

Die Entfernung von Endotoxinen, RNase, DNase und Bakterien durch PURELAB flex mit Biofilter

Leistungsmerkmale des ELGA Biofilters mit einer PURELAB flex

Spezifikation

- 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 flex System stellt ultrareines Wasser direkt aus einer Trinkwasserleitung zur Verfügung. Wenn er mit einem ELGA LabWater-Biofilter ausgestattet ist, spendet er Wasser, das effektiv frei von biologisch aktiven Verunreinigungen ist.

Dadurch wird gewährleistet, dass das Wasser zum Einsatz bei biochemischen Anwendungen wie Zellkulturen geeignet ist.

Endotoxine

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

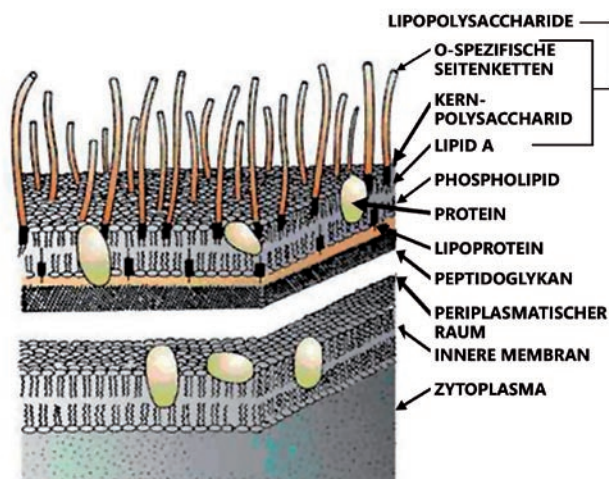


DIAGRAMM EINER GRAM-NEGATIVEN ZELLMEMBRAN

Endotoxine sind ab einem pH-Wert >2 negativ geladen und können durch positiv geladene Filter - wie dem ELGA LabWater Biofilter - wirksam entfernt werden. Geladene Filter bieten eine minimale Verringerung des Wasserflusses.

Als letzte Aufbereitungsstufe sind die Filter 1. Wahl bei Point-of-Use-Anwendungen.

Endotoxine interagieren mit Zellen und sind Verursacher von schädlichen Wirkungen (Lit. 1. Dawson und Lit. 2. Nagano). Dabei handelt es sich bei den Anwendungen wie In-vitro-Fertilisation (Lit. 3. Dumoulin) und Zellkulturen (Lit. 4. Stacey) um äußerst kritische Bereiche.

Durch die Beseitigung von Endotoxinen werden biochemische Störfaktoren verringert und Experimente (z. B. Elektrophorese) sicherer.

Herausforderung Endotoxine

Der Biofilter wurde durch ständiges Zufügen hoher Konzentrationen an Endotoxinen im Wasser zu einem positiv geladenen Filter geführt. Die Konzentration von Endotoxinen wurde anschließend im Produktwasser mittels eines Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (Typ kinetischer turbidimetrischer Assay) gemessen.

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 stellte eine realistische Umgebung für den Endotoxintest dar.

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 0,45µm Filtermembran gefiltert. So wurden konzentrierte Endotoxine erhalten.

Jeder Endotoxintest dauerte 5 Minuten und hatte die unten aufgeführten Gesamttestwerte zum Ergebnis. Selbst bei mehr als 90 EU/ml und einer Gesamtbeladung 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

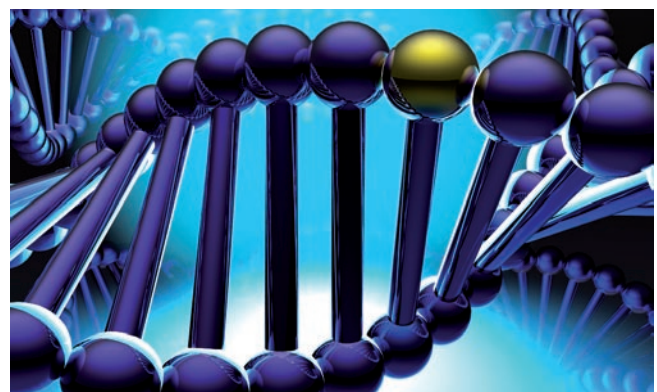
In der Praxis wird die Konzentration von Endotoxinen im Speisewasser zum Filter sehr niedrig sein (<0,1 EU/ml). Um diese Bedingungen zu imitieren, wurde der Filter dann über einen längeren Zeitraum mit einer nominellen Einspeisung von 1 EU/ml getestet. Nach dem Durchlauf von 800 Litern Wasser mit 1 EU/ml 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 kann im Wasser zu schweren Beeinträchtigungen führen. Diese werden jedoch durch Ionenaustauschmedien und oxidierende UV-Bestrahlung entfernt. Bei richtig konzipierten, ordnungsgemäß sanitisierten und gewarteten Wasseraufbereitungssystemen werden diese Moleküle nicht gefunden.

Anwendungsoptimierte Vorschriften des Ambion® Alert-Testverfahrens wurden auf Basis von schneidbaren, fluoreszenzmarkierter RNase- bzw. DNase-Substraten zum Nachweis verwendet. Die Testergebnisse zeigen Nachweise für RNase von nicht mehr als <0,002 ng/ml und für DNase von <20 pg/ml. Selbst bei diesen Werten war das von dem mit einem Biofilter ausgestatteten PURELAB flex System



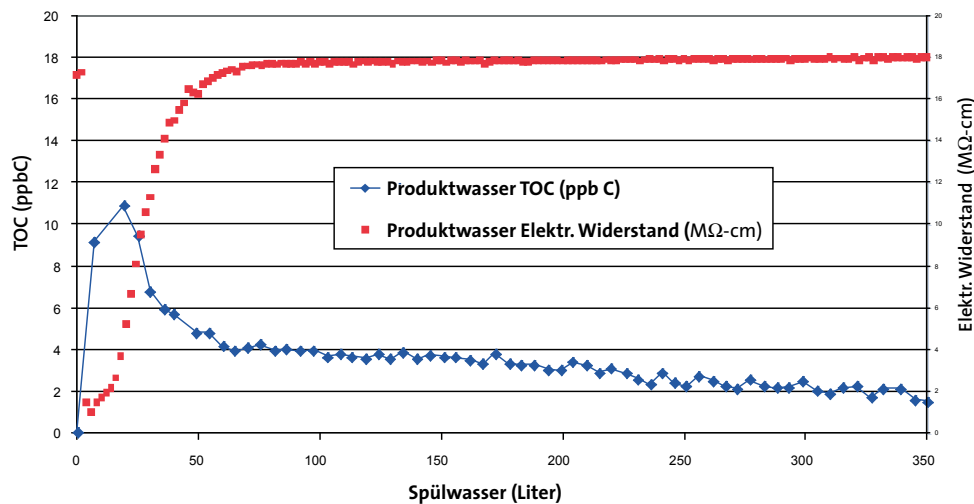
produzierte Reinstwasser effektiv RNase- und DNase-frei (RNase <0,002 ng/ml, DNase <0,02 ng/ml). Auf diesem Niveau kann aufbereitetes Wasser mit einem Biofilter ausgestatteten PURELAB flex System verwendet werden statt mit Diethylpyrokarbonat-Behandlung (DePc), d. h. regelmäßige Sterilisierung und Wartung gemäß den ELGA-LabWater-Empfehlungen.

Herausspülen von anorganischen Stoffen und TOC

Neben der Entfernung von Endotoxinen im Produktwasser dürfen Point-of-Use-Geräte das Wasser nicht kontaminieren. Das schnelle Herausspülen von anorganischen (Elektrischer Widerstand) und organischen Stoffen (TOC), bei Filtern die das erste Mal verwendet werden, stellt sich als sehr zweckmäßig dar. Darüber hinaus bietet sich hiermit

eine gute Indikation für einen sehr geringen Kontaminationseintrag in das Produktwasser. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die Wasserreinheit nicht nach dem Filter kontrolliert werden kann. Das schnelle Herausspülen anorganischer und organischer Stoffe durch den ELGA - Biofilters ist nachstehend dargestellt.

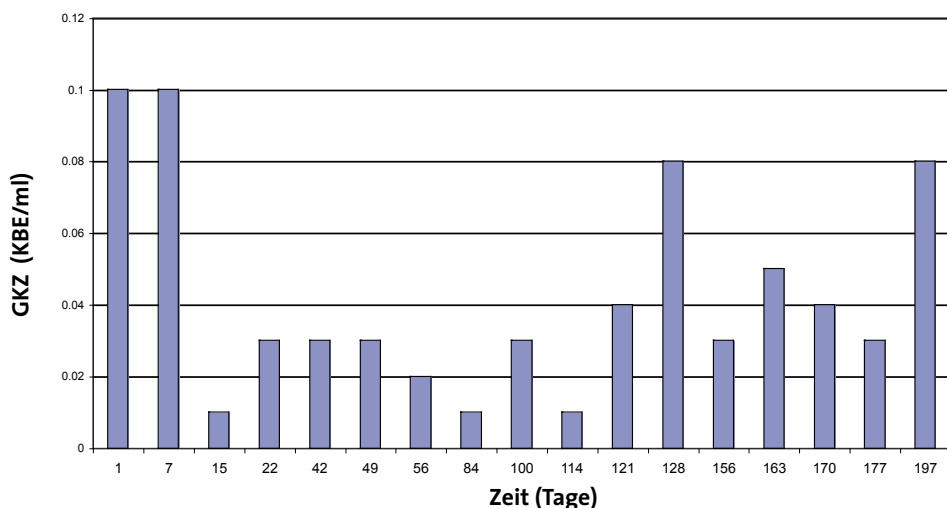
Neuer Biofilter zum Herausspülen der Gesamtkonzentration organischer Substanzen (TOC) und der Resistivität



Bakterientest

Innerhalb des PURELAB flex-Systems werden die Bakterienkonzentrationen durch eine UV-Kammer und Exposition mit intensivem UV-Licht bei 254 und 185 nm äußerst niedrig gehalten. Letzte Spuren von Bakterien werden durch den Biofilter entfernt, der eine bakterielle Filtrierung von 0,2µm bietet. Wenn er mit einer Einspeiselösung von 1×10^7 CFU/ml provoziert wurde, entfernte der Biofilter Bakterien entsprechend eines Keimreduktionsfaktors von >8 vollständig.

Die typischen Werte (Gesamtkeimzahl - GKZ) eines mit einem Biofilter ausgestatteteten Geräts über einen Zeitraum von 6 Monaten sind in der Grafik unten dargestellt.



TECHNOLOGIENACHRICHT 20

Zusammenfassung

Ein mit einem ELGA - Biofilter ausgestattetes PURELAB flex 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 Nuklease-freies Reinstwasser erforderlich ist.

Literatur

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