

Die Entfernung von Endotoxinen, RNase, DNase und Bakterien durch PURELAB® Chorus 1 mit Biofilter

Leistungsmerkmale des ELGA Biofilters in einer PURELAB Chorus 1

Spezifikationen

- Endotoxine <0,001 EU/ml
- RNase <0,002 ng/ml
- DNase <20 pg/ml (<0.02 pg/µl)
- Bakterien <10 KBE/100ml (<0.1 KBE/ml)

Das PURELAB Chorus 1-System produziert Reinstwasser direkt aus vorbehandeltem Wasser. Wird das System darüber hinaus mit einem speziellen Biofilter von ELGA LabWater ausgestattet, erzeugt es eine Wasserqualität, die frei von biologisch aktiven Verunreinigungen ist.

Das aufbereitete Wasser ist dadurch für biochemische Anwendungen wie beispielsweise Zellkulturen geeignet.



Endotoxine

Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS), die aus der äußeren Zellmembran lebensfähiger gramnegativer Bakterien abgegeben werden. Sie werden freigesetzt, wenn die Bakterienzelle abstirbt.

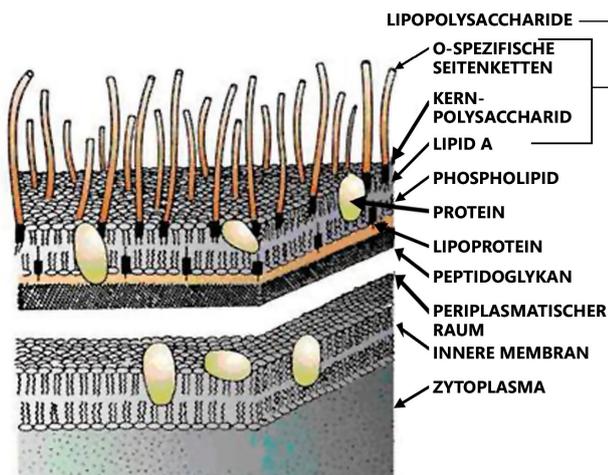


DIAGRAMM EINER GRAM-NEGATIVEN ZELLMEMBRAN

Endotoxine interagieren mit Zellen und verursachen zahlreiche schädliche Einflüsse (Lit. 1. Dawson und Lit. 2. Nagano). Anwendungen wie In-vitro-Fertilisation (Lit. 3. Dumoulin) und Zellkulturen (Lit. 4. Stacey) sind besonders gefährdet.

Durch die Beseitigung von Endotoxinen werden Experimente, die Zellteilung, Elektrophorese und weitere biochemische Verfahren involvieren, zuverlässiger.

Endotoxine sind negativ geladen bei einem pH-Wert >2 und können durch positiv geladene Filter wie den ELGA Biofilter wirksam entfernt werden. Geladene Filter behindern den Wasserfluss nur minimal und sind die bevorzugte Option für den Einsatz direkt an der Entnahmestelle, wenn sie als letzte Stufe in einer Reihe von Reinigungsverfahren angewendet werden.

Herausforderung Endotoxine

Ein Biofilter wurde durch ständiges Zuführen hoher Konzentrationen an Endotoxinen in das Zulaufwasser des positiv geladenen Filters belastet. Die Konzentration der Endotoxine im Produktwasser wurde anschließend mittels eines Limulus-Amoebocyten-Lysat-Tests (Typ kinetischer turbidimetrischer Assay) gemessen. *Limulus amoebocyte lysate test (kinetic turbidimetric assay type)*.

Die meisten Endotoxintests sind auf gereinigte Lipopolysaccharide (LPS) angewiesen. Das Forschungsteam bei ELGA LabWater stellte seine eigenen LPS mit bereits vorhandenen Bakterien im aufbereiteten Wasser her. Diese Vorgehensweise bot eine realistische Umgebung für den Endotoxintest.

Zunächst wurden die Bakterien aus dem aufbereiteten Wasser isoliert. Die Mikroorganismen wurden in Peptonwasser inokuliert und anschließend bei 27 °C inkubiert. Das Produkt wurde wiederholt autoklaviert und mittels einer 0,45 µm Filtermembran gefiltert. So wurden konzentrierte Endotoxine erzeugt.

Jeder Endotoxintest dauerte 5 Minuten und hatte die unten aufgeführten Gesamtwerte zum Ergebnis. Selbst bei mehr als 90 EU/ml und einer Gesamtbelastung von beinahe 800.000 EU konnten keine Endotoxine (<0,001 EU/ml) im Produktwasser nachgewiesen werden.

Endotoxintest (EU/ml)	0,02	2,83	14,00	48,40	90,70
Gesamt-Endotoxintest (EU)	100	14250	84250	326250	779750
Nach Biofilter (EU/ml)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Keimreduktionsfaktor	>1,3	>3,5	>4,1	>4,7	>5,0

Tabelle 1

In der Praxis wird die Konzentration von Endotoxinen im Zulaufwasser des Filters sehr niedrig sein (<0,1 EU/ml). Um diese Bedingungen zu imitieren, wurde der Filter dann über einen längeren Zeitraum mit einer nominellen Einspeisung von 1 EU/ml getestet. Nach dem Durchlauf von 800 Litern Wasser mit 1 EU/ml lag der Wert für Endotoxine unter der Nachweisgrenze (<0,001 EU/ml).

DNase and RNase

Bedenken gab es in Bezug auf das mögliche Vorliegen anderer biologisch aktiver Spezies wie RNase und DNase im aufbereiteten Wasser.

Das Vorkommen dieser Spezies im Wasser kann zu schweren Beeinträchtigungen führen. Sie werden jedoch durch Ionenaustauschmedien und oxidierende UV-Bestrahlung entfernt. Bei richtig konzipierten, ordnungsgemäß desinfizierten und gewarteten Wasseraufbereitungssystemen sind diese Moleküle nicht nachweisbar.

Intern optimierte Versionen der Ambion® Alert-Testverfahren, basierend auf spaltfähigen, fluoreszenzmarkierten RNase- bzw. DNase-Substraten, wurden zum Nachweis verwendet. Die Testergebnisse zeigen Nachweisgrenzen für RNase von nicht mehr als <0,002 ng/ml und für DNase von <20 pg/ml. Selbst bei dieser hohen Empfindlichkeit war das von der PURELAB Chorus 1 mit Biofilter produzierte Reinstwasser effektiv RNase- und DNase-frei (RNase <0,002 ng/ml, DNase <0,02 ng/ml). Auf diesem Niveau kann aufbereitetes Wasser aus einer mit Biofilter ausgestatteten PURELAB Chorus 1 anstelle von



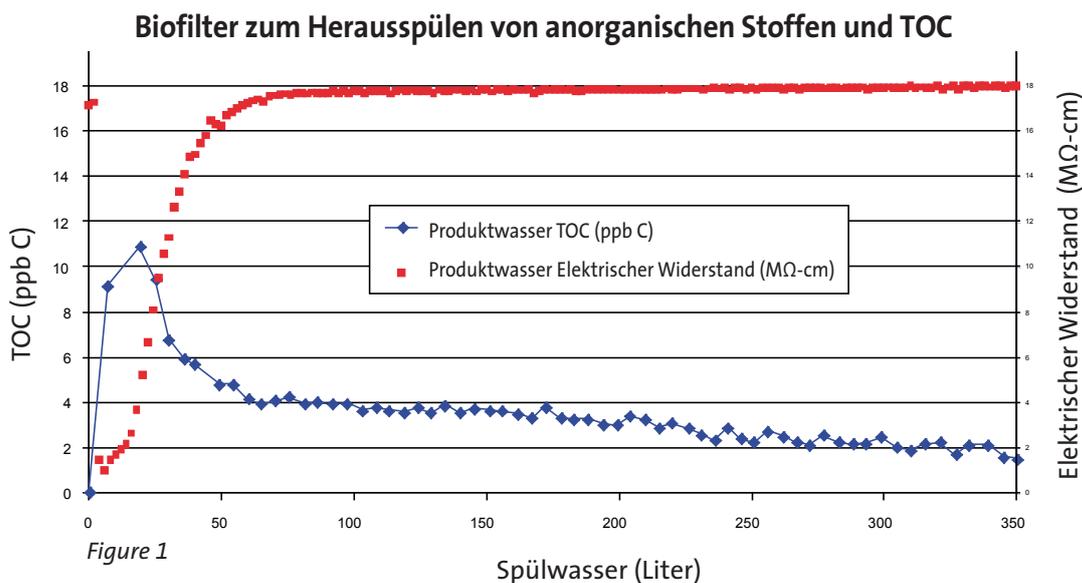
Wasser verwendet werden, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurde (die Anlage muss gemäß den Empfehlungen von ELGA LabWater regelmäßig desinfiziert und gewartet werden).

Für weitere Testzwecke wurde der Vorratsbehälter der PURELAB Chorus 1 mit 1 mg/l RNase A und DNase befüllt, um einen Faktor von > 500.000 oberhalb der Nachweisgrenze zu erreichen. Das Produktwasser war effektiv RNase- und DNase-frei (RNase <0,002 ng/ml, DNase <0,02 ng/ml).

Herausspülen von anorganischen Stoffen und TOC

Am Entnahmepunkt eingesetzte Filtermodule entfernen Endotoxine aus dem Produktwasser der Anlage und dürfen das Wasser nicht kontaminieren. Das schnelle Herausspülen von anorganischen (Elektrischer Widerstand) und organischen Stoffen (TOC) bei Filtern, die das erste Mal verwendet werden, ist sehr vorteilhaft und darüber

hinaus ein guter Indikator für einen sehr geringen Kontaminationseintrag in das Produktwasser. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die Wasserreinheit nach dem Filter nicht kontrolliert werden kann. Das schnelle Herausspülen anorganischer und organischer Stoffe durch den ELGA Biofilter ist nachstehend dargestellt.

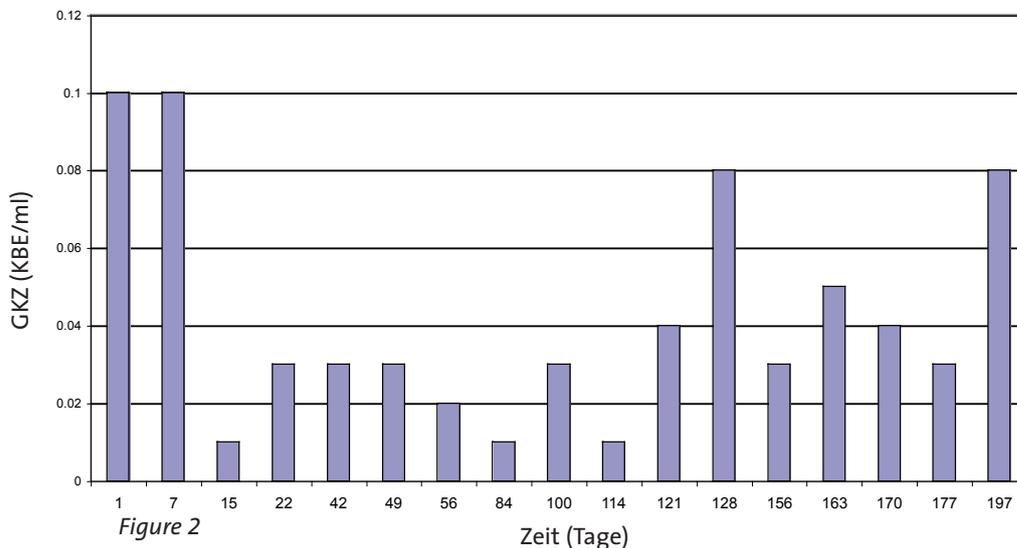


Bakterientest

Innerhalb des PURELAB Chorus 1-Systems wird die Bakterienkonzentration durch Umkehrosmose, anschließende Rezirkulation und UV-Bestrahlung bei 254 und 185 nm äußerst niedrig gehalten. Die Bildung eines Biofilms wird durch eine regelmäßige Desinfektion eingeschränkt. Letzte Spuren von Bakterien werden durch den Biofilter mit einer Porengröße von 0,2 µm entfernt. Selbst bei einem Zulaufwasser mit 107 KBE/ml entfernt der Biofilter vollständig alle Bakterien mit einem Keimreduktionsfaktor von 108.

Die typischen Werte (Gesamtkeimzahl - GKZ) eines PURELAB Chorus 1-Systems mit Biofilter über einen Zeitraum von 6 Monaten sind in nachstehender Abbildung 2 aufgeführt.

GKZ einer PURELAB Chorus 1 mit Biofilter



TECHNOLOGIE-NACHRICHT 30

Zusammenfassung

Ein mit einem ELGA Biofilter ausgestattetes PURELAB Chorus 1-System produziert auf sehr effektive Weise Reinstwasser, welches frei von biologisch aktiven Verunreinigungen ist. Das System ist für Anwendungen geeignet, bei denen Endotoxinfreies Reinstwasser, Bakterienfreies Wasser und Nukleasefreies Reinstwasser erforderlich ist.

References

Ref 1: Dawson ME (1998) LAL update. Associates of Cape Cod; Vol. 16: 1-4

Ref 2: Nagano M, Takahashi Y, Katagiri S (1999) J. Reprod. Dev.; 45: 239-242

Ref 3: Dumoulin JC, Menheere PP, Evers JL (1991) Human Reproduction; 6: 730-734

Ref 4: Stacey G (2007) in Medicines from Animal Cell Culture. Stacey G, Davis J. John Wiley & Sons, Chichester, Chapter 31