment D, first four stripes (28 min/683 L);
- 5 min/strip for tests with garment D, last stripe (=5 min/488 L).

The ImpactAir[®] Iso-Con Slit-to-Agar microbial air sampler works with 90 mm TSA petri dishes, which slowly rotate below very narrow inlet slit [25]. The air flow is 15 L/min. The test duration and, by this, the sampling volume, was set-up with 7 min/plate for tests with the garments A–C, and 8 min/plate for tests with garment D, resulting in a sampling volume of 105 L (A–C) and 120 L (D). Due to the rotation of the petri dish, results are, to a certain extent, time-correlated by the position of the CFU on the plate.

An allowance of 40 s for the change-over of probes was calculated for the three required changes per test. With the addition of these total two minutes, the tests could be completed in 30 min.

To document all test runs, a HD-camera (Canon EOS 5D Mark IV, Tokyo, Japan) with a wide-angle lens filmed all activities during the tests.

Particle results

Test phases

In Figures 4 and 5, the 0.5 µm particle load during the tests with ACR 20, wearing garment A and garment D, is shown as mean values of both test runs. During the start phase with no air flow and no operators in the room, the particle load decreased by sedimentation. After five minutes, an increase becomes visible, caused by the entering of two operators. At $t=10$ min, the HVAC was switched on, which led to a significant decay of particles. A nearly steady state level is reached after five minutes of HVAC operation. During the 'in operation' phase between 15 and 25 min, the particle count could be kept below 50,000/m³. In all tests with garments A–C, the operators left the room after 25 min and, by this, initialized the 'clean up' period with a further decay of particles.

In the experiments with garment D, the test personnel started running, waving, jumping, ruffling hair, tapping clothes, and similar movements after 25 min to intentionally generate a high particle and MCP load, the effects of which are visible in Figure 5.

Please review the [supplementary material \(Figures S2–S4\)](#) for details on differences between the two test runs and differences on particle counter location.

Results for different ACRs

Results shown in this section focus on the 'in operation', 'spiking', and 'clean up' phase.

0.5 µm particle measurements

Figure 6 presents the 0.5 µm particle measurement data for a typical pharma operation situation: A vented cleanroom with two operators in cleanroom garment using Tyvek[®] overalls. The differences in curves are caused by different ACRs. Nearly, all measured 0.5 µm particle counts are at, or below, 50,000/m³. The values vary slightly due to operator activities, but with the beginning of the 'clean up' period, the order of ACRs becomes visible: ACR 20 has the lowest value, followed by ACR 15, etc.

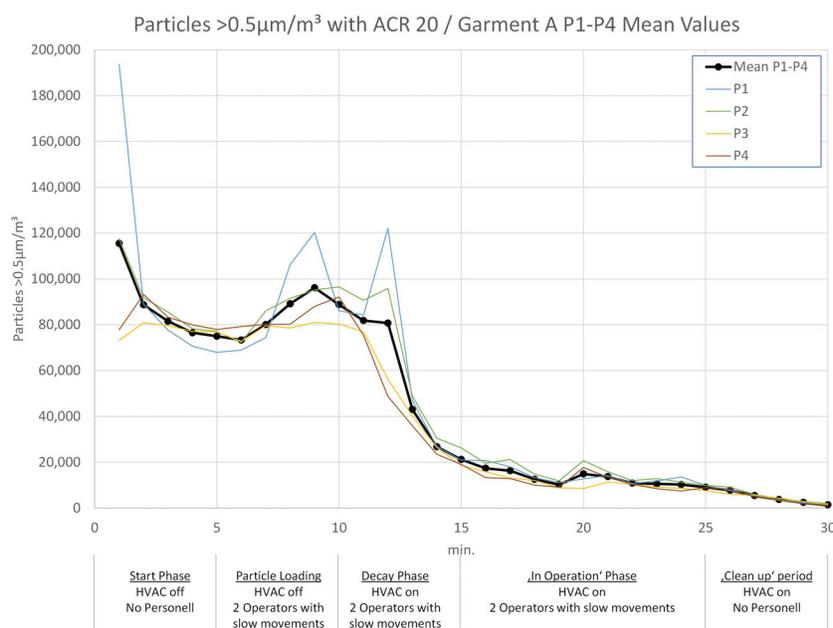


Figure 4. Phases for tests A–C.

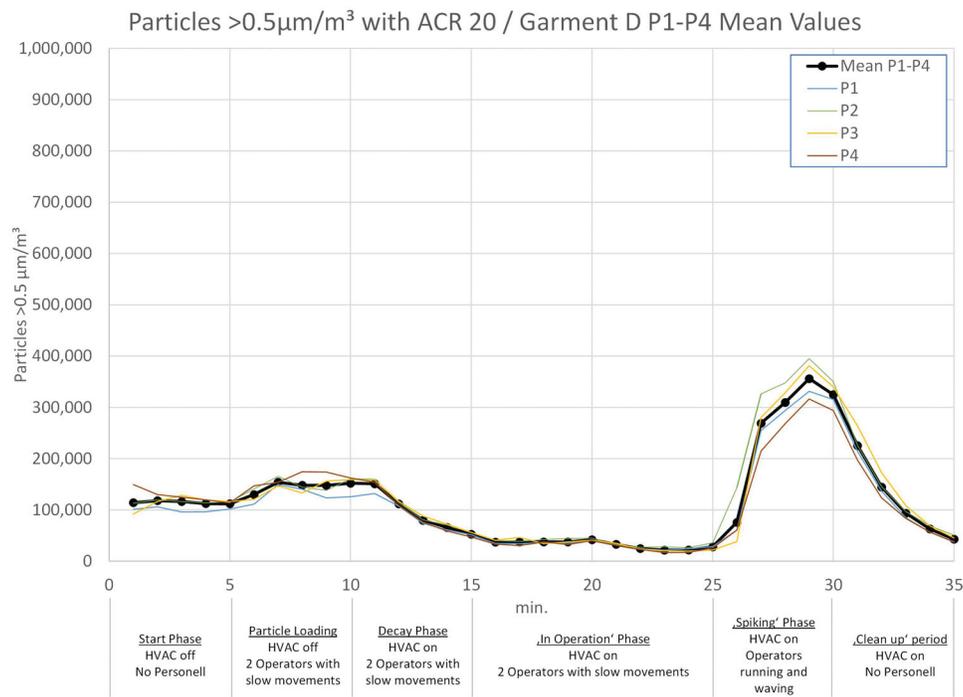


Figure 5. Phases for tests D – note the different scale on the y-axis.

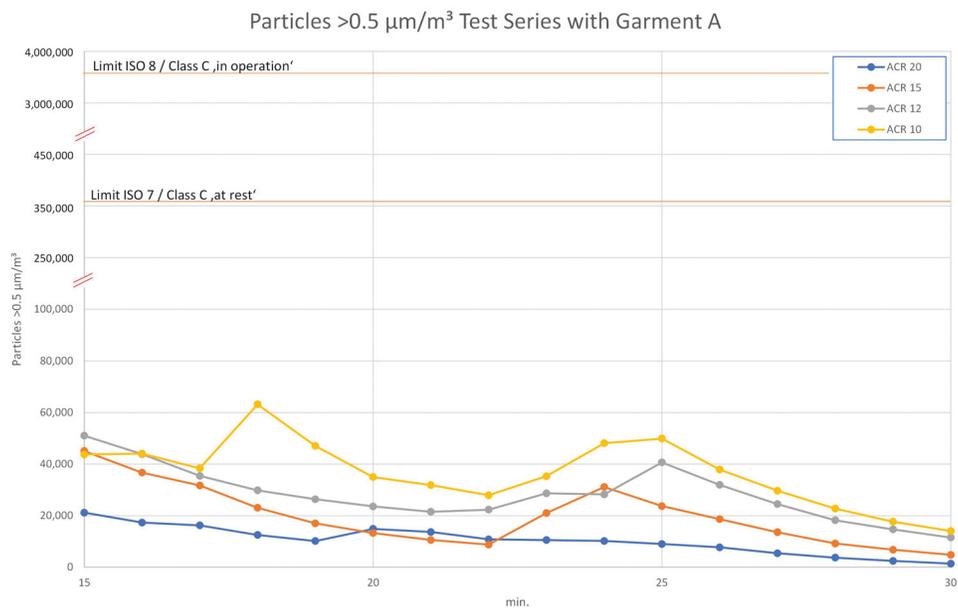


Figure 6. Results 0.5 µm particles in test series A – ‘in operation’ and ‘clean up’ period. Note the double split y-axis to enable the marking of regulatory limits and the different scale of the x-axis.

A most interesting result is the comparison with regulatory limits. The measured maximum value even with ACR 10 is approximately seven times lower than the ISO 7/Class C ‘at rest’ or Class B ‘in operation’ limits. Accordingly, the allowed ‘in operation’ is 70 times higher than the maximum values measured in these trials!

In the last test series D, the potential (bio-)contamination induced by operators was further increased by means of short clothes with T-shirt and short trousers. In addition, a five-minute spiking period with fast movements was added after the previous ‘in-operation’ period. The effects are shown in Figure 7.

While the 0.5 µm particle loads are at a comparable level with that of the test with long clothes, they boost up at the beginning of fast movements. Peak levels reach or exceed the ‘at rest’ limit of regulatory requirements and are, at ACR 20, up to 10.5 times higher than the average value during ‘the in operation’ phase. With ACR 10, the increase factor is 8.6 between the ‘in operation’ mean value and the peak of the spiking phase. Again, ‘in operation’ levels are not exceeded.

An overview of results for garments A–D during the ‘in operation’ period of 15–25 min is given in Figure 8. The particle generation with garments C and D is approximately 2–3 times higher than the particle generation with cleanroom garments.

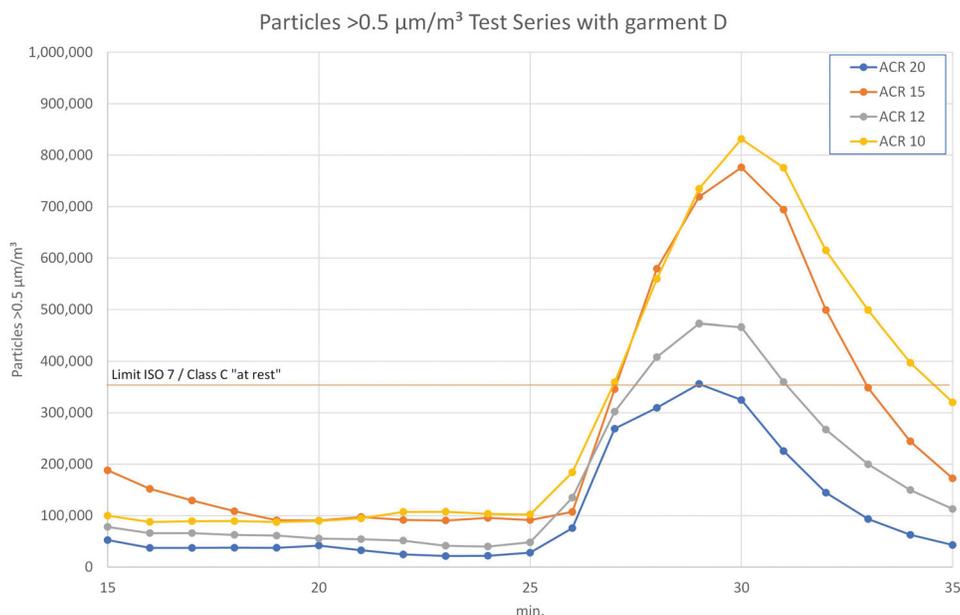


Figure 7. Results 0.5 μm particles in test series D – ‘in operation’ and ‘clean up’ period. Note the different scale on both axes.

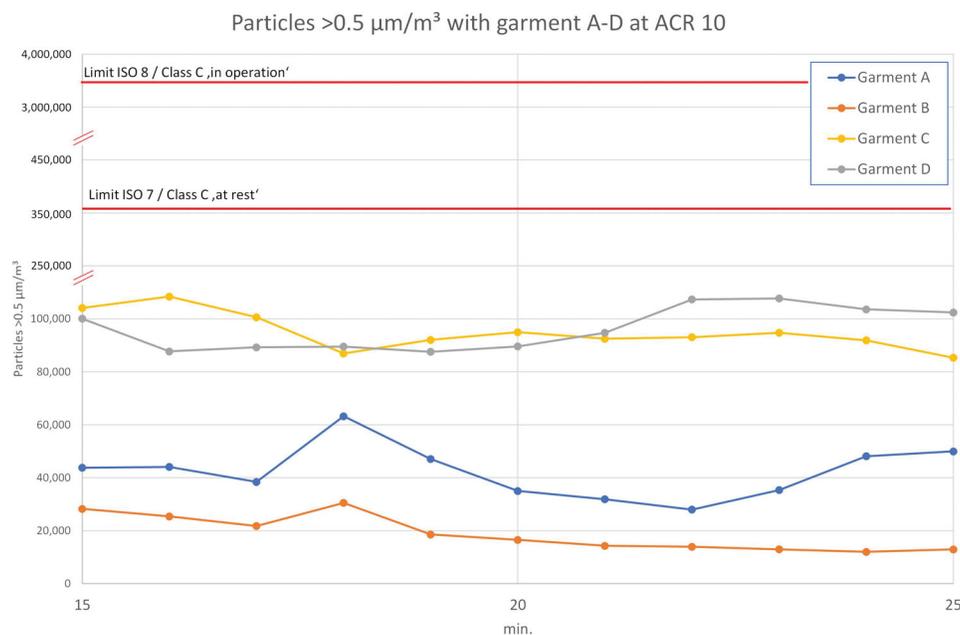


Figure 8. Garments A–D at ACR 10 ‘in operation’. Note the double split y-axis to enable the marking of regulatory limits and different x-axis.

See the review of the [Supplementary material \(Figures S5–S9\)](#) for detailed results on all garments and ACRs.

5 μm particle measurements

The second parameter of regulatory requirements is the limits given for 5 μm particles ‘in operation’ and ‘at rest’. All particle counters were set up to analyze this particle size as well.

Figure 9 shows the ‘in operation’ and ‘clean up’ period with garment A. During the measurement with ACR 15, two peaks occurred in one trial due to operator activity. For the other ACRs, the measured values were below the ‘at rest’ limits, but with a significantly smaller offset to the ‘in operation’ limits than the 0.5 μm measurements (approximately 15-fold vs. 70-fold).

Figure 10 presents the only exceedance of ‘in operation’ limit values in all conducted experiments. It could only be achieved in test series D during the spiking phase wearing short clothes. The increase of 5 μm particles is expectedly higher during this phase than with 0.5 μm particles. As the particles generated by personnel are generally larger than 0.5 μm , it was clear that the spiking phase would create more of the larger particles and, thus, more MCPs. Actually, compared to 0.5 μm particles, the increase of 5 μm particles in the spiking phase was on average 25% higher in all experiments. Though this is no surprise, it underlines the validity of the test setup.

Looking at the ‘in operation’ phase of this test, the measured 5 μm particle values are well below the limit values for all ACRs. With respect to the inadequate garment D, this is an astonishing result.

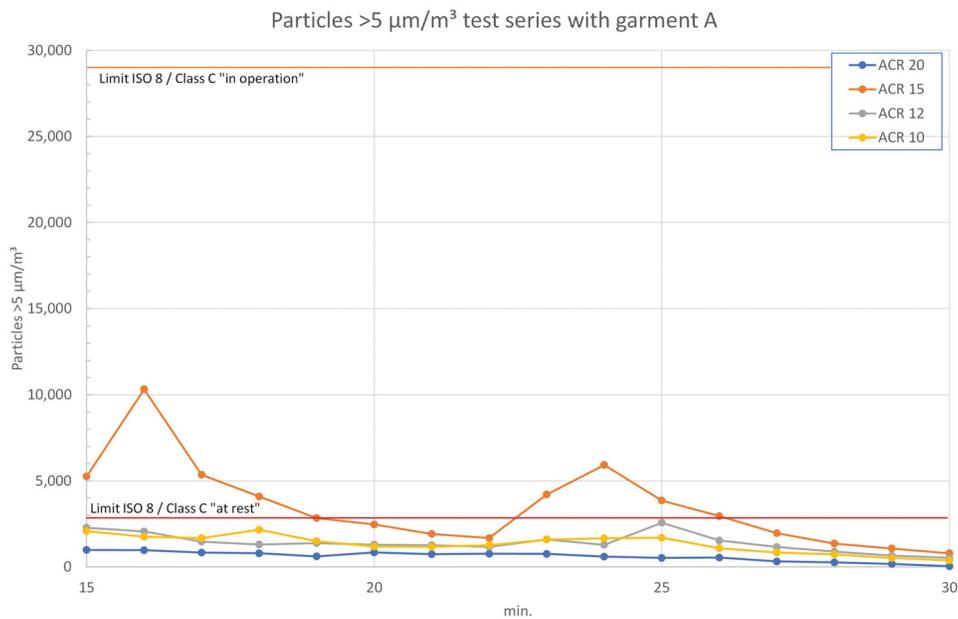


Figure 9. Results 5 µm particles in test series A – ‘in operation’ and ‘clean up’ period. Note the different scale on y-axis.

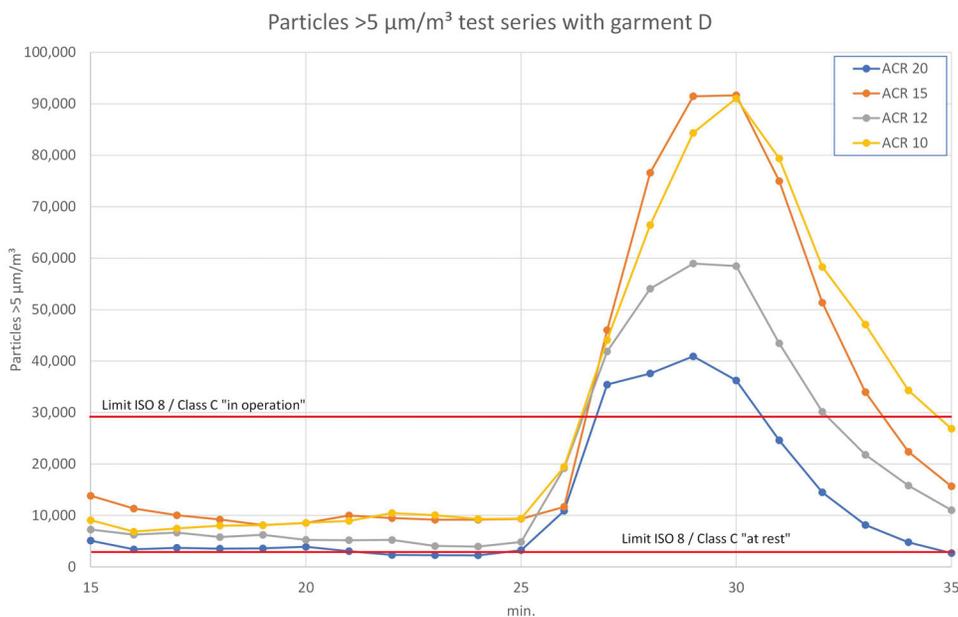


Figure 10. Results 5 µm particles in test series D (mean values) – ‘in operation’ and ‘clean up’ period.

Viable particle results

The third parameter of Annex 1 and the FDA Aseptic Guide limits is the number of CFU/m³ [2,3]. During the experiments, 90 mm TSA sampling plates as well as TSA test stripes for the RCS[®] air sampler for ‘in operation’ biomonitors at two different locations were used.

Air samplers (V1/V2)

An example for the time correlation of the ‘slit to agar’ air sampler is shown in Figure 11. This petri dish was the fourth in the test D.3.1, placed in the air sampler prior to the spiking phase, and rotating for eight minutes. A build-up of CFUs during the first five minutes, and a reduction after the operators had left the room,

can clearly be observed. Other trials with the garments A–C showed much less microbial contamination.

In Figure 12, the photograph of the four TSA plates and RCS[®] stripes from test A.3.1 after incubation is shown. A.3.1-1 represents the first seven minutes, in which the HVAC was off, and the operators were outside of the room for five minutes.

A.3.1-2 includes a 2–3 min particle loading phase (HVAC off), and a decay phase starting after 10 min (HVAC on). A.3.1-3 covers the ‘in-operation’ phase of the experiment. Five out of seven minutes with A.3.1-4 cover the ‘clean up’ period without personnel in the room.

For the ‘in operation’ period of this trial (A.3.1-3), one CFU was found on the 90 mm TSA plate, and three CFU were found on the RCS stripe. This converts to $1 \text{ CFU}/105 \text{ L} \times 1000 \text{ L} = 9.5 \text{ CFU}/\text{m}^3$ for the 90 mm TSA plate and $3 \text{ CFU}/683 \text{ L} \times 1000 \text{ L} = 4.4 \text{ CFU}/\text{m}^3$ for

the RCS® stripe. With the recommended limit of 100 CFU/m³, a total count of 10 CFU/plate or 68 CFU/stripe would be within the regulatory expectation.

The results of total CFU count during the ‘in operation’ phase of all tests at viable particle counter 1, located low inside process unit (V1) and viable particle counter 2, located high inside process unit (V2) are given in Table 4. In comparison with V1, the CFU counts at V2 were often lower. Series A and B are at the same level, whereas a significant increase is observed for C and D. Only two results at V1 (D.2 and D.4) exceeded the allowed limit.

See the review of the Supplementary material (Tables S3 and S4) for all ‘in operation’ microbial count results.

Settle plates (SP1/SP2)

Settle plates were laid out at SP1 (floor) and SP2 (table) for four hours each during the complete test period. It was expected that an increase of CFU could be observed from test series A to D. In fact, this expectation was confirmed, as presented in Table 5.

The intentional generation of CFUs during the spiking phase of series D shows its success in the high values on the morning of the third test day. The sampling plate on the table at SP2 could not be analyzed due to its huge number of MCPs that settled on that plate (see picture in Table 5). The SPs of the 3rd day morning were the only ones which exceeded the allowed limit on 50 CFU/4 h.

Discussion

Particles

Two general observations are made from the results of the particle measurement:

1. The Annex 1 Class C ‘in operation’/ISO 8 limits for 0.5 μm particles were not exceeded in any of the executed tests. In fact, all measured values for this particle size were even below Class B ‘in operation’/ISO 7 limits.
2. For 5 μm particles, the limits were only exceeded due to fast and heavy, thus, inadequate movements of the operators.

During the ‘in operation’ phase of the tests with garment A at ACR 10, the offset between regulatory limit values and measured particles/m³ was 83-fold for 0.5 μm particles, and 18-fold for the 5 μm particles. The study design stipulated two operators in the cleanroom of 38.4 m², which is a typical man load for an operational room of this size in the pharmaceutical industry. Loomans et al. studied the influence of the number of operators in a cleanroom and found that the first three persons have the biggest effect on the particle load [14]. The increase of particle generation

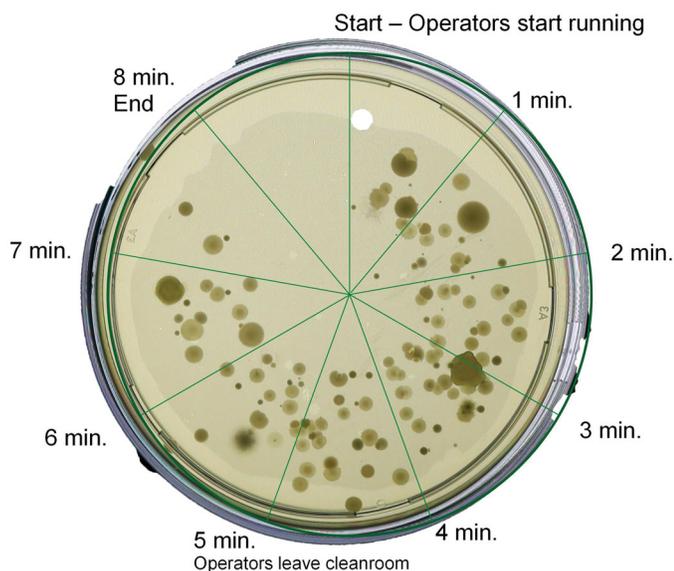


Figure 11. 90 mm TSA sampling plate during spiking phase of D.3.1 at V1.

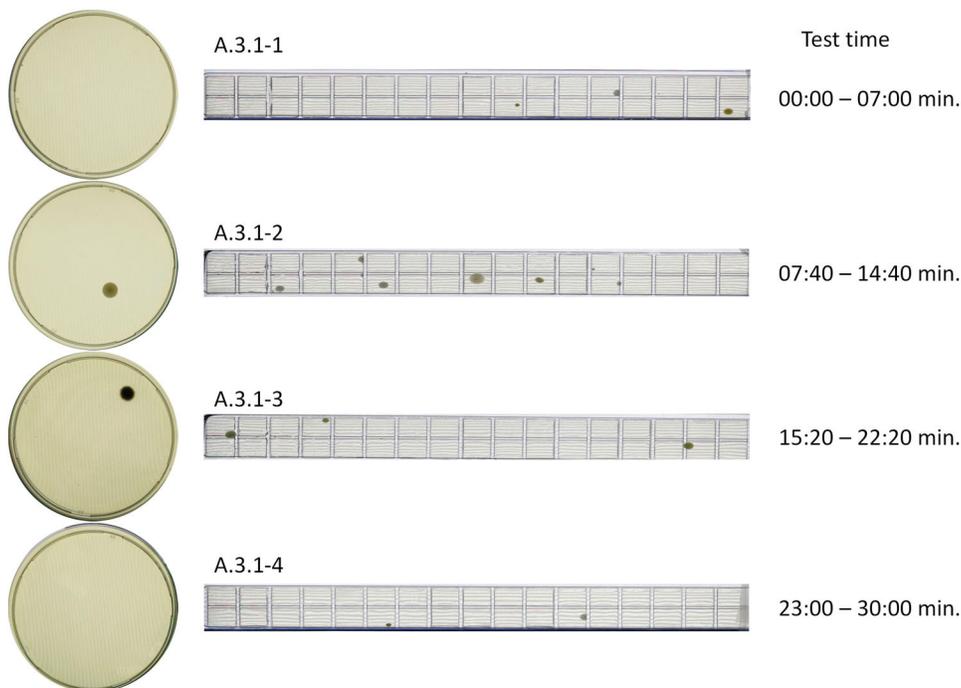


Figure 12. Microbial air sampling results on 90 mm TSA plates and RCS® stripes for test A.3.1.

Table 4. Results for microbial air sampling during 'in operation' (limit value: 100 CFU/m³).CFU/m³ 'in operation' at positions V1 + V2

Garment	Test series ACR							
	1 20 h ⁻¹		2 15 h ⁻¹		3 12 h ⁻¹		4 10 h ⁻¹	
	Mean V1	Mean V2						
A ISO 8 Cleanroom Overall	5	2	19	2	5	3	0	3
B ISO 9 Fabric Overall	5	1	0	2	5	1	10	6
C Street Clothes	33	27	57	15	53	18	38	39
D Short Clothes	58	54	113	73	96	87	129	59

Table 5. CFUs on 4 h settle plates at position SP1 and SP2 (limit value 50 CFU/4 h).

4 h sampling on TSA settle plates	CFU on SP1	CFU on SP2
1 st Day Morning (Test Series A)	0	2
1 st Day Afternoon (Test Series B)	2	0
2 nd Day Morning (Test Series B/C)	2	16
2 nd Day Afternoon (Test Series C/D)	17	32
3 rd Day Morning (Test Series D)	96	Not countable



from two to three operators has a factor of approximately 2. Applying this to the given experiments, even the addition of another person would still not put a risk on the cleanroom cleanliness status from a regulatory point of view.

In single experiments, some peak loads of particles at certain points occurred. With the help of a video evaluation, these peaks could be traced back to one of the following events:

- The disinfection of hands prior to the biomonitoring probe changeover using an aerosol spray bottle: though this was mostly done at the table close to the outlet air grid in the back of the process unit, the effect was observed from the operators on the particle counter displays. This is, however, a good indication of the homogenous air distribution caused by the swirl diffusers which was also shown by Whyte et al. [26] and Lenegan [27]. Given the airflow direction from the inlet to the outlet air grids, an aerosol particle movement against the general air flow direction to one of the particle counters would else not be possible. Yet, to avoid this unwanted effect on particle counters, the practice of hand disinfection was changed to a fluid immediately after this observation.
- The changeover of biomonitoring plates and stripes: the RCS[®] air sampler (V2) was located on the process unit vessel at eye height, while the particle counters P1 and P2 were below that level in the same unit. It could be observed that the particle loads increased regularly every 7–8 minutes, which was exactly the time of biomonitoring change (Figures 6 and 9). The manual handling on the air sampler obviously caused the particle generation that was afterwards detected by the particle counters.
- Differences in test results may also have been caused by the operators themselves. Three persons conducted the

experiments with always two in the room, while the third paused. Thus, no subsequent experiments were performed with the same combination of operators. Different garment fabric of the individual persons' clothes, for example, cotton vs. linen shirt, could then lead to a different particle generation with garments C and D, especially during the spiking phase.

The analysis of mean values from the 'in operation' period (15–25 min), as given in Table 6, confirms the expectation that a higher airflow leads to lower particle counts in a cleanroom. However, as mentioned before, the absolute level of contamination compared to the allowed limits is very low and makes differences between ACR 10 and ACR 20 neglectable. The achieved values in garment A at ACR 10 would still enable the room to operate even under Class B/ISO 7 conditions.

Comparing the best case scenario of garment A/ACR 20 with the worst case garment D/ACR 10 in a bar chart, makes the huge offset between measured values and regulatory limits for ISO 8/Class C visible (Figure 13).

Viabiles

The expectations of this study with regard to viable particles have generally been fulfilled. It is shown that a better garment and a higher airflow lead to less biocontamination. A surprise is the good result of the porous garment B when compared to the tight garment A.

Furthermore, a correlation of 5 µm particle values and MCPs can be observed for example in experiment A.2. This is in line with the study results of Parat, who also found correlations between bacterial and particle counts [28,p.951].

In test series C and D, the number of CFUs was sometimes below the value that was found in the previous experiment with a higher ACR. This is surprising, as a higher airflow is expected to be more efficient in MCP removal. It is assumed that this effect is caused by the chosen test sequence. As the operators wore the same clothes during all experiments at one day, the number of airborne particles and MCP was expectably higher in the first test, and then continuously decreased as the number of loose particles on the operators clothes declined throughout several tests. The same principle applies to surface bacteria on the skin.

The position of the air samplers also influences the results. As MCPs have a size of >1 µm, they are also more affected by sedimentation, as studied by Whyte and Agricola [29]. The low position of V1 supports the ability to detect these sedimenting viable particles. In contrast, the high position of V2 might not collect a representative sample of all airborne viable particles, as heavier MCPs might not find their way into the RCS® probe head.

In terms of measurement accuracy, a disadvantage of the relatively short sampling time, resulting in low air sampling volume of the ImpactAir® Iso-Con Slit-to-Agar Microbial Air Sampler, became visible. For example, in test A.2.1, only two CFUs were found on

the sample plate. Calculating the equivalent value for CFU/m³ based on the sampling volume of 15 L/min, the result is 19 CFU/m³. This is a big lever of 1:9.5 when applied to the study setup. Usually, this type of air sampler is used for longer sampling periods and, thus, higher sampling volumes.

Study limitations

This experimental study was designed to be as close as possible to real pharmaceutical operations. However, some limitations still apply: in real pharmaceutical operations, a room of similar size the rooms might be equipped with more or bigger machines than the study room. The number of interior items in the test room was probably less than in real operational rooms with more cupboards, desks, and equipment. Depending on the type of additional equipment (particle generating or not), this could have a positive or negative effect on the overall particle and MCP load. During the engineering of a room, the ACR demand is calculated according to the total volume of the room, without equipment. Any additional non-particle generating equipment placed in that room will reduce the free volume of the room and thereby increase the ACR. Instead, additional particle-generating equipment could increase the demand of air flow to remove particles or heat.

Some real process equipment will have a higher heat generation than the process unit used for this experimental study. During the experiments, the temperature difference from beginning to end in the room was approximately 3 K. Other (heated) process equipment might have a bigger influence on room temperature, which then requires a higher ACR to remove thermal energy, if other cooling sources are not available.

A combination with DCF strategies was not analyzed in this study. The (unintentional) deactivation of the HVAC system after room preparation prior to the start of the experiments led to higher particle values on the first day, rather than comparable measurements on the second day with an overnight low-level HVAC operation. This, on one hand, indicates the need for a continuous HVAC operation, on the other hand it supports the results

Table 6. 'In operation' phase 0.5 µm particle load.

Garment	Average 0.5 µm particle concentration at P1–P4 during 'in operation' phase (15–25 min) (Mean values × 10 ³ particles/m ³)			
	Test series ACR			
	1 20 h ⁻¹	2 15 h ⁻¹	3 12 h ⁻¹	4 10 h ⁻¹
A	13.3	23.8	32	42.2
ISO 8 Cleanroom Overall				
B	29	15.3	26.7	18.8
ISO 9 Fabric Overall				
C	32.9	35	33.8	95
Street Clothes				
D	34	111.5	56.9	96.3
Short Clothes				

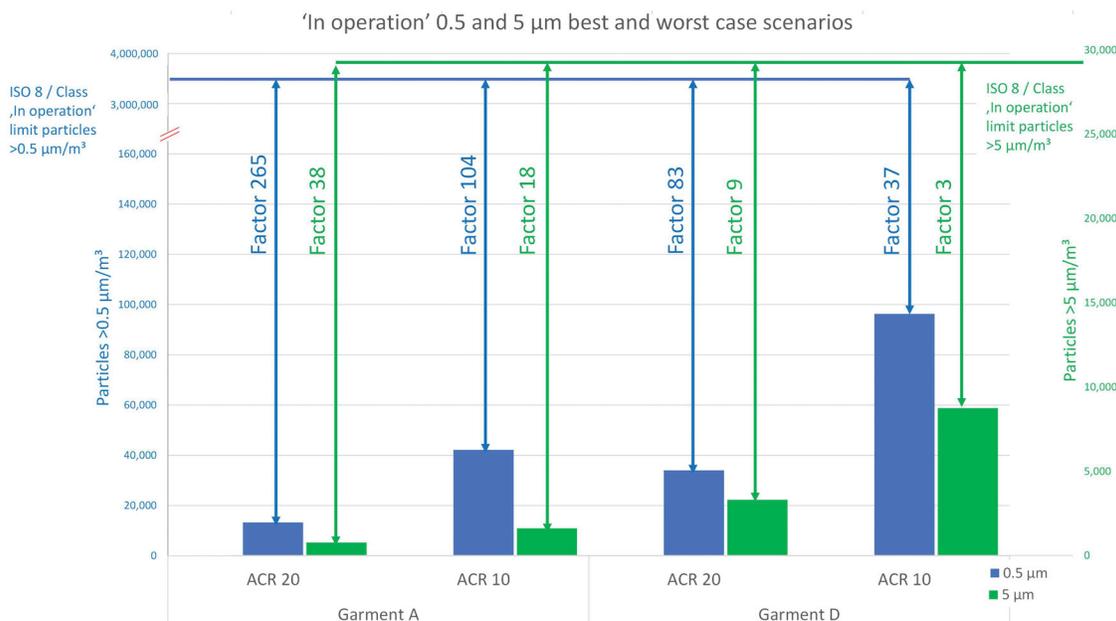


Figure 13. Offset between measured values and regulatory limits.

of other scientists who found that DCF is a very good possibility for the reduction of energy demand [11,15,30,31].

Two of the four particle counters were placed within the process unit. As this is the critical area of sterile operations, these positions were chosen on purpose. As in much other process equipment, a pump with an attached motor operated within that unit. The motor fan generated a disturbance of the air flow originally initiated by the HVAC system. This might have interfered with the measured values of the particle counters located close to the motor. Yet, with the observed differences between all four particle counters, this effect, if at all, was obviously very small.

Conclusion

Based on these study results, the given research question ‘Which minimum value of an ACR is required to meet the regulatory expectations for the “in operation” status in a pharmaceutical ISO 8/Class C cleanroom?’ can clearly be answered with ACR 10. Higher ACRs may apply for other process conditions, e.g. equipment heat generation. This study, in combination with other scientific work, provides evidence that the FDA’s recommendation of ACR 20 for Class 100,000 (ISO 8) supporting rooms can be regarded as being outdated [8,19–21,32].

Moreover, the given limit values for Class C ‘in operation’/ISO 8 conditions should be reviewed by all regulatory agencies. The results of this study revealed a tremendous difference between regulatory limits and actually measured values – even in a non-cleanroom appropriate garment. The high offset between measured and required values creates a huge safety buffer, which may cover up other cleanroom operation problems. This is similar to the ‘sea of inventory’ principle in operations management as described by Slack et al. [33]: a higher storage inventory might avoid potential delivery problems, but it also masks the problems itself. This impedes actual problem detection and problem solving. A better way would be to lower the limit values to enable problem surfacing. As a result of this study, a re-definition of requirements for Class C limit values should be considered by regulatory agencies with the following parameters:

1. No requirement or recommendation for minimum ACRs.
2. Reduction of Class C limit values for $0.5 \mu\text{m}$ ‘in operation’ particles from 3,520,000 to 352,000 (factor 10).
3. Reduction of Class C limit values for $5 \mu\text{m}$ ‘in operation’ particles from 29,000 to 14,500 (factor 2).
4. Reduction of Class C air sample limit values from $100 \text{ CFU}/\text{m}^3$ to $50 \text{ CFU}/\text{m}^3$ (factor 2).

With these measures, the current good manufacturing processes within the sterile manufacturing industry would not be affected significantly. Hidden problems would surface and could then be effectively treated.

Provided appropriate GMP control, the proposed limits could easily be achieved with an ACR of 10, which would meet the demands for the particle and MCP load, as well as for the required clean-up period time of a maximum of 20 min.

A 50% reduction of the ACR could save 25–30% energy due to reduced air fan power, heating, cooling, and humidification [8]. Bisecting the widely used ACR of 20 h^{-1} to an actual scientifically based value of 10 h^{-1} would therefore significantly reduce the energy demand of HVAC systems in the pharmaceutical industry.

Acknowledgements

The authors express special thanks to Testo Industrial Services, Kirchzarten, Germany and PMT, Heimsheim, Germany for the provision of rooms, equipment, and personnel.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The author(s) reported there is no funding associated with the work featured in this article.

ORCID

Detlef Behrens  <http://orcid.org/0000-0003-1686-4228>

References

- [1] European Commission. Volume 4 – Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines; 2021 [Internet] [cited 2021 Jan 26]. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_de
- [2] European Commission. Annex 1: manufacture of sterile medicinal products (corrected version); 2009. Brussels, Belgium.
- [3] Food and Drug Administration. Sterile drug products produced by aseptic processing – current good manufacturing practice. Rockville (MD); 2004.
- [4] European Commission. Annex 1 draft 2020 – manufacture of sterile medicinal products. Brussels, Belgium; 2020 [Internet] [cited 2021 Jan 26]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/gmp/2020_annex1ps_sterile_medicinal_products_en.pdf
- [5] DIN EN ISO. ISO 14644-1 cleanrooms and associated controlled environments–part 1: classification of air cleanliness by particle concentration. Berlin: Beuth; 2021.
- [6] Whyte W. The application of the ventilation equations to cleanrooms – part 2: decay of contamination. Clean Air Contain Rev. 2014;20:4.
- [7] World Health Organization. WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations: forty-fifth meeting report. (technical report series). Geneva: World Health Organization; 2011.
- [8] Fedotov A. Saving energy in cleanrooms. Cleanroom Technol. 2014;22:14.
- [9] Tschudi W, Benschine K, Fok S, et al. Cleanroom energy benchmarking in high-tech and biotech industries. Berkeley (CA): Lawrence Berkeley National Lab; 2001.
- [10] Tschudi W, Mills E, Xu T, et al. Measuring and managing cleanroom energy use. Berkeley (CA): Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory; 2005.
- [11] Faulkner. Energy savings in cleanrooms from demand-controlled filtration. J Inst Environ Sci. 1996;39:21.
- [12] Tschudi W. Cleanroom energy benchmarking results. ASHRAE Trans. 2002;109:733.
- [13] Molenaar P. Ventilation efficiency improvement in pharmaceutical cleanrooms for energy demand reduction. Eindhoven: Eindhoven University of Technology; 2017.

- [14] Loomans M, Molenaar P, Kort H, et al. Energy demand reduction in pharmaceutical cleanrooms through optimization of ventilation. *Energy Build.* 2019;202:109346.
- [15] Loomans M, Ludlage T, van den Oever H, et al. Experimental investigation into cleanroom contamination build-up when applying reduced ventilation and pressure hierarchy conditions as part of demand controlled filtration. *Build Environ.* 2020;176:106861.
- [16] VDI. VDI 2083 part 4.2: cleanroom technology: energy efficiency. Berlin: Beuth; 2011.
- [17] ISPE. Baseline pharmaceutical engineering guide: volume 3: sterile product manufacturing facilities. 3rd ed. Tampa (FL): ISPE; 2018.
- [18] ISPE. Baseline pharmaceutical engineering guide: volume 3: sterile product manufacturing facilities. 2nd ed. Tampa (FL): ISPE; 2011.
- [19] Sun W, Mitchell J, Flyzik K, et al. Development of cleanroom required airflow rate model based on establishment of theoretical basis and lab validation. *ASHRAE Trans.* 2010;116: 87.
- [20] Behrens D, Bachhofer J, Zipp B, et al. Abreicherung von partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Pt.1 [Decrease of particles in cleanrooms in dependency of air-change-rate]. *Technopharm.* 2020;10:284–288.
- [21] Behrens D, Bachhofer J, Zipp B, et al. Abreicherung von partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Pt.2 [Decrease of particles in cleanrooms in dependency of air-change-rate]. *Technopharm.* 2021;11:94–99.
- [22] Merck M. Tryptic soy agar + LTHTh-ICR: technical data sheet [Internet]. Darmstadt; 2019 [cited 2021 Apr 19]. Available from: www.merckmillipore.com/biomonitoring
- [23] Merck M. Hycon® agar strips TSM: technical data sheet [Internet]. Darmstadt; 2018 [cited 2021 Apr 19]. Available from: www.merckmillipore.com/biomonitoring
- [24] Merck M. RCS® High flow touch: microbial safety at your fingertips [Internet]. Darmstadt; 2021 [cited 2021 Apr 19]. Available from: www.merckmillipore.com/biomonitoring
- [25] Pinpoint Scientific. ImpactAir_IS0-90_Brochure [Internet]. Bridgend (UK); 2020 [cited 2021 Feb 23]. Available from: https://www.pmtgb.com/fileadmin/Datasheets_UK/ImpactAir_IS0-90_Brochure.pdf
- [26] Whyte W, Hejab M, Whyte WM, et al. Experimental and CFD airflow studies of a cleanroom with special respect to air supply inlets. *Int J Vent.* 2010;9(3):197–209.
- [27] Lenegan N. Diffuser performance. *Clean Air Contain Rev.* 2014;18:8.
- [28] Parat S. Contribution of particle counting in assessment of exposure to airborne microorganisms. *Atmos Environ.* 1999; 33(6):951–959.
- [29] Whyte W, Agricola K. Comparison of the removal of macro-particles and MCPs in cleanrooms by surface deposition and mechanical ventilation. *Clean Air Contain Rev.* 2018;35: 4–10.
- [30] Ludlage T. Optimizing energy demand during the non-operational hours in a cleanroom. Eindhoven: Eindhoven University of Technology; 2019.
- [31] Molenaar P, Loomans M, Joosten P, et al. Demand controlled filtration, a high potential energy savings measure for cleanrooms? *REHVA J.* 2019;2019:54–57.
- [32] Birks S. Opinion ACRs – time for change? *Cleanroom Technol.* 2013;21:23.
- [33] Slack N, Chambers S, Johnston R. Operations management. 6th ed. Harlow (UK), New York (NY): Financial Times Prentice Hall; 2010.

Article

Application of Biofluorescent Particle Counters for Real-Time Bioburden Control in Aseptic Cleanroom Manufacturing

Detlef Behrens ^{1,*}, Jens Schaefer ² , Cornelia M. Keck ²  and Frank E. Runkel ^{2,3}¹ Research Campus of Central Hesse (Forschungscampus Mittelhessen (FCMH)), 35390 Giessen, Germany² Philipps-University, 35037 Marburg, Germany³ Justus-Liebig University, 35390 Giessen, Germany

* Correspondence: behrensd@staff.uni-marburg.de

Abstract: This experimental study examines the use of a real time viable particle counter in pharmaceutical cleanroom operations under ISO class 8/Annex 1 Class C ‘in operation’ conditions. The used measuring system, a Biofluorescent Particle Counter (BFPC), continuously detected particles >1.0 µm as well as microbe carrying (viable) particles (MCPs). In addition, classic air samplers for the evaluation of Colony Forming Units (CFU) were installed to enable a comparison of counter-provided values with classic, agar-based methods of microbial air sampling required by regulatory guidelines. A test room comparable to typical cleanrooms in the pharmaceutical industry was operated under three different air change rates (ACR). At these ACRs, the operators wore three different garments. With test repetition, 18 experiments were conducted simulating different pharmaceutical process conditions. The results show correlations of measured particles to MCPs and MCPs to CFUs. Furthermore, albeit an industry-wide used and regulatory accepted minimum ARC value of 20 h⁻¹, the study results indicate that an ACR of 10 h⁻¹ is capable of keeping cleanrooms within regulatory limits for particles and CFUs, and thus provides the opportunity to save energy for cleanroom operations. The implementation of real time viable particle counters can be used to achieve a quality advantage for ISO class 8 cleanrooms for a continuous, documented control of the cleanroom status, and thus enable a reduction of ACRs with the aim of energy saving. Further long-term studies should validate this.

Keywords: Biofluorescent Particle Counter (BFPC); real time viable particle counter; air change rate; ISO 8; Class C; energy saving; pharmaceutical production; cleanroom ‘in operation’; annex 1; aseptic guide



Citation: Behrens, D.; Schaefer, J.; Keck, C.M.; Runkel, F.E. Application of Biofluorescent Particle Counters for Real-Time Bioburden Control in Aseptic Cleanroom Manufacturing. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 8108. <https://doi.org/10.3390/app12168108>

Academic Editor: Ki-Hyun Kim

Received: 24 June 2022

Accepted: 10 August 2022

Published: 12 August 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since 2009 continuous microbial monitoring systems for cleanrooms have been available [1,2]. Although these real-time viable particle counters, also described as Biofluorescent Particle Counters (BFPC), provide significant advantages in the detection of bioburden sources, their use for continuous control of microbe carrying particles (MCPs) in the pharmaceutical industry is low [3]. This has its cause in non-existing regulatory MCP limits for this type of measurement technology.

The control of the cleanroom status in aseptic pharmaceutical manufacturing is regulated by good manufacturing practice (GMP) guidelines [4,5]. Specific limit values are given for airborne particles as well as colony forming units (CFU) per cubic meter or cubic foot of air. For example, the limit value for CFUs in operational cleanrooms of ISO class 8 must not exceed 100 CFU/m³ of air.

To supply clean conditioned air for cleanrooms in aseptic manufacturing by means of heating, ventilation and air conditioning (HVAC) systems, large amounts of energy are required [6–9]. As this not only generates costs, but also has a negative impact on the CO₂-footprint of the company, manufacturers are in a dilemma: On one hand they need to supply the required amount of air into the production area with a certain safety buffer to

avoid deviations from cleanroom specifications, on the other hand they are faced with the need to save energy as much as possible. A reduction of the air change rate (ACR) would be a possible approach, as various studies have shown [7,10,11].

While particles of various sizes can be detected in real time with commonly used laser particle counters, the regulatory accepted detection of CFUs, using microbial air samplers (MAS) with agar plates or strips, requires subsequent incubation for several days before results are available. This time lag puts manufacturers at risk. If the results are unexpectedly high, the produced batches may be contaminated, and as the production is finished by this time there is no chance to avoid that. As a consequence, manufacturers are still reluctant to reduce air change rates [1], as they would have to rely on particle count only for cleanroom control until CFU results are available. This is despite a good correlation between airborne particles and microorganisms [12]. BFPCs could help to close that gap and offer continuous control of airborne microorganisms.

From the authors' experience, the largest areas in sterile pharmaceutical production facilities are the preparation and supporting areas for product manufacturing prior to sterile filtration and filling. These preparation areas require a Class C environment according to the EU GMP-guide Annex 1, and ISO 8 (Class 100,000) according to the FDA aseptic guide [4,5]. In the same guide, the FDA states: 'Air change rate is another important cleanroom design parameter. For Class 100,000 (ISO 8) supporting rooms, airflow sufficient to achieve at least 20 air changes per hour is typically acceptable' [5]. Though this is not a strict regulatory expectation, many pharmaceutical companies apply the value of 20 h^{-1} as the minimum required ACR for their aseptic preparation and supporting areas. Recent studies have shown that the regulatory 'in operation' limits for particles and CFUs can be achieved with a significantly lower ACR of 10 h^{-1} [10,13,14]. Other studies recommend demand controlled filtration (DCF) with ACRs of 4 h^{-1} during 'at rest' times of the cleanroom to save energy [15–17]. However, with a reduced ACR, the risk of an undetected exceedance of the bioburden increases. In order to control this risk, the continuous monitoring of not only particles but also the number of MCPs in the cleanroom air by use of real-time viable particle counters, could be highly beneficial. This would enable an immediate detection of an increased bioburden, and the ability to react accordingly. By this, it would enable ACR reduction and DCF without enhancing the risk of undetected exceedance of bioburden limits.

BFPC systems work using a laser-induced fluorescent principle [18]. Other than classic laser particle counters, which detect and classify particles by scattered light analysis, a BFPC also measures the wavelength of the scattered light. Substances found in all microorganisms (bacteria and fungi) are dipicolinic acid, nicotinamid adenine dinucleotide (NADH), and riboflavin [19–21]. They create a fluorescent signal that can be detected by the device. The different wavelengths distinguish viable particles from others. However, 'dead' microbes are detected, as they also contain these substances [22].

One drawback of the measuring principle is the potential for false detection. Some substances, which do not belong to the group of viable particles, still cause a fluorescent signal in the BFPC, and are thus detected as viables. One of these substances is 2-propanol, which is widely used in aseptic manufacturing for disinfection purposes. The effect of a false MCP detection by the use of 2-propanol has been observed in previous studies [19,23].

A direct comparison of BFPC-measured values with CFUs counted on agar plates or strips is hardly possible, as described by several scientists [19,24–26]. The reason for this is the dependency on possible growth on agar plates with CFU methods. However, not all microbes will grow on agar, and standard methods for incubation do not support the growth for all microbes. For this reason, the measured values of BFPC systems are typically much higher than the values measured by conventional microbial tests. This is, in fact a big advantage of the BFPC systems, as an immediate overall MCP result can be obtained and knowledge of the general bioburden status of a cleanroom can be provided. Though the specific species of microbes is not known at this point, this is still valuable not only during pharmaceutical operations, but also for an evaluation of the operational readiness

of a cleanroom in preparation for commissioning and qualification [25]. It would minimize the time required for finding bioburden leaks in the cleanroom installation [2,19,27]. A detriment is that industry-wide recommended action limits for MCPs measured by BFPC systems are not available yet [22].

Consequently, the derived research question for this experimental study is: can BFPC systems be used to enable minimized ACRs with the aim of saving energy without compromising on cleanroom air quality, and what can be an appropriate action limit for MCPs? This question led to a study design with three different ACRs combined with three different cleanroom conditions with regard to operator garments and behavior.

2. Materials and Methods

2.1. Study Setup and Test Design

Nine different test setups were chosen for a cleanroom ‘in-operation’ in which the type of garments and the number of air changes per hour were varied. The three different garments are shown in Figure 1.

I8G: ISO 8 garment: Single use Tyvek®-cleanroom-overall, overshoes, hairnet, face mask, gloves

I9G: ISO 9 garment: Single use fabric cleanroom-overall, overshoes, hairnet, face mask, gloves

NCG: Non-Cleanroom-Garment: Shorts, T-Shirt, face mask, and gloves

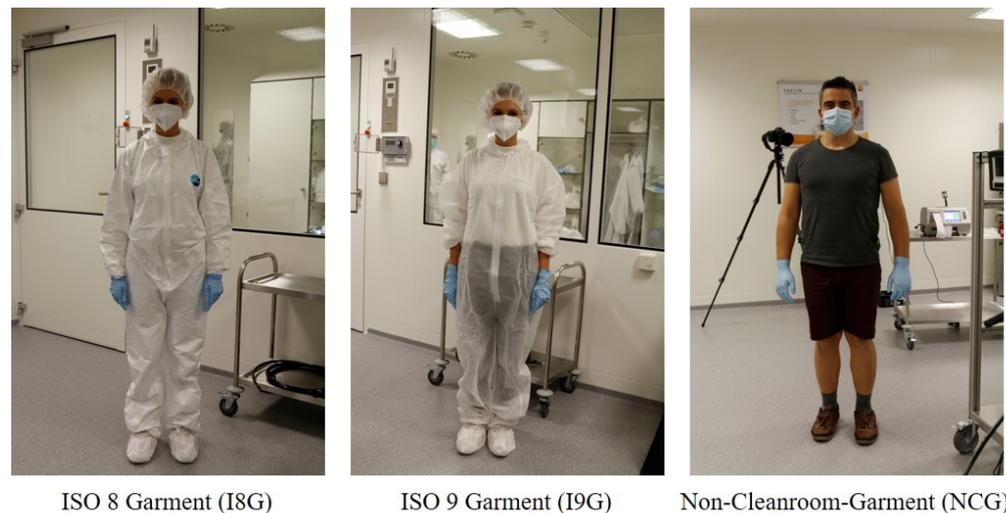


Figure 1. Different garments used during the experimental study.

All three garments were combined and tested with three different air change rates:

1. ACR 20 h⁻¹
2. ACR 15 h⁻¹
3. ACR 10 h⁻¹

Each combination was run twice. Thus, 3 garments × 3 ACRs × 2 runs/test = 18 runs were executed. The test sequence and setup are listed in Table 1.

Table 1. Test Sequence and Setup.

Test Sequence and Setup		
Preparation Day Cleaning & Disinfection		
Test No.	ACR	Garment
	1st Day	
Test 1	20 h ⁻¹	I8G
Test 2	20 h ⁻¹	I8G
Test 3	15 h ⁻¹	I8G

Table 1. Cont.

Test Sequence and Setup		
Preparation Day		
Cleaning & Disinfection		
Test No.	ACR	Garment
Test 4	15 h ⁻¹	I8G
Test 5	10 h ⁻¹	I8G
Test 6	10 h ⁻¹	I8G
Test 7	20 h ⁻¹	I9G
2nd Day		
Test 8	20 h ⁻¹	I9G
Test 9	15 h ⁻¹	I9G
Test 10	15 h ⁻¹	I9G
Test 11	10 h ⁻¹	I9G
Test 12	10 h ⁻¹	I9G
Test 13	20 h ⁻¹	NCG
Test 14	20 h ⁻¹	NCG
3rd Day		
Test 15	15 h ⁻¹	NCG
Test 16	15 h ⁻¹	NCG
Test 17	10 h ⁻¹	NCG
Test 18	10 h ⁻¹	NCG

For the cleanroom garments I8G and I9G a 30-min test design was executed with all ACRs. In this time frame, the activities for each run were carried out as shown in Table 2:

Table 2. Test Phases for I8G/I9G.

0–5 min	6–10 min	11–15 min	16–25 min	26–30 min
Start Phase	Particle Loading	Decay Phase	‘In Operation’ Phase	‘Clean up’ Phase
HVAC off No operators	HVAC off Two operators moving slowly	HVAC on Two operators moving slowly	HVAC on Two operators moving slowly	HVAC on No operators

With this test design a controlled build-up and decay of particles and MCPs was intended. In the start phase, the HVAC was off. The BFPC and Microbial Air Samplers (MAS) were started, and the operators left the room for 5 min. As no particles and MCPs could be emitted by personnel, it was expected that in this phase the BFPC count would be constant or would marginally decrease by particle sedimentation. After five minutes the operators came back into the room, and moved in a slow, cleanroom-adequate manner. Since the HVAC was still off, particles and MCPs released by the operators would increase the detection level of the measuring instruments (particle loading phase). After 10 min, the HVAC was switched on, and in a 5-min decay phase a reduction of particles and MCPs was expected to be seen at a different velocity, depending on the ACR. Between 16 min and 25 min test time the ‘in operation’ phase progressed. A steady state of particle and MCP-load was anticipated in a balance of operator emissions, and contamination continuously removed by the HVAC-system. The test ended with a 5 min ‘clean up’ phase in which no personnel were present. A decay of particles and viables was expected by HVAC operation. The term “clean-up’ period’ is defined in EU Annex 1 [4] as the time after completion of operations to allow the room to reach the ‘at rest’ status with lower regulatory limits for particles/m³. Total experiment time for I8G and I9G was 30 min.

With NCG, a 5-min ‘spiking phase’ was added between 26 and 30 min in which the operators behaved with uncharacteristic movements for cleanroom personnel. An intentional high generation of particles and MCPs was achieved by fast moving and

waving by the operators. After this phase the personnel left the room and the 5-min ‘clean up’ phase concluded until the test ended after 35 min.

The tests were conducted on three subsequent days with one preparation day before.

2.2. Cleanroom and Equipment

For this experimental study, a training room at Testo Industrial Services in Kirchzarten, Germany, was used. The room is designed with a Class C/ISO 8 finish with pharma grade floors, walls, doors, and ceilings. A variable HVAC system with two H13 filters, mounted at the room inlet prior to swirl diffusers, allows ACRs from <10 to 70 h^{-1} . This enabled the test execution with the chosen ACRs. The test room was cleaned and disinfected prior to test execution. See Figure 2 for room layout details.

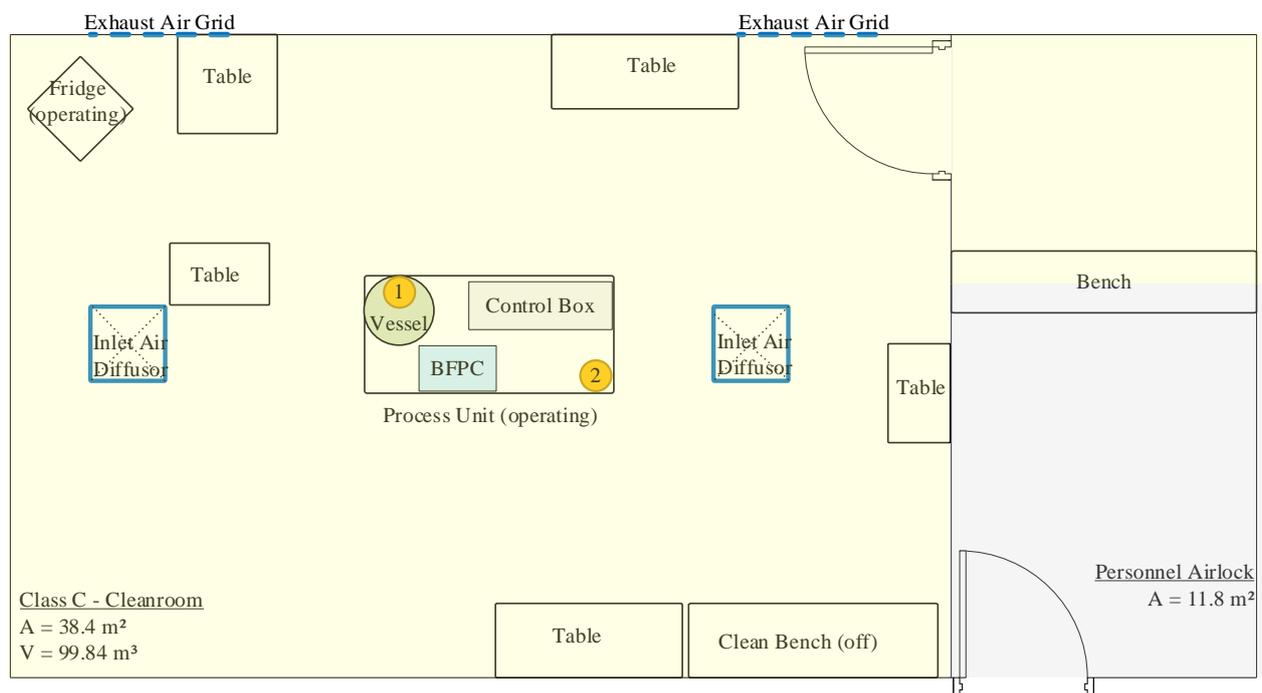


Figure 2. Room layout. For a comparison of the BioTrak[®] Biofluorescent Particle Counter (BFPC), (TSI Incorporated, Shoreview, MN, USA) with the classic Microbial Air Sampler (MAS), two different measuring systems were used: Merck Millipore RCS[®] (Merck Millipore, Darmstadt, Germany (1)) and ImpactAir[®] (Iso-Con Slit-to-Agar, Bridgend, UK (2)). All instruments were placed inside a process unit in the middle of the room.

The BioTrak[®] BFPC was set up with an airflow rate of 28.3 l/min and an aggregation period of 1 min. This measuring system combined two different detection units: One ISO-compliant particle counter and the MCP counting unit below. A schematic drawing of the system is given in [28]. The laser excites particles with a wavelength of 405 nm. To differentiate viable particles from other fluorescent substances the system takes three parameters for analysis: the normal scattered light at the same wavelength, a re-emission at a higher wavelength between 430–500 nm, and another between 500–650 nm. By this, the system can distinguish biological from non-biological particles and also viable, potentially bacterial, MCPs from other biologic particles, such as pollen [29].

The Merck Millipore RCS[®] High Flow Touch collects air with a flow rate of approx. 100 L/min , and uses centrifugal force for an impaction of MCPs on agar test-strips [30]. The high sampling volume is an advantage of this system. Depending on the used garment the test duration and, consequently, the sampling volume, the set-up was as follows:

I8G/I9G: 7 min/strip—total 683 L (four strips, 28 min + 2 min changeover time)

NCG: 7 min/strip—total 683 L (four strips, 28 min + 2 min changeover time) plus 5 min with last strip (488 L)

The ImpactAir[®] Iso-Con Slit-to-Agar MAS uses 90 mm tryptic soy agar (TSA) petri dishes. Inside the sampling device, the agar-filled plate slowly rotates below a very narrow inlet slit [31]. The air flow was setup with 15 L/min. The run time and the resulting sampling volume was 7 min/plate, equaling 105 L for I8G/I9G experiments, and 8 min/plate (120 L) for NCG.

For the MAS systems, Merck Millipore 90 mm/30 mL TSA plates and test strips for the RCS[®] air sampler were used [32,33]. The collected plates and strips were incubated at 32 °C. A daily CFU count was done, starting at day two and finishing after day four, as no further CFUs were observed.

In industrial processes, rooms of this size are typically run by two operators. Consequently, all experiments were performed by two persons to generate realistic cleanroom process operations. As three persons were available, one was exchanged after each test to allow breaks. Hand disinfection during the experiments was done with 2-propanol at the table in the back of the process unit.

A small process unit, consisting of a filled water tank, pump, connecting pipes, and instrumentation, was placed in the middle of the room to simulate a production process (Figure 3). The circulation pump was operated continuously during the three days of the test execution, which also created realistic conditions with regard to equipment heat generation and motor fan-induced air turbulence.

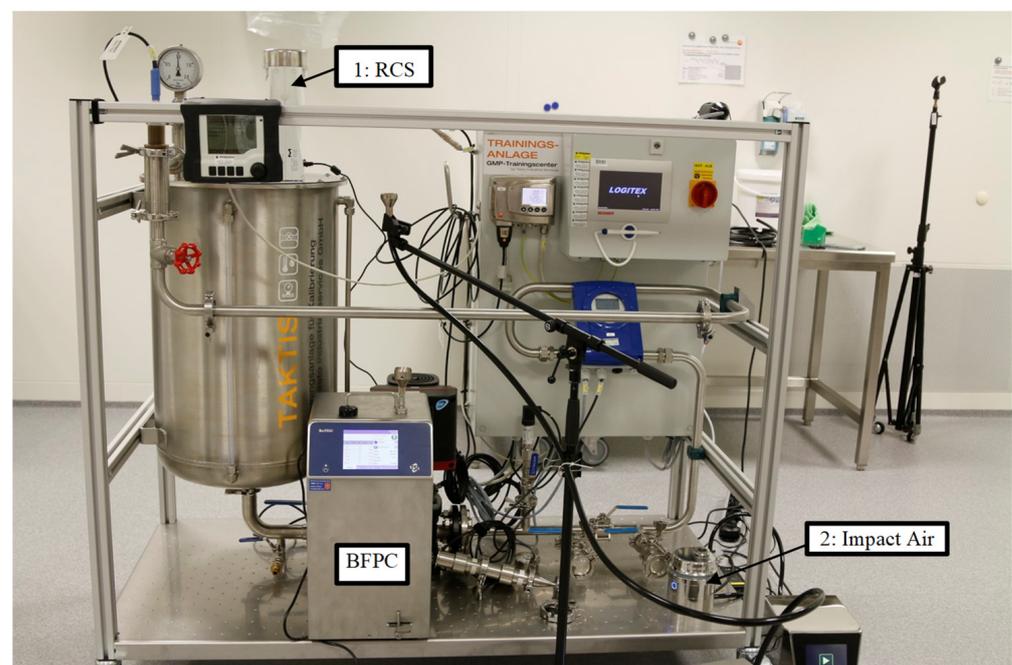


Figure 3. Process Equipment and Measuring Systems.

The air supply rate, to measure and control the anticipated ACR, was determined by a Testo 420 volume flow hood. All test equipment was calibrated before the start of the tests.

All tests were recorded by a full HD-Camera (Canon EOS 5D Mark IV, Tokyo, Japan) for later analysis of the counter results in relation to the operator's behavior.

Descriptive statistics were determined with Microsoft Excel. Comparison of the means was done with JASP software (v.0.14.1), Amsterdam, The Netherlands. Normal distribution and variance homogeneity were determined with Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. The non-parametric data sets were subjected to a Kruskal–Wallis analysis of variance with subsequent Dunn' post hoc tests [34]. Statistical relationships between the different parameters were investigated by a determination of the respective correlation

coefficients (Spearman’s rank correlation coefficient ρ for non-parametric data). Probability values (p -values) < 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

The results of this experimental study are shown in the diagrams 4–6, which delineate viables/ m^3 on the left y -axis, and particles $>1.0 \mu m^3$ on the right y -axis. As MCPs, due to the natural size of microbes, cannot be smaller than $1.0 \mu m$, only particles larger than that are shown in the diagrams to enable a comparison between non-viable and viable particles. The mean values of both test runs were calculated and used for the result analysis. Please see Supplementary Material for details of differences between the first and the second test run.

3.1. Test Phases

In Figure 4 the results for viables/ m^3 and particles $>1.0 \mu m^3$ during the test phases at ACR 20 are illustrated. The expected effects are noticeable: At the beginning of the start phase the operators switched on the measuring systems and left the room. In this timeframe with no personnel present, the values for viables and particles decreased by sedimentation as no airflow turbulence could keep them airborne. With the operator’s entry at the end of the start phase, the contamination started to increase. As soon as the HVAC was switched on at beginning of the decay phase after 10 min, viables and particles were effectively removed. In the ‘in operation’ phase between 16 and 25 min, a balance between the operator-generated and the HVAC-removed contaminants was reached. For garment I8G (Figure 4a), a further reduction of viables and particles became visible only after the staff left the room. Furthermore, a good correlation between BFPC-measured viables and particles was obvious (Spearman’s $\rho: 0.929; p < 0.001$).

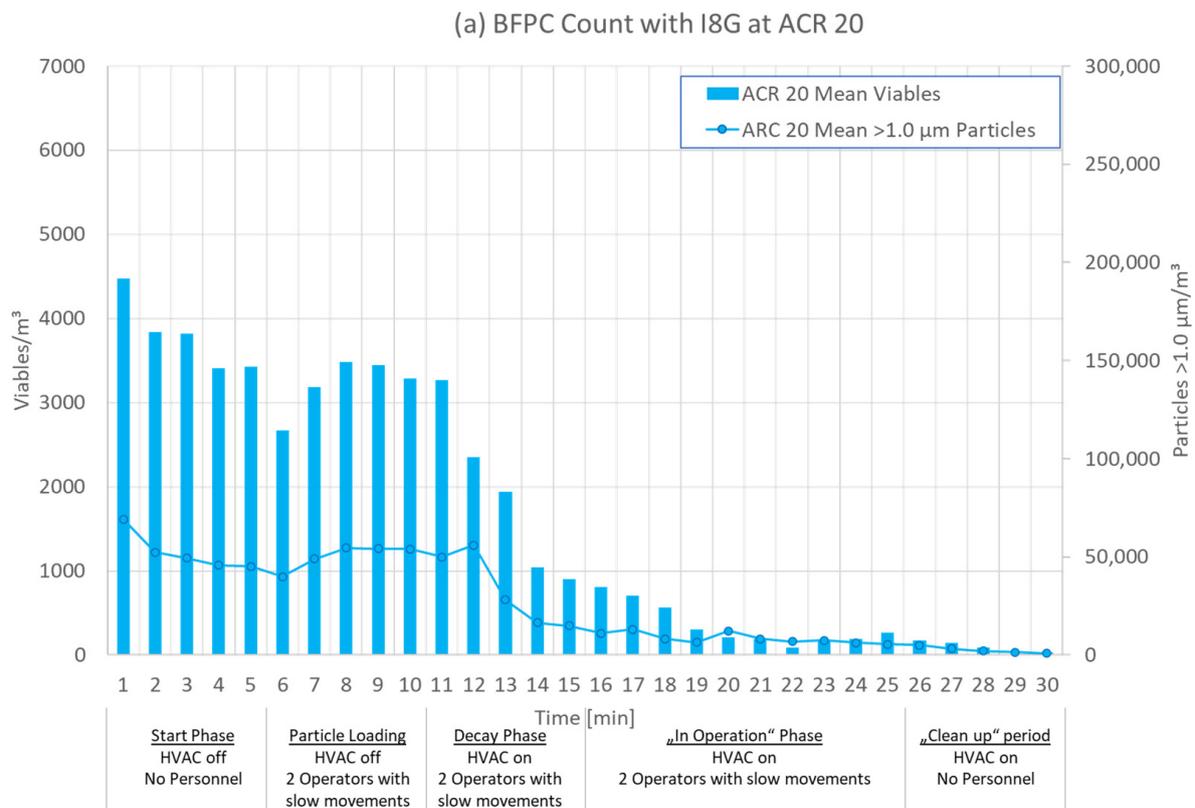


Figure 4. Cont.

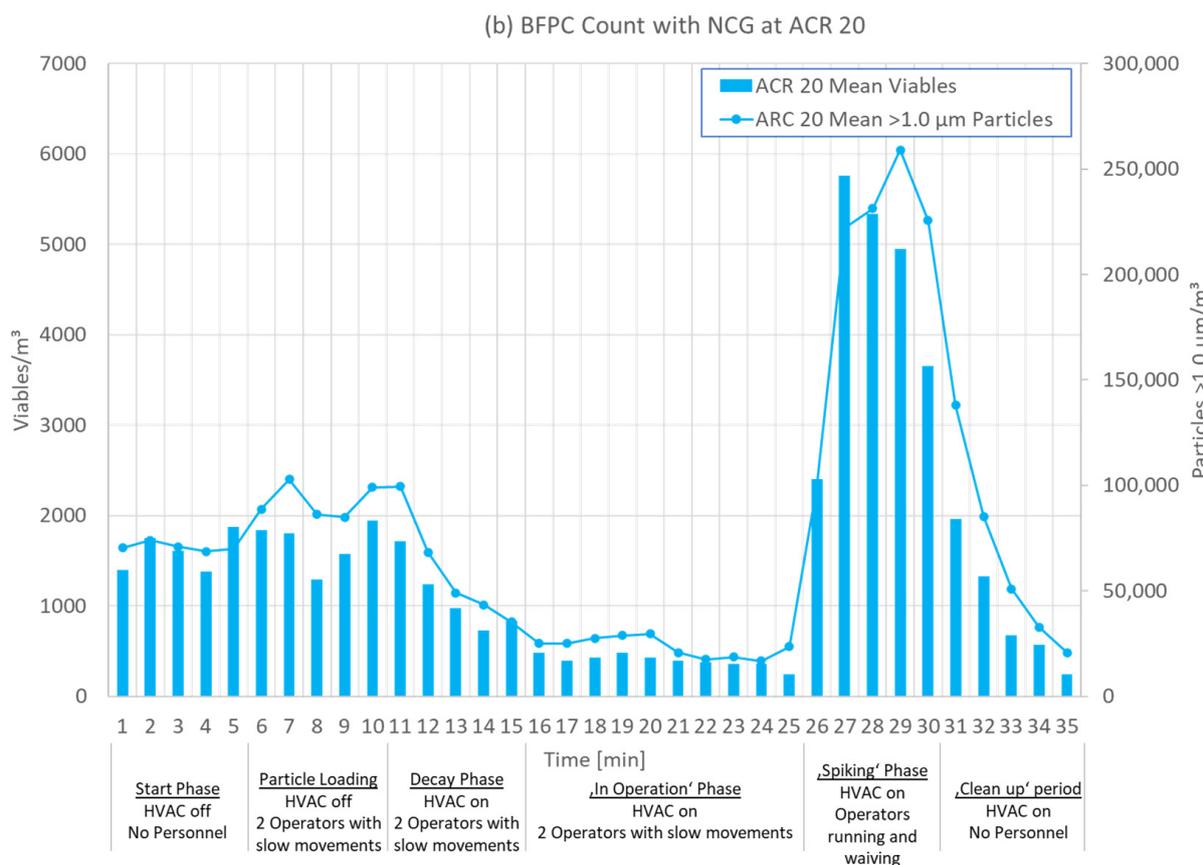


Figure 4. Particles and Viabiles/m³ in the different test phases at ACR 20: (a) with I8G/(b) with NCG (Note the different scale on x-axes in (b) to reflect the spiking phase).

For the tests with NCG, the graph looked similar up to 25 min (Figure 4b). Then, with the beginning of the running and waving of the operators, the expected boost in particle and MCP-generation occurred. Again, a correlation between viabiles and particles was apparent (Spearman's ρ : 0.955; $p < 0.001$). Cf. Supplementary Material for more detailed diagrams.

3.2. Results for Different ACRs

It is not surprising that a higher ACR leads to a lower contamination for a cleanroom 'in operation'. This is represented in Figure 5a. The overall level of viabiles and particles is higher with ACR 10 than with ACR 15 and 20, wearing I8G. The graph also shows that peaks, which occurred during test execution, are higher for ACR 10 than for ACR 15.

The results for I9G (Figure 5b) are surprising due to high peak values for the supposed better ACR 20 compared to ACR 15 and ACR 10 results. Cf. Section 3.4 for this observation.

In the NCG-graph (Figure 5c), the expectable higher load of particles and viabiles as a result of the unsuitable cleanroom garment can be observed. Furthermore, the better HVAC-performance at higher ACRs is noticeable. During the 'in operation' phase, the number of viabiles is in a steady state with ACR 15 and 10 in the same range, while ACR 20 is noticeably lower. In the following spiking phase, the peak number of particles only reaches approx. 50% of the ACR 10 and ACR 15 values.

3.3. Viabiles Versus CFUs

As expected, the numbers of MCPs detected by the BFPC were much higher than the culturable microbes counted on the agar plates and strips. Figure 6 compares both values for I8G with ACR 20 and ACR 10 (Cf. Supplementary Material for more detailed diagrams). To illustrate this comparison a factor of 80 had to be chosen between the CFU/m³ and the viable/m³ axis. Still, it was noticeable that all values decreased during the test runs, and

that the clean-up capability of ACR 20 was higher than that of ACR 10, as the measured values in the second half of the experiments were lower.

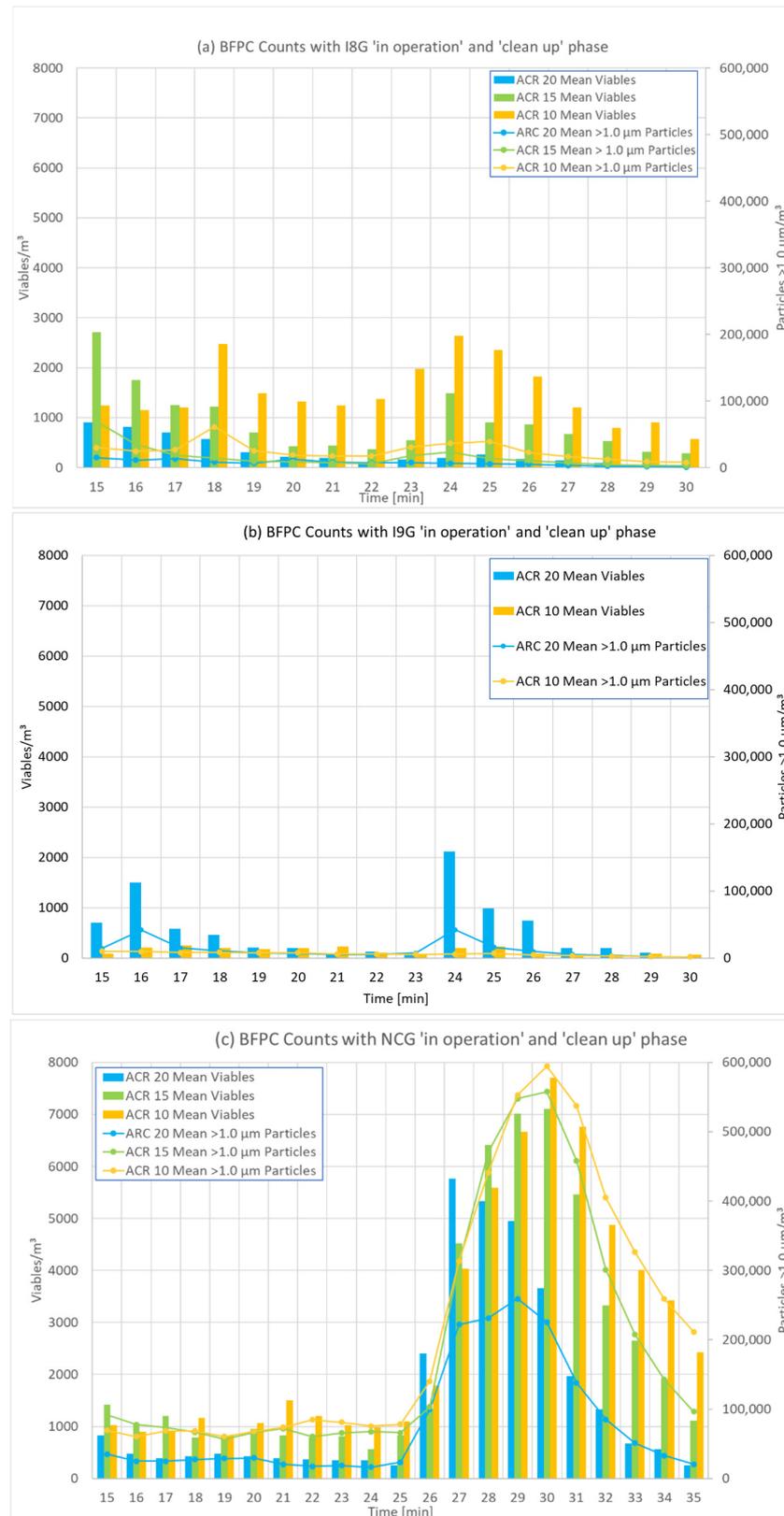


Figure 5. Particle and Viable/ m^3 results at different ACRs: (a) with I8G/(b) with I9G/(c) with NCG (Please note the different scale on x-axes in Figure (c) to reflect the 'spiking phase').

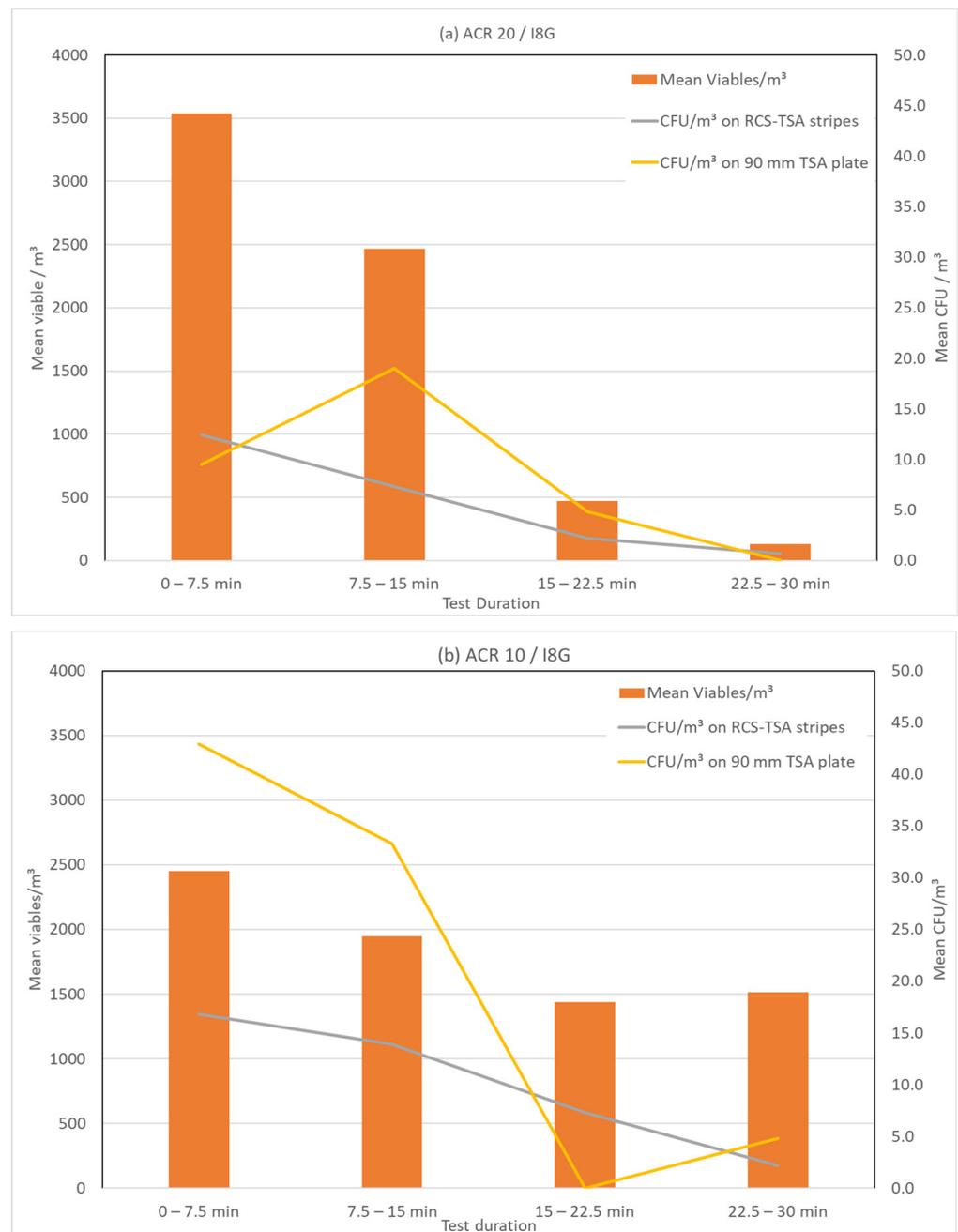


Figure 6. BFPC measured viables vs. CFUs with I8G.

3.4. Influence of 2-Propanol

For hand disinfection, two different bottles with 2-propanol were available on a table behind the process unit: normal dispensing bottles and spray bottles. The operators chose any of these until the test No. 7 (ACR 20/I9G—first run). During this test, it was recognized that the use of the spray bottle, even though applied with a distance to the BFPC, and close to the exhaust air grid, influenced the particle count. Consequently, the use of spray bottles was stopped from test No. 8 onwards.

The effect of induced peaks by use of a 2-propanol spray bottle for hand disinfection is visible in Figure 7. The peaks occurred only in the first of the two test runs with I9G at ACR 20. The comparison of particles and viables at these peak times, at first sight led to the assumption of operator activity, which released a high load of MCPs, and which was subsequently detected by the particle counter as well as by the BFPC. However, this would

also have become visible as increased CFUs, although a related increase in CFUs could not be found either on RCS-strips or on agar-plates. By reviewing the recorded videos, the cause of the peaks could be traced back to the use of the 2-propanol spray bottles, which was also observed in other studies [19,23,24]. Once observed, the use of disinfection spray was stopped after test 7.

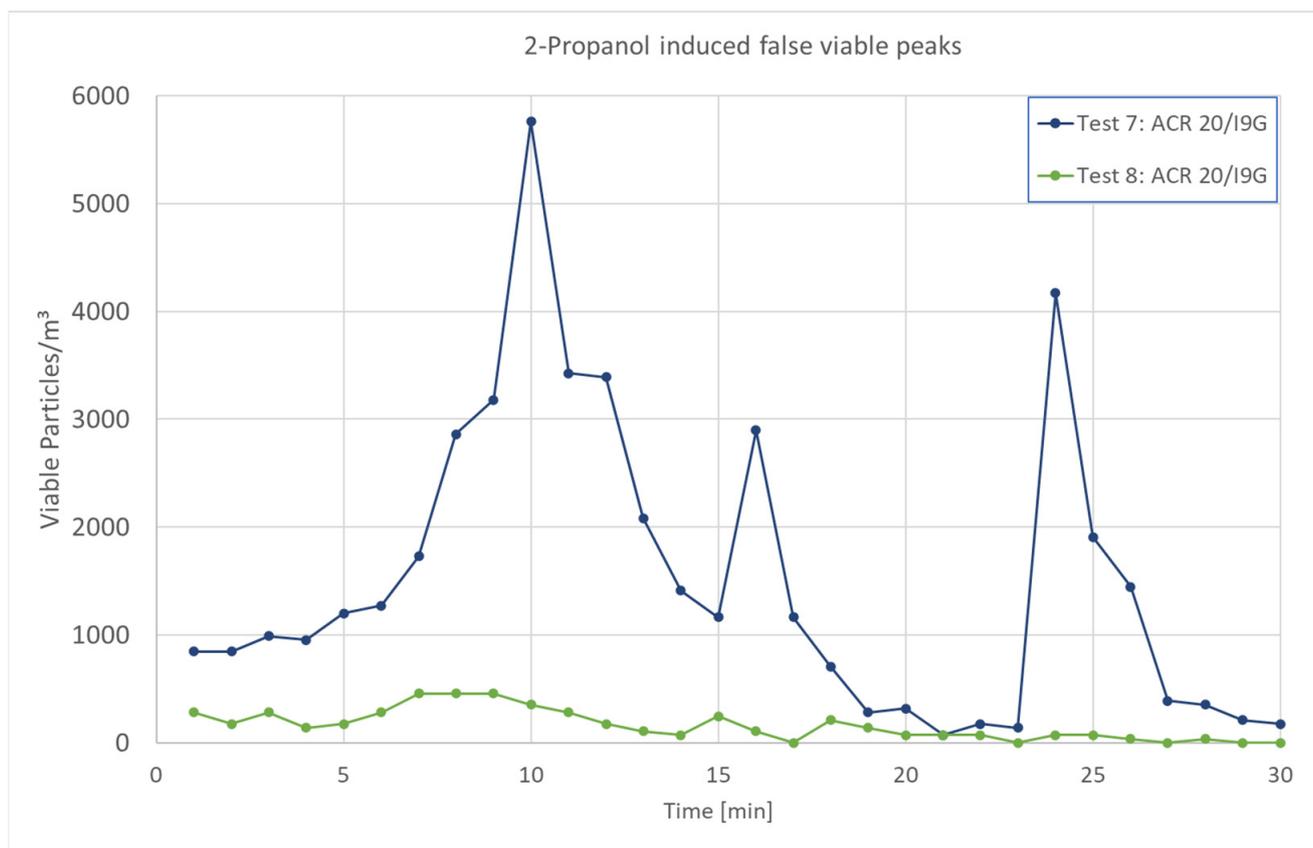


Figure 7. Effect of spray bottle use for hand disinfection.

The results of all particle, MCP and CFU counts ‘in operation’ between 16 and 25 min are presented in Table 3. The difference between cleanroom garments in contrast to NCG is clearly visible. However, the regulatory limit of 100 CFU/m³ [4,5] was only exceeded twice at the Impact Air-MAS with 90 mm plates at ACR 15 (Test No. 15) and ACR 10 (Test No. 18). For the cleanroom garments I8G and I9G, the highest CFU values ‘in operation’ reached only 10% of the allowed limit. The missing IA values at ACR 15/I8G (Tests 3 + 4) were caused by sampling failures.

In Figure 8, the ratio of CFUs/m³ to viables/m³ wearing pharmaceutical garments at the highest (ACR 20) and lowest (ACR 10) airflow are shown. The values of both MAS systems correlate (Spearman’s ρ : 0.55/ p = 0.027). For CFUs vs. viables the median value was at the same level for RCS and IA (0.5%). The distribution for IA with 90 mm agar plates was higher due to a leveraging effect caused by the low sampling volume and short runtime per plate (cf. Section 4 for discussion of this effect).

The distribution of particles/viables ‘in operation’ values for the three different garments is presented in Figure 9. It is clearly detectable that the mean and median values differed between the type of garments. A correlation between the different garments is not given. Furthermore, the distribution of values was higher with I9G and NCG.

Table 3. ‘In Operation’ results.

No.	ACR	Garment	Particles \geq 1.0 $\mu\text{m}/\text{m}^3$	MCPs/ m^3	Mean MCPs/ m^3	Ratio	IA CFU/ m^3	Mean IA CFU/ m^3	RCS CFU/ m^3	Mean RCS CFU/ m^3	Spray Bottles Used
Test 1	20	I8G	5819	224		26.0	9.5		4.4		No
Test 2	20	I8G	9817	147	185.5	66.8	0	5	0	2	No
Test 3	15	I8G	11596	518	518	22.4	-	-	0		No
Test 4	15	I8G	13592			15.6	-		4.4	2	Yes
Test 5	10	I8G	23969			13.7	0	0	5.9		Yes
Test 6	10	I8G	29240			15.6	0		0	3	Yes
Test 7	20	I9G	22750			20.1	0	5	1.5	1	Yes
Test 8	20	I9G	5218	59	59	88.4	9.5		0		No
Test 9	15	I9G	5277	100		52.8	0	0	1.5		No
Test 10	15	I9G	3345	65	82.5	51.5	0		1.5	2	No
Test 11	10	I9G	8846	183		48.3	9.5	10	8.8		No
Test 12	10	I9G	4164	165	174	25.2	9.5		2.9	6	No
Test 13	20	NCG	5430	159		34.2	33.3		48.3		No
Test 14	20	NCG	37767	554	356.5	68.2	83.3	58	65.9	57	No
Test 15	15	NCG	81331	931		87.4	158.3		82		No
Test 16	15	NCG	51449	665	798	77.4	66.7	113	67.3	75	No
Test 17	10	NCG	68993	895		77.1	83.3		48.3		No
Test 18	10	NCG	84717	1396	1145.5	60.7	175	129	80.5	64	No

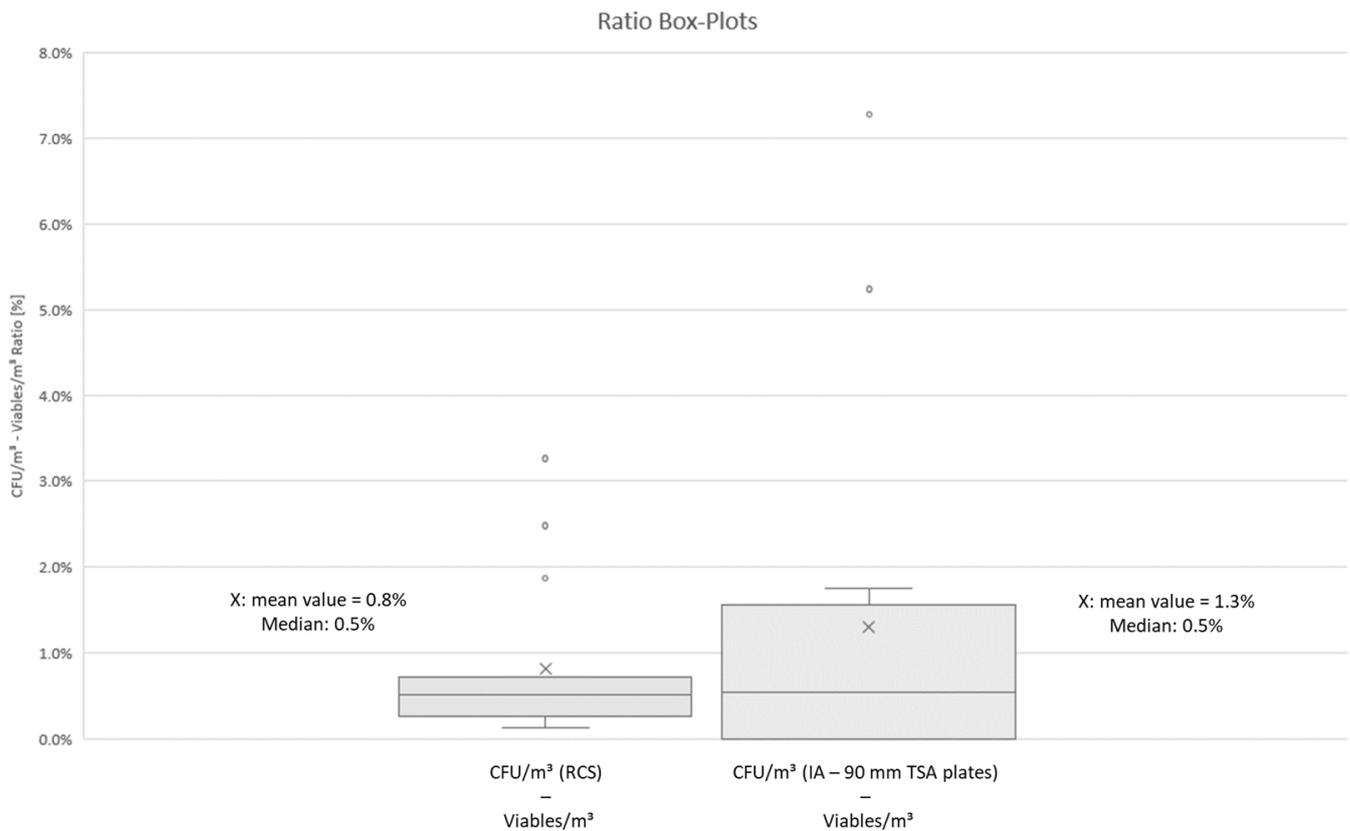


Figure 8. I8G + I9G/ACR 20 + ACR 10 Ratios of CFUs vs. viables.

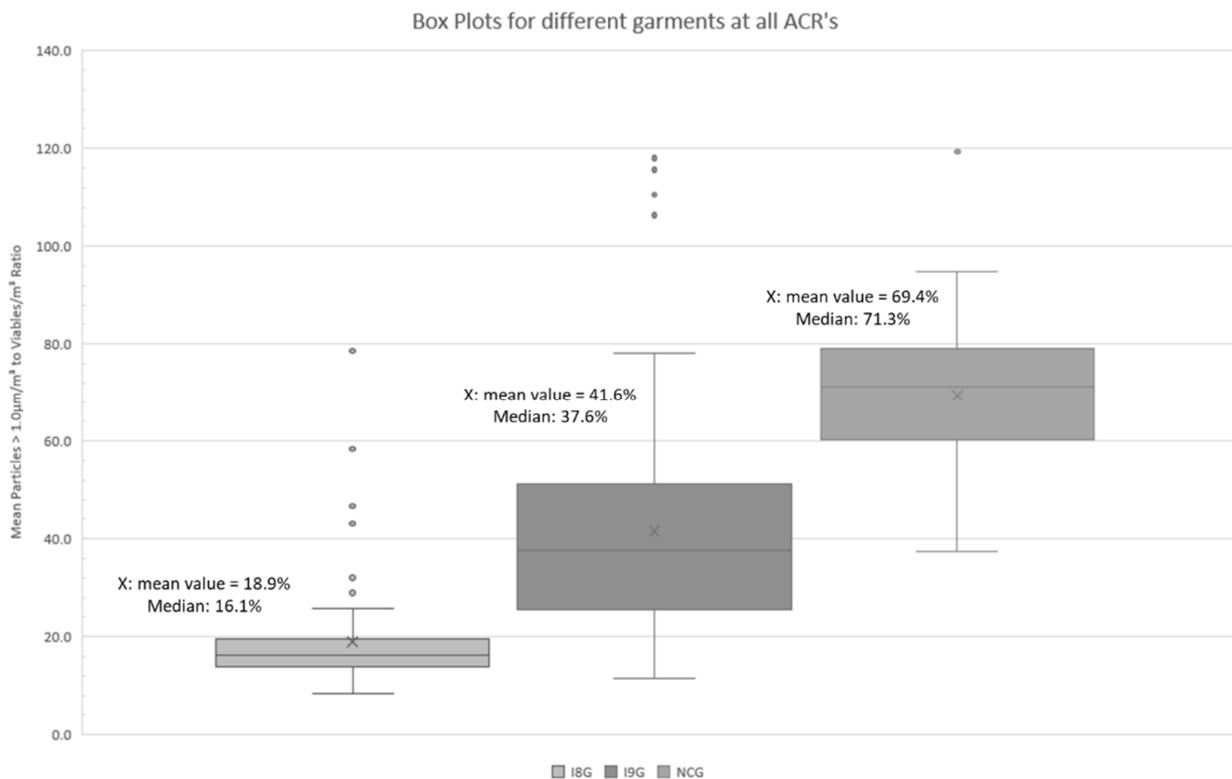


Figure 9. Particle/Viable ratio for different garments at all ACRs.

4. Discussion

Regulatory guidelines for aseptic pharmaceutical production [4,5] do not provide limits for particles >1.0 µm. The ISO 14644-1 [35] gives a limit at 832,000 particles/m³ for this particle size in ISO class 8. This value was not reached in any of the conducted experiments, not even in spiking phases with NCG (highest value: 594,523 particles >1.0 µm/m³ equivalent to 71% of the limit value).

In Table 4, the statistical evaluation of all data regarding BFPC-counted particles and viables vs. CFU/m³ are presented. While a weak correlation is shown for viables vs. CFUs on TSA plates, all other comparisons correlate well. Similar correlations of particles to CFUs have also been described by Parat et al. [12] and Sandle et al. for particles to viables [20].

Table 4. Correlation of particles/viables vs. CFUs.

Overall Correlation in Experimental Study		Spearman’s ρ	p
Particles > 1.0 µm/m ³	- Viables/m ³	0.864	<0.001
Particles > 1.0 µm/m ³	- CFU/m ³ on RCS-TSA strips	0.778	<0.001
Particles > 1.0 µm/m ³	- CFU/m ³ on 90 mm TSA plate	0.705	<0.001
Viables/m ³	- CFU/m ³ on RCS-TSA strips	0.623	<0.001
Viables/m ³	- CFU/m ³ on 90 mm TSA plate	0.472	<0.001
CFU/m ³ on RCS-TSA strips	- CFU/m ³ on 90 mm TSA plate	0.758	<0.001

A good correlation between the two different MAS systems was expected, as both are based on microbial growth on agar. The different correlations between BFPC-measured viables vs. CFUs on RCS® strips or 90 mm plates are interesting. It is most likely that this deviation has its cause in the highly different sampling volumes per minute of the used devices. The absolute CFU counts on plates and strips must be converted to CFU/m³ by division through the sampled air volume in m³. For the 90 mm TSA-plates, a total volume of 0.105 m³ was sampled per plate, which transforms each single colony on the plate into 9.5 CFU/m³. This is a big lever with respect to the generally low numbers of CFUs found

on the plates, especially during the ‘in operation’ phase with a maximum of one CFU found on individual plates. Generally, the collected data from 18 test runs gives a good indication of airborne CFUs in an operational cleanroom at different ACRs. Still, single test run results and single plate counts for a test phase underlie a random factor whether a microbe finds its way into the probe head or not. With the RCS[®] system, the sampling volume was significantly higher. For one TSA strip, 0.683 m³ of air was sampled. Hence, one CFU on the strip means 1.5 CFU/m³. With respect to the generally low numbers of CFUs found on the agar plates or strips, this leads to steadier sampling with a lower chance of random effects, as also visible in Figure 6 for RCS[®] vs. IA CFU results in which the RCS[®] achieves steadier results.

For the relevant I8G garment in a pharmaceutical cleanroom environment, the median value for the particle/viable ratio was 16.1. (Figure 9). Applying this value to the ISO 8 particle limit of 832,000/m³, the corresponding limit value for BFPC measured viables would be 832,000/m³/16.1 = 51,700/m³. This value was not reached in any of the 18 experiments. The highest measured value was reached with street clothes in test No. 17 (ACR 10/NCG) with 7880 viable particles/m³. An exceedance of regulatory limits for CFUs was observed at lower MCP counts. Hence, a derivation based on the particle/viable ratio is obviously not a feasible approach to find a BFPC limit value for cleanrooms.

The maximum number of CFUs found during ‘in operation’ phases throughout all tests with pharmaceutical garments I8G + I9G was 10 CFU/m³, being ten times lower than the regulatory limit of 100 CFU/m³. An exceedance of regulatory CFU/m³ limits was observed during the tests with NCG. The corresponding MCP/m³ values measured by the BFPC in these test phases were around 1000/m³. For that reason, an MCP limit for the BFPC, used in the given cleanroom in this experimental study, can be set at 1000 MCP/m³. BFPC values measured below this number are not likely to lead to an exceedance of the regulatory limit value of 100 CFU/m³.

The good responsiveness of the BFPC on peak generation of MCPs as triggered in the test runs with NCG also shows the applicability of the system to detect bioburden leaks during ongoing production or for cleanroom commissioning and qualification. This possible application has been proposed by Bhupathiraju et al. [36] and Weber et al. [19].

Continuous viable particle control may also be used to reduce the number and frequency of microbial air sampling. Scott et al. summarized the results of a meeting with the FDA to get authority feedback on regulatory acceptance of BFPCs for cleanroom control in which the FDA expressed a positive position [3]. However, these systems are regarded as an additional tool for quality assurance and are (today) not seen as a full alternative to classic CFU analysis. This study provides data which support the aim of air sampling reduction.

As reported by other authors [19,23], the effect of a false viable detection by fluorescent substances such as 2-propanol also became visible during these experiments. Though spray bottles were used in the back of the detection systems and close to the exhaust air grid, the generated fluid particles had a clear effect on particle detection as well as MCP detection by the BFPC. Therefore, manufacturers should avoid the use of disinfection spray bottles in rooms where such detection systems are used.

Energy savings by means of reduced ACRs has been described by various authors [6,11,37]. In a previous publication by Behrens et al. [10], which focused on a regulatory limit values for particles >0.5 µm and >5 µm, it was stated that ISO 8 cleanroom operations can be performed with lower ACRs than 20 h⁻¹. The results of this study support that outcome, as the BFPC results correlate well with particles and may also be used to continuously control the bioburden status of a cleanroom with early warning possibilities in case of high microbial values. This is in line with the study results of Mičko et al. [11], who found that ‘lower flow rates reduce unwanted turbulence and the magnitude of velocity fluctuations, making the ventilation system . . . more efficient at removing contaminants . . .’. If enhanced particle or heat generation within a cleanroom can be excluded as a reason for higher ACRs, manufacturers should test and qualify their individual cleanrooms with an ACR of 10 h⁻¹. BFPC systems cannot, today, replace regulatory required CFU recording

by classic air sampling but can support manufacturers in lowering ACRs in cleanrooms without compromising the control of air quality. This would reduce the energy demand for cleanroom operations.

Study Limitations

The test room was a training room, which was not operated and cleaned as regularly as typical process rooms in industry. Thus, the cleanroom status and its individual microbiome could still have been different, though cleaning and disinfection efforts were made prior to test start.

This study provides results from one series of different test setups in one room only. Thus, the test results cannot be universally transferred to other, real-world manufacturing sites. However, they give a strong motivation to conduct further, long-term experimental studies with direct comparison of MCPs, CFUs and particles in a real operational cleanroom within the pharmaceutical industry. This should provide sufficient data to provide clear recommendations for reducing ACRs and MCP alert limits.

This study focused only on numbers of MCPs detected by the BFPC, and CFUs found on agar samples, without identification of collected microbes (bacteria and fungi). As the regulatory limits refer to absolute numbers of any CFU the specific type of bacteria or fungi is not relevant. However, in real pharmaceutical operations an identification of the contaminating species should be performed in any case of deviation.

5. Conclusions

The results of this study show good applicability of BFPC systems in pharmaceutical cleanroom operations regulated by the FDA aseptic guide and the European Annex 1 [4,5]. This is especially visible in the fast detection of an intentionally created MCP generation during the test runs with NCG. The immediate detection of microbial contamination can be of big advantage in identifying limit exceedance during ongoing operations. It would enable the pharmaceutical industry to run cleanrooms with a reduced ACR of 10 h^{-1} to save energy without compromising the quality requirements for ISO 8/Class C cleanrooms. A second advantage is the accelerated commissioning and qualification of cleanrooms in renovation or new building projects.

As a result of this study, an MCP value of max. $1000 / \text{m}^3$ was evaluated as a probable limit for MCP/ m^3 in ISO Class 8 cleanrooms. Further (long-term) studies are required in real pharmaceutical production rooms to provide more data from other cleanroom setups. This should enable the verification or adjustment of the value of max. $1000 \text{ MCP}/\text{m}^3$ found in this study. Once a generally applicable limit has been found, this will likely enhance the use and acceptance of BFPC systems in the pharmaceutical industry.

The study results indicate that cleanrooms can be operated with ACR 10 to save energy. A further long term-study is recommended to validate this outcome. The continuous control of particles and viables using BFPC systems could provide the necessary reliability that the cleanrooms run within limits. Significant cost savings for reduced energy consumption, as well as an improved CO_2 -footprint, would be of significant benefit.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app12168108/s1>. Figure S1: Viable particle counts in test runs 1–6. Figure S2: Viable particle counts in test runs 9–12. Figure S3: Differences between different garments with ACR 20. Figure S4: Differences between different garments with ACR 10. Figure S5: Particles at ACR 20 with I8G vs. I9G. Figure S6: MCP vs. CFU with ACR 20 and garment I9G. Figure S7: MCP vs. CFU with ACR 10 and garment I9G. Table S1: Statistical data for particles and different garments. Table S2: Statistical data for particles vs. MCPs with I8G.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, test execution, data analysis, writing and visualization: D.B.; Data statistics: C.M.K. Review and editing: D.B., J.S., C.M.K., F.E.R.; Supervision: C.M.K., F.E.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Please review to Supplementary Material for further information. Raw data can be obtained from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors express special thanks to Testo Industrial Services, Kirchzarten, Germany and PMT, Heimsheim, Germany for the provision of rooms, equipment, and personnel. Open Access funding provided by the Open Access Publication Fund of Philipps-University Marburg with support of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ACR	Air Change Rate
BFPC	Biofluorescent Particle Counter
CFU	Colony Forming Units
FDA	Food and Drug Administration
GMP	Good Manufacturing Practice
HVAC	Heating, Ventilation and Air Conditioning
IA	Impact Air MAS, low inside process unit
ISO	International Organization for Standardization
MAS	Microbial Air Sampler
MCP	Microbe-Carrying Particle
RCS	RCS [®] High Flow Touch MAS, high inside process unit
TSA	Tryptic Soy Agar

References

- Miller, M.J.; Lindsay, H.; Valverde-Venura, R.; O’Conner, M.J. Evaluation of the BioVigilant IMD-A, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part I. Review of the technology and comparative studies with conventional methods. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2009**, *63*, 245–258. Available online: http://rapidmicromethods.com/references/miller_pdaj_part_1.pdf (accessed on 23 February 2022). [PubMed]
- Sandle, T. Real-time counting of airborne particles and microorganisms: A new technological wave? *Clean Air Contain. Rev.* **2012**, *9*, 4–6.
- Scott, A.; Fornig, R.-Y.; Russ, M.; Dalmaso, G.; Hooper, S.; Villari, P.; Cannon, J.; Francis, J.; Dingle, M. A Discussion on Bio-Fluorescent Particle Counters: Summary of the Process and Environmental Monitoring Methods Working Group Meeting with the FDA Emerging Technology Team. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2021**, *75*, 207–212. [CrossRef] [PubMed]
- European Commission. *Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products (Corrected Version)*; European Commission: Brussels, Belgium, 2009.
- Food and Drug Administration. *Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing—Current Good Manufacturing Practice*; FDA: Rockville, MD, USA, 2004.
- Fedotov. Saving energy in cleanrooms. *Cleanroom Technol.* **2014**, *22*, 14–18.
- Khoo, C.Y.; Lee, C.-C.; Hu, S.-C. An experimental study on the influences of air change rate and free area ratio of raised-floor on cleanroom particle concentrations. *Build. Environ.* **2012**, *48*, 84–88. [CrossRef]
- Tschudi, W.; Benschine, K.; Fok, S.; Rumsey, P. Cleanroom energy benchmarking in high-tech and biotech industries. In Proceedings of the 2001 ACEEE Summer Study on Energy Efficiency in Industry, New York, NY, USA, 24–27 July 2001.
- Kircher, K.; Shi, X.; Patil, S.; Zhang, K.M. Cleanroom energy efficiency strategies: Modeling and simulation. *Energy Build.* **2010**, *42*, 282–289. [CrossRef]
- Behrens, D.; Schaefer, J.; Keck, C.M.; Runkel, F.E. Effects of different air change rates on cleanroom ‘in operation’ status. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2022**, *47*, 1643–1655. [CrossRef] [PubMed]
- Mičko, P.; Hečko, D.; Kapjor, A.; Nosek, R.; Kolková, Z.; Hrabovský, P.; Kantová, N.Č. Impact of the Speed of Airflow in a Cleanroom on the Degree of Air Pollution. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 2466. [CrossRef]
- Parat, S. Contribution of particle counting in assessment of exposure to airborne microorganisms. *Atmos. Environ.* **1999**, *33*, 951–959. [CrossRef]
- Behrens, D.; Bachhofer, J.; Zipp, B.; Keck, C.; Schäfer, J.; Runkel, F. Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Pt.1. *Technopharm* **2020**, *10*, 284–288.
- Behrens, D.; Bachhofer, J.; Zipp, B.; Keck, C.; Schäfer, J.; Runkel, F. Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Pt.2. *Technopharm* **2021**, *11*, 94–99.

15. Loomans, M.; Ludlage, T.; van den Oever, H.; Molenaar, P.; Kort, H.; Joosten, P. Experimental investigation into cleanroom contamination build-up when applying reduced ventilation and pressure hierarchy conditions as part of demand controlled filtration. *Build. Environ.* **2020**, *176*, 106861. [CrossRef]
16. Loomans, M.; Molenaar, P.; Kort, H.; Joosten, P. Energy demand reduction in pharmaceutical cleanrooms through optimization of ventilation. *Energy Build.* **2019**, *202*, 109346. [CrossRef]
17. Molenaar, P.; Loomans, M.; Joosten, P.; Kort, H. Demand controlled filtration, a high potential energy savings measure for cleanrooms? *REHVA J.* **2019**, *2019*, 54–57.
18. Hill, S.C.; Pinnick, R.G.; Niles, S.; Pan, Y.-L.; Holler, S.; Chang, R.K.; Bottiger, J.; Chen, B.T.; Orr, C.-S.; Feather, G. Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles. *Field Anal. Chem. Technol.* **1999**, *3*, 221–239. [CrossRef]
19. Weber, J.; Hauschild, J.; Ijzerman-Boon, P.; Forng, R.-Y.; Horsch, J.; Yan, L.; Prasad, A.; Henry, R.B.; Claassen, M.; Villari, P.; et al. Continuous Microbiological Environmental Monitoring for Process Understanding and Reduced Interventions in Aseptic Manufacturing. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2019**, *73*, 121–134. [CrossRef] [PubMed]
20. Sandle, T.; Leavy, C.; Jindal, H.; Rhodes, R. Application of rapid microbiological methods for the risk assessment of controlled biopharmaceutical environments. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 1495–1505. [CrossRef] [PubMed]
21. Andon, B.M. Active air vs. passive air (settle plate) monitoring in routine environmental monitoring programs. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2006**, *60*, 350–355. [PubMed]
22. Ayers, F.; Chen, J.-P.; Dingle, M.; Hooper, S.; Lawson, L.; Manzer, D.; Noverini, P.; Prasad, A.; Scott, A.; Villari, P.; et al. Biofluorescent particle counter-based real-time feedback and control of processing conditions. *Eur. Pharm. Rev.* **2019**, *24*, 54–57.
23. Eaton, T.; Davenport, C.; Whyte, W. Airborne microbial monitoring in an operational cleanroom using an instantaneous detection system and high efficiency microbiological samplers. *Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.* **2012**, *17*, 61–69.
24. Sandle, T.; Leavy, C.; Rhodes, R. Assessing airborne contamination using a novel rapid microbiological method. *Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.* **2014**, *19*, 131–141.
25. Prasad, A.; Milling, A.; Hauschild, J.; Ruh, A.-C.; Horsch, J.; Weber, J.; Yan, L.; Plourde, L.; Claassen, M.; Villari, P.; et al. Practical Applications of Biofluorescent Particle Counting in Environmental Monitoring Investigations. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2020**, *74*, 318–323. [CrossRef] [PubMed]
26. Eaton, T.; Wardle, C.; Whyte, W. Use of a real-time microbial air sampler for operational cleanroom monitoring. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2014**, *68*, 172–184. [CrossRef] [PubMed]
27. Montenegro-Alvarado, J.-M.; Salvás, J.; Weber, J.; Mejías, S.; Arroyo, R. Pfizer Case Study Rapid Microbial Methods for Manufacturing Recovery after Hurricane María. Available online: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/pfizer-case-study-rapid-microbial-methods-for-manufacturing-recovery-after-hurricane-mar-a-0001> (accessed on 21 January 2022).
28. TSI Incorporated. Microbial Monitoring—Continuous and Intervention Free. Available online: www.tsi.com (accessed on 1 August 2022).
29. Hutchins, P.M. Real-Time Viable Particle Monitoring How does It Work How Can It Help. Available online: https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/real-time-viable-particle-monitoring-how-does-it-work-how-can-it-help-0001?vm_tid=2045890&user=6c1c6778-9ed8-4c70-b761-8c894264be1c&utm_source=et_6214180&utm_medium=email&utm_campaign=PHARM_01-23-2018&utm_term=6c1c6778-9ed8-4c70-b761-8c894264be1c&utm_content=Real-Time%20Viable%20Particle%20Monitoring%3a%20How%20Does%20It%20Work%3f%20How%20Can%20It%20Help%3f (accessed on 26 May 2021).
30. Merck Millipore. RCS[®] High Flow Touch: Microbial Safety at Your Fingertips. Available online: www.merckmillipore.com/biomonitoring (accessed on 19 April 2021).
31. Pinpoint Scientific. ImpactAir_IS0-90_Brochure. Available online: https://www.pmtgb.com/fileadmin/Datasheets_UK/ImpactAir_IS0-90_Brochure.pdf (accessed on 23 February 2021).
32. Merck Millipore. Tryptic Soy Agar + LTHTh—ICR: Technical Data Sheet. Available online: www.merckmillipore.com/biomonitoring (accessed on 19 April 2021).
33. Merck Millipore. Hycon[®] Agar Strips TSM: Technical Data Sheet. Available online: www.merckmillipore.com/biomonitoring (accessed on 19 April 2021).
34. Dinno, A. Nonparametric Pairwise Multiple Comparisons in Independent Groups using Dunn’s Test. *Stata J.* **2015**, *15*, 292–300. [CrossRef]
35. *DIN EN ISO 14644-1*; Cleanrooms and Associated Controlled Environments-Part 1: Classification of Air Cleanliness by Particle Concentration. Beuth: Berlin, Germany, 2015.
36. Bhupathiraju, V.K.; Varnau, B.; Nelson, J.R.; Jiang, J.P.; Bolotin, C. Evaluation of an Instantaneous Microbial Detection System in Controlled and Cleanroom Environments. *BioPharm Int.* **2007**, *2007*, 35–46.
37. Tschudi. Energy efficiency strategies for cleanrooms without compromising environmental conditions. *ASHRAE Trans.* **2005**, *111*, 637.

Anwendung eines Echtzeit-Keimzählers zur Überwachung des Reinraumstatus

Detlef Behrens, Jens Große Jäger, Prof. Dr. Patrick Elter •

Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen

Prof. Dr. Cornelia Keck und Dr. Jens Schäfer • Philipps-Universität

Marburg, Marburg

Prof. Dr. Frank Runkel • Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen



Korrespondenz: Detlef Behrens, Behrens Projektmanagement GmbH, Hasenberg 6, 35041 Marburg; **E-Mail:** detlef.behrens@behrens-pm.de

► Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde die Eignung des Verfahrens zur Echtzeit-Keimzählung, sog. Biofluorescent Viable Particle Counting (BFPC), im praktischen Einsatz zur kontinuierlichen Überwachung des Reinraumstatus in einem Produktionsraum der Klasse C untersucht. Zu diesem Zweck wurden Messungen in bestehenden Produktionsräumen eines Pharmaunternehmens durchgeführt. Um eine möglichst realitätsnahe Situation zu schaffen, wurden im Laufe der Versuche verschiedene Betriebszustände innerhalb der Reinnräume simuliert. Die Untersuchungen ergaben, dass die vom BFPC gemessenen Microbe Carrying Particles (MCP) in Echtzeit einen Überblick über den Reinraumstatus in Bezug auf Partikel und Keime geben. Darüber hinaus können bei der Inbetriebnahme und Qualifizierung von Reinnräumen Keimquellen unmittelbar detektiert und somit Zeit bei der Fehlersuche gespart werden. Für die regulatorisch obligaten Bestimmungen der keimbildenden Einheiten (KBE)/m³ Luft bietet diese Technik Vorteile bei der Überwachung von Reinnräumen.

1. Einleitung

Bedeutende Parameter für die Qualität eines Reinnraums sind die Partikel- und Keimanzahl in der Luft. Der Annex 1 der EU-GMP-Guideline [1] gibt eine maximale Zahl an Partikeln der Größen $\geq 0,5 \mu\text{m}$ und $\geq 5 \mu\text{m}$ für die Betriebszustände *in operation* und *at rest* sowie die Zahl der maximal zulässigen keimbildenden Einheiten (KBE) für die jeweilige Reinnraumklasse vor. KBE sind Mikroorganismen, die auf einem Nährboden, wie z. B. einer Agarplatte wachsen und dort eine Kolonie ausbilden.

Partikel- und Keimzahlmessungen werden mit kalibrierten Messgeräten, wie z. B. Laser-Partikelzählern

sowie Luftkeimsammlern durchgeführt. In dieser Studie wurde zusätzlich ein Messgerät eingesetzt, welches Partikel biologischen Ursprungs, also potenzielle Keime, in Echtzeit erfasst. Für diese als Biofluorescent Particle Counting (BFPC) – oder auch Real-Time Viable Particle Counting – bezeichnete Methode bieten verschiedene Hersteller Geräte an.

Während Standardlaser-Partikelzähler alle Partikel undifferenziert messen, können im BFPC-Verfahren zusätzlich auch sog. Viablen identifiziert werden. Hierunter fallen Bakterien, Pilze oder auch Pollen. Diese werden auch Microbe Carrying Particles (MCP) genannt. Die MCP stellen eine Messgröße dar, welche

► Key Words

- Reinnraumüberwachung
- Echtzeit-Keimzähler
- Biofluorescent Viable Particle Counting (BFPC)
- Microbe Carrying Particle (MCP)
- Partikelmessung
- Luftkeimmessung

nicht unmittelbar mit den KBE zu vergleichen ist, da nur ein geringer Teil der MCP auch Kolonien auf Agarplatten ausbildet.

BFPC-Geräte zur Echtzeitmessung von MCP sind seit 2009 auf dem Markt [2]. Im Unterschied zu herkömmlichen Laser-Partikelzählern, die nur die Anwesenheit und Größe von Partikeln auf Basis einer Laser-Streulicht-Messung erfassen, wird im BFPC eine fluoreszenzbildende Strahlung von Partikeln biologischen Ursprungs mittels Laser aktiviert und gemessen. Dies geschieht auf Grundlage der in den lebensfähigen Partikeln vorhandenen Metabolite, wie Nukleotide, Flavine, Lipide und Aminosäuren. Die eingeführte Laserstrahlung wird vom Par-



Abbildung 1: Messinstrumente im Produktionsraum (Quelle aller Abbildungen: die Autoren).

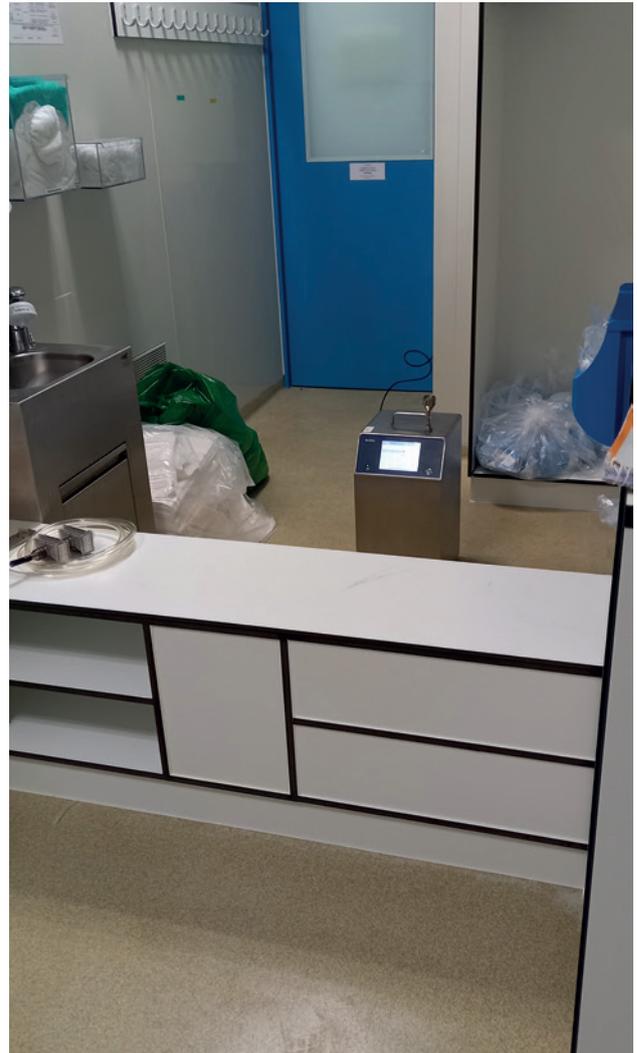


Abbildung 2: BFPC in der Personalschleuse.

tikel absorbiert und mit einer größeren Wellenlänge wieder emittiert. Diese Technik wird laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) genannt [3]. Durch Erfassung der autofluoreszenten Strahlung kann der BFPC nichtlebensfähige Partikel und lebensfähige, fluoreszierende Partikel voneinander unterscheiden. Es existieren auch autofluoreszierende Partikel, wie z. B. Pollen, die nicht lebensfähig sind. Um diese von Keimen zu differenzieren, werden im BFPC nicht nur das Streulichtsignal (für nicht biologische Partikel), sondern auch Fluoreszenz-Wellenlängen in den Bereichen 430–500 nm sowie 500–600 nm erfasst und ausgewer-

tet. Aus der Kombination dieser 3 Parameter kann das Gerät nichtbiologische Partikel, Bakterien und Pollen unterscheiden [3].

Klassische und von den Überwachungsbehörden erwartete Methoden zur Erfassung der KBE pro m^3 Luft liefern Ergebnisse erst nach einer mehrtägigen Inkubation der Agarplatten. Bei Überschreitung der regulatorischen Grenzwerte könnte dies nach Auswertung der inkubierten Nährböden zu Überraschungen führen und die Qualität der gefertigten Chargen infrage stellen, ohne dass der Hersteller noch Einfluss auf die Produktion nehmen kann. Hier liegt ein Vorteil der BFPC-Messtech-

nik: MCP können in einem Reinraum deutlich schneller und effizienter entdeckt werden, um bei Überschreitung von Warngrenzen rechtzeitig reagieren zu können.

Darüber hinaus kann ein BFPC bei der Inbetriebnahme von Reinräumen eingesetzt werden, um vor Beginn der Qualifizierung evtl. vorhandene Keimherde aufzuspüren und eine länger andauernde Suche nach deren Quellen zu vermeiden [4]. Dadurch kann die Projektlaufzeit zur Inbetriebnahme und Qualifizierung von Reinräumen verkürzt werden.

Trotz dieser Vorteile werden BFPC in der Industrie nicht umfas-

Tabelle 1

Versuchsplan.

Phase	Versuch 1: Produktionsraum Klasse C		Versuch 2: Personalschleuse D-C	
1	0–5 min	at rest: Starten der Messung.	0–5 min	at rest: Starten der Messung.
2	5–15 min	in operation: 3 Personen betreten den Raum und bewegen sich; inkl. CRT Luftpartikel und Merck Luftkeim.	5–10 min	in operation: 2 Personen betreten den Raum und ziehen sich um.
3	15–30 min	clean-up: Personen verlassen den Raum.	10–20 min	clean-up: Personen verlassen den Raum.

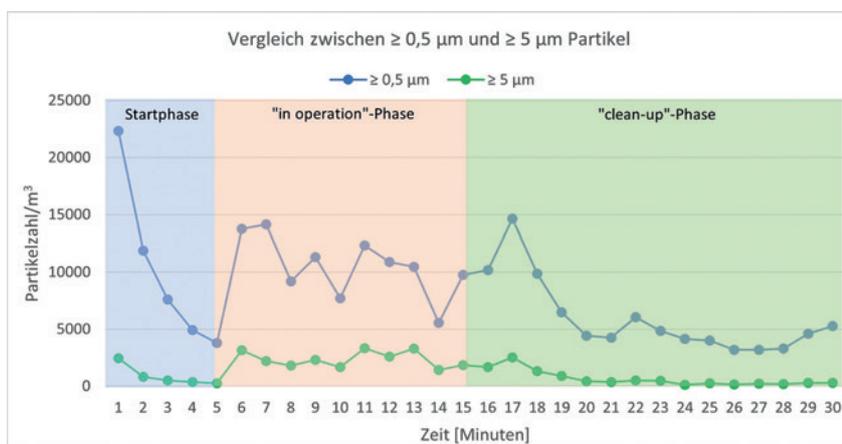


Abbildung 3: Vergleich der $\geq 0,5 \mu\text{m}$ und $\geq 5 \mu\text{m}$ großen Partikel mit markierten Versuchsphasen mit dem BFPC.

send eingesetzt. Der Grund hierfür liegt hauptsächlich an nicht vorhandenen regulatorischen Grenzwerten, an denen sich Betreiber orientieren müssen.

Es wurde untersucht, inwieweit der Einsatz eines BFPC zur Routineüberwachung des Reinraumstatus in einem pharmazeutischen Betrieb unterstützend eingesetzt werden kann. Ergänzend wurde überprüft, inwieweit sich frühere Ergebnisse zur Partikelabreicherung im Reinraum aus Technikumsversuchen auch in diesem Produktionsreinraum reproduzieren lassen [5, 6].

2. Material und Methoden

Die Versuche fanden in einem Produktionsraum der Klasse C, bei eingeschalteter Lüftungsanlage mit einer Luftwechselrate von 20 h^{-1} statt. Die sich im Raum bewegenden

Personen trugen Kleidung für die Reinraumklasse C: Reinraumoverall, Überschuhe, Haarhaube, Mund-Nasen-Maske, Handschuhe. Weiterhin befanden sich eine Cleanbench, 2 Ultrafiltrationsanlagen und weiteres Laborequipment im Raum. Ein weiterer Versuch wurde in der Personalschleuse im Zugangsbereich zum Produktionsraum durchgeführt.

Die Messungen fanden mit folgenden kalibrierten Messgeräten parallel zueinander statt:

- CRT 50 LPM Partikelzähler CI-450T[®] (Abb. 1, links)
- TSI BioTrak[®] BFPC¹⁾ (Abb. 1, Mitte)
- Merck Luftkeimsammler MAS-100 NT Ex[®] (Abb. 1, rechts)

Der BFPC steht an seiner Messposition hinter der Schwenkbank in

¹⁾ Kombination aus einem Partikel- und einem Echtzeit-MCP-Messgerät

der Personalschleuse (Abb. 2). In Tab. 1 ist der Versuchsplan mit den einzelnen Messreihen sowie der zeitliche Ablaufplan dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Produktionsraum

In Abb. 3 sind die Partikelzahlen in den 3 Versuchsphasen der 30-minütigen Messung farblich markiert. Die Startphase beginnt bei Minute 1 und endet bei Minute 5. Der hohe Startwert ergibt sich aus dem direkten Kontakt mit den Geräten beim Einstellen der Messung. Im Anschluss wird der Raum verlassen und die Partikelanzahl sinkt rapide. Die rot hinterlegte Phase ist die In-Operation-Simulation. Die 3 zurückgekehrten Personen bewegen sich im Raum und emittieren dadurch Partikel bzw. wirbeln sedimentierte Partikel von Oberflächen auf. Die Partikelkonzentration steigt dadurch an und bewegt sich auf einem höheren Niveau mit bis zu $15\,000 \text{ Partikel/m}^3$ für $\geq 0,5 \mu\text{m}$ große Partikel und ca. $2\,500 \text{ Partikel/m}^3$ für $\geq 5 \mu\text{m}$ große Partikel. Die erkennbaren Schwankungen sind auf die Bewegungen der Personen im Raum zurückzuführen. Nach der In-Operation-Phase verlässt das Personal den Raum, somit startet die Clean-up-Phase. In den folgenden 15 min sorgt die Lüftungsanlage dann für eine Reduzierung der Partikelbelastung auf $<5\,000 \text{ Partikel/m}^3$ der $\geq 0,5 \mu\text{m}$ großen Partikel. Die Partikelkonzentration der $\geq 5 \mu\text{m}$ großen Partikel sinkt auf annähernd 0 ab.

Nur für den privaten oder firmeninternen Gebrauch / For private or internal corporate use only

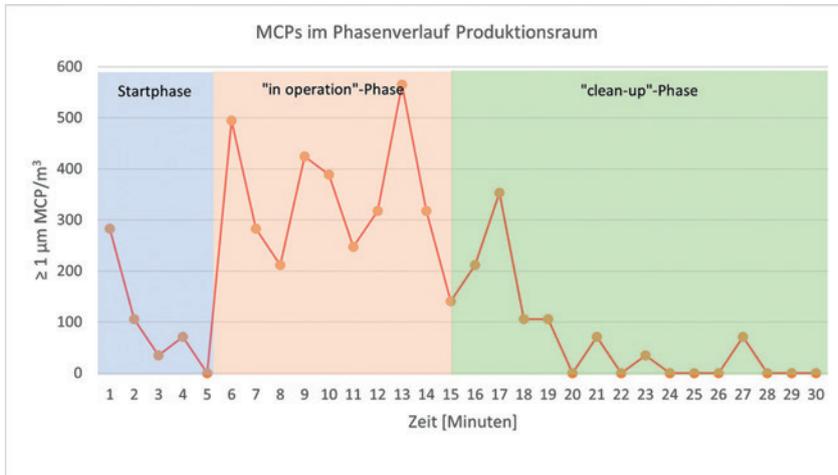


Abbildung 4: MCP-Anzahl mit markierten Phasen.

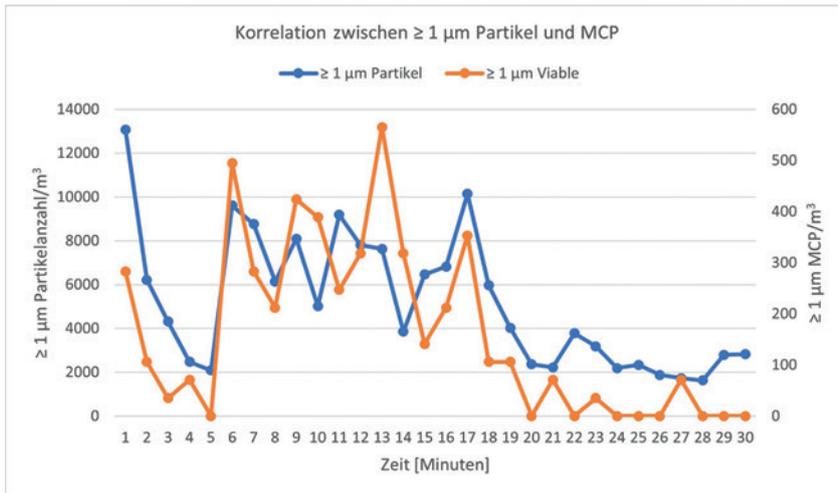


Abbildung 5: Verlauf der Partikelzahl und MCP im Produktionsraum.

Tabelle 2
KBE/m³ vom Merck Luftkeimsammler und 1 µm MCP/m³ des BFPC.

	Produktionsraum in operation
Grenzwert Klasse C KBE/m³	100
KBE/m³	15
≥ 1 µm MCP/m³	3 392

Bei der vergleichenden Betrachtung der MCP-Werte in den 3 Ver-

suchsphasen (Abb. 4) ist der Zusammenhang zwischen Personal und Steigerung der Reinraumbelastung ebenfalls zu erkennen. In der Startphase sinkt der MCP-Wert bis zum Beginn der In-Operation-Phase. Ab diesem Punkt steigt die Anzahl der gemessenen MCP auf ein höheres Niveau. Nach Verlassen des Reinraums steigt die Anzahl kurz an, anschließend reinigt die Lüftungsanlage die Luft des Raumes in der Clean-up-Phase.

In Tab.2 sind die Werte der KBE/m³ und der ≥ 1 µm MCP/m³ des Versuchs im Produktionsraum dargestellt. Der KBE-Wert und der entsprechende kumulative MCP-Wert

wurden über die 10-minütige In-Operation-Phase aufgenommen. Der Grenzwert von 100 KBE/m³ wird dabei deutlich unterschritten. Die MCP/m³ sind, wie erwartet, um ein Vielfaches höher als die gemessenen KBE-Werte.

In Abb. 5 ist die Korrelation zwischen Partikel- und MCP-Anzahl dargestellt. Auch wenn die absoluten Zahlen weit auseinander liegen, wird hier deutlich, dass der Verlauf beider Datensätze vergleichbar ist. Dies zeigt sich auch in dem Korrelationsfaktor von $r = 0,76$.

3.2 Personalschleuse

Bei Betrachtung des Verlaufs der Partikelkonzentration in der Personalschleuse (Abb. 6) mit einer 5-minütigen Startphase, einer 5-minütigen Umziehphase sowie einer 10-minütigen Clean-up-Phase ist ebenso ein direkter Zusammenhang zwischen dem Personal und der Partikelbelastung feststellbar. In der Personalschleuse ist dieser Effekt sogar noch stärker erkennbar als im Produktionsraum, da der Raum deutlich kleiner ist. Der Anstieg der Partikelkonzentration beider Partikelgrößen zwischen Minute 4 und 5 zeigt, dass die Personen in dieser Zeit den Raum betreten haben. Wie erwartet, sorgte der Prozess des Umziehens beider Personen für einen deutlichen Anstieg der Partikelkonzentration. Nachdem die Personen die Schleuse verlassen haben, sinkt sie deutlich. Der MCP-Maximalwert liegt in diesem Versuch höher als im Produktionsraum, was auf den Umkleideprozess des Personals und der dadurch verstärkten Partikel- und MCP-Emission zurückzuführen ist. Nach Verlassen des Raumes dauert es nur 4 min, bis der ermittelte MCP-Wert auf 0 sinkt.

4. Diskussion

In den Versuchen ist ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Anwesenheit der Personen und der steigenden Zahl an Partikeln und MCP zu erkennen. Diese Erkenntnis

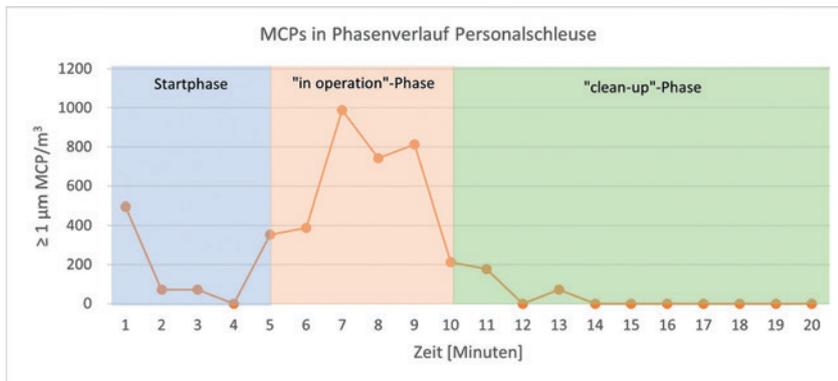


Abbildung 6: MCP-Anzahl mit markierten Phasen.

deckt sich mit der Literatur [7] und bestätigt, dass Personen in einem Reinraum den größten Partikelemitenten darstellen. Zudem können die auf dem Boden und an den Geräten abgelagerten Partikel durch die Bewegung der Personen aufgewirbelt und im Raum verteilt werden. Partikel haften bei Kontakt zwar leicht an Materialien, diese Haftung ist allerdings nicht stark und kann durch die kinetische Energie der Bewegung wieder gebrochen werden [7].

Eine Korrelation von KBE zu MCP kann aufgrund nur eines KBE-Messwerts im Produktionsraum nicht hergeleitet werden. Andere Studien geben hierzu allerdings an [4, 8], dass ein direkter Vergleich und eine Korrelation dieser Parameter nicht sinnvoll sind, da zu den MCP auch Partikel biologischen Ursprungs gehören, die keine KBE auf Agarplatten erzeugen oder bereits nicht mehr lebensfähig sind. Die hohe Differenz der in diesen Studien festgestellten Werte deckt sich jedoch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die MCP-Zahl stellt somit keinen Vergleichswert, sondern eine weitere Messgröße zur Bewertung von Reinräumen dar, welche in den Regularien (derzeit) nicht berücksichtigt wird.

Der große Vorteil, den die Messreihen zur MCP-Konzentration bieten, ist die unmittelbare Überwachung des Reinraumstatus. Der verzögerungsfreie Anstieg der MCP-

Zahl, wie in den durchgeführten Versuchen klar erkennbar, führt zu einer direkten Anzeige potenzieller Keimquellen im jeweiligen Raum. Dies kann nicht nur beim Routinebetrieb, sondern z. B. auch im Rahmen von Abweichungsuntersuchungen zum Auffinden von Keimquellen oder zur Vorbereitung einer Reinraumqualifizierung zur Identifizierung von Schwachstellen genutzt werden [4].

Der bei diesen Versuchen genutzte Produktionsreinraum wurde mit einer Luftwechselrate von 20 h^{-1} betrieben. Dieser Wert findet sich häufig bei Reinräumen der Klasse C, da im Aseptic Guide der FDA [9] ein 20-facher Luftwechsel für diese Klassifizierung als „typically acceptable“ beschrieben wird, was oft als regulatorische Vorgabe fehlinterpretiert wird. In einer anderen Studie wurde der Zusammenhang zwischen Partikelzahlen und der vorliegenden Luftwechselrate untersucht [10]. Dabei wurde festgestellt, dass die zulässigen Grenzwerte um ein Vielfaches höher liegen, als im Reinraum im Status *in operation* selbst bei deutlich niedrigeren Luftwechselraten tatsächlich gemessen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass Luftwechselraten zu hoch angesetzt werden und somit zu viel Energie zur Aufbereitung und Konditionierung der Luft aufgewendet werden muss. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie bestätigen dies. Im Produktionsraum wurden mit max. 15 000 Partikeln

$\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ Luft nur 0,4 % des in Klasse C erlaubten Grenzwerts von $3\,520\,000 \text{ Partikeln}/\text{m}^3$ Luft gemessen. Bei den $\geq 5 \mu\text{m}$ Partikeln liegen die maximal gemessenen Werte bei 8,6 % im Produktionsraum und bei 25 % während des Umkleideprozesses in der Schleuse. Da eine Korrelation der Partikel mit den MCP gezeigt werden konnte und auch der ermittelte KBE-Wert deutlich unter dem zulässigen Grenzwert liegt, können die Aussagen aus der im Technikum durchgeführten Studie [10] in diesem Praxisversuch in einem Produktionsraum eines pharmazeutischen Betreibers bestätigt werden.

Die At-Rest-Grenzwerte sollen nach Annex 1 innerhalb von 15–20 min nach Beendigung der In-Operation-Phase erreicht werden [1]. Tatsächlich wurde in diesen Versuchen lediglich bei den $\geq 5 \mu\text{m}$ Partikeln der At-Rest-Wert zum Zeitpunkt des Umkleidens ein einziges Mal überschritten. Beim Verlassen des Raumes war der Wert schon wieder unter den Grenzwert gefallen. Eine Clean-up-Zeit zur Erreichung des Grenzwerts war formal gar nicht nötig. Dies deutet auf einen höheren Luftwechsel als erforderlich hin, wie auch in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte [5, 6].

5. Fazit

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Verwendung eines BFPC-Messgeräts Vorteile als Ergänzung zu den klassischen Methoden der Luftkeimbestimmung bietet. Der BFPC liefert kontinuierlich Ergebnisse in Echtzeit und kann daher im Routinebetrieb frühzeitig bei einer Überschreitung von vorab individuell vom Betreiber festgelegten Grenzwerten warnen. Sie können jedoch nach aktuellem Stand der Regularien in qualifizierten Reinräumen nur zusätzlich und nicht alternativ zur klassischen Luftkeimzählung eingesetzt werden.

Ein weiterer sinnvoller Einsatzbereich ist bei der Qualifizierung von

Reinräumen zu sehen, um Zeit für die Inkubation der Agarplatten zu sparen sowie bereits bei der Inbetriebnahme Keimquellen in einem Reinraum schneller zu entdecken.

Allgemein anwendbare Grenzwerte für eine MCP-Belastung in einem Reinraum liegen derzeit noch nicht vor. An diesem Punkt fehlen konkrete Erfahrungen zum Einfluss der MCP-Werte auf die Produktqualität, da diese die herkömmliche Keimzahlmessung nicht ersetzen und somit auch nicht in unmittelbarer Relation zu KBE gesetzt werden können. Dazu sind Langzeitstudien erforderlich, um möglicherweise solche Grenzwerte für die einzelnen Reinraumklassen definieren zu können.

Da es in den Regularien noch keine Grenzwerte für MCP gibt, werden BFPC zur kontinuierlichen Überwachung von Reinräumen bisher wenig eingesetzt. Dies könnte sich ändern, sobald umfassende Langzeitstudien mit diesen Geräten im Vergleich zur klassischen Luftkeimsammlung vorliegen. Neben der Echtzeit-Ausgabe des aktuellen Bioburden-Zustands und die damit verbundene Möglich-

keit, Keimquellen im Raum aufzuspüren, ist die Kombination mit einem klassischen Partikelzähler im gleichen Gerät dennoch ein großer Vorteil dieser Messtechnik

Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Studie ist die Bestätigung früherer Technikumsstudien [10] in einem Produktionsraum der pharmazeutischen Industrie. Die darin getroffenen Aussagen zur Möglichkeit der Energiekostensparnis durch Absenkung der Luftwechselraten werden auch in dieser Studie bestätigt.

► Literatur

- [1] European Commission. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version); Belgium: Brussels, 2009.
- [2] Sandle, T. Real-time counting of airborne particles and microorganisms: A new technological wave? Clean Air and Containment Review 2012.
- [3] Hutchins, P.; Dingle M. Fundamentals of real time viable particle monitoring: How does it work? https://tsi.com/getmedia/7c01b0a0-937c-49ae-9e2d-433ee0316c42/5002134_US_WhitePaper_Real-Time-Variable-Particle-Monitoring_RevC_Web?ext=.pdf
- [4] Weber, J. et al. Continuous Microbiological Environmental Monitoring for Process Understanding and Reduced Interventions in Aseptic Manufacturing. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2019, 73, 121–134, doi: 10.5731/pdajpst.2018.008722.
- [5] Behrens, D.; Bachhofer, J.; Zipp, B.; Keck, C.; Schäfer, J.; Runkel, F. Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate, Teil 1. *TechnoPharm* 2020, 5; 284–288.
- [6] Behrens, D.; Bachhofer, J.; Zipp, B.; Keck, C.; Schäfer, J.; Runkel, F. Abreicherung von Partikeln im Reinraum in Abhängigkeit der Luftwechselrate Teil 2. *TechnoPharm* 2021, 2; 94–99.
- [7] Gail, L. und Gommel, U. *Reinraumtechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer 2018.
- [8] Prasad, A. et al. Practical Applications of Biofluorescent Particle Counting in Environmental Monitoring Investigations. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2020, 74, 318–323, doi: 10.5731/pdajpst.2019.009969.
- [9] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice*, 2004.
- [10] Behrens, D.; Schaefer, J.; Keck, C.M.; Runkel, F.E. Effects of different air change rates on cleanroom 'in operation' status. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2022, 1–37, doi: 10.1080/03639045.2022.2043352.

Der letzte Zugriff auf den Link erfolgte am 03. Juni 2022.

Chefredakteur: Claudius Arndt, Redaktion: Jennifer Trapp. Verlag: ECV · Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Baendelstockweg 20, 88326 Aulendorf (Germany). Tel.: +49 (0) 7525-940 124. E-Mail: redaktion-cp@ecv.de. www.ecv.de. Herstellung: rdz GmbH. Alle Rechte vorbehalten.

Nur für den privaten oder firmeninternen Gebrauch / For private or internal corporate use only

Cleanroom Solutions

Gemäß DIN EN ISO 14644, VDI 2083 und Annex 1: Temperatur-, Feuchte-, Strömungs-, Druck- und Partikelmessungen

Testo Industrial Services GmbH
gmp@testotis.de · Phone 07661 90901-8000
www.testotis.de/reinraum



Qualifizierung von Reinräumen

Mehr Sicherheit durch Erfahrung und Kompetenz

11 DANKSAGUNG

Zuallererst bedanke ich mich sehr herzlich bei meinen beiden Betreuungspersonen Professor Dr. Frank E. Runkel und Professor Dr. Cornelia M. Keck, die mich in den vergangenen Jahren immer hervorragend unterstützt, beraten, gefordert und gefördert haben. Die regelmäßigen Videokonferenzen und Treffen, für die sie sich immer Zeit genommen haben, waren für mich wesentliche Elemente der Inspiration und Motivation.

Weiterhin bedanke ich mich sehr herzlich bei Professor Dr. Udo Bakowsky und Professor Dr. Keywan Sohrabi für die Übernahme der Aufgabe der Gutachter sowie ihre Mitgliedschaft in der Prüfungskommission.

Herrn Professor Dr. Patrick Elter und Frau Dr. Peggy Schlupp danke ich für Ihre Zusagen und Beteiligung in der Prüfungskommission.

Bei Frau Dr. Janina Rojek, Dr. Theresa Jautzus und Dr. Sina Seidenweber bedanke ich mich für ihr stets offenes Ohr bei allen Fragen rund um das Promotionsvorhaben und die hervorragende Organisation aller Weiterbildungen und sonstiger Abläufe.

Bei meinen Kindern, meiner Mutter und meinem Bruder, all meinen Verwandten und Freunden, insbesondere allen Hasenbergern, sowie meinen Mitarbeitern in der Firma möchte ich mich dafür entschuldigen, dass ich Ihnen nichts von meinem „Geheimprojekt“ der Promotion erzählt habe. Sie waren mir, ohne es zu wissen, trotzdem immer eine große mentale Unterstützung und Hilfe.

Allen „Mitwissern“ danke ich für die lange aufrechterhaltene Vertraulichkeit. So konnte ich meinen Traum, das Geheimnis erst in der Disputation zu lüften, tatsächlich realisieren.

Bei meinem lieben Freund Professor Dr. Hermann Wätzig und seiner Frau Dr. Isa Astner sowie bei Dr. Jens Schäfer bedanke ich mich ganz besonders für viele gute Tipps und Ratschläge bei der Erstellung der Manuskripte sowie für die Lektorate.

Mein größter Dank geht an meine Frau, die mich in der gesamten Zeit der Promotion immer unterstützt hat, mir die nötigen Freiräume geschaffen hat und mir mit Ihrer Liebe und in vielen abendlichen Gesprächen immer wieder Energie und Ansporn gegeben hat, um meinen Lebenstraum zu verwirklichen. Ich bin immer wieder überglücklich, Dich an meiner Seite zu haben.