

Anvendelse af membranfiltrering til sterilisering af drikkevand for forsøgsdyr, der lever under kontrollerede forhold

Af *Benny Bjerregaard*, MILLIPORE Scandinavia

(København, Göteborg, Oslo, Helsingfors)

Et af de grundproblemer, man står overfor ved pasning af forsøgsdyr, der lever under kontrollerede betingelser, er at kunne forsyne dyrene med et ukontamineret drikkevand. Metoder som klorering og syring bliver anvendt, men hvor sterilitet ønskes/kræves, bruges som oftest autoklaving. Autoklaving er imidlertid forbundet med en del besværlige manipulationer, herunder påfyldning på flasker og efter selve autoklavingen, indslusning i det kontrollerede område – eventuelt også overførsel fra flasker til selve fødesystemet til dyrene og endelig dispensering til dyrene. Autoklaving er også dyr både i forbrug af arbejdskraft og energi. Steriliseringen må nødvendigvis foretages portionsvis i stedet for »on-line« og kontinuerligt.

Et lettere og billigere alternativ er at sterilisere ved hjælp af membranfiltrering og især ved brug af de sterile klar-til-brug enheder, der idag er på markedet. I det følgende gennemgås principper for og en række løsninger med membranfiltrering af drikkevandet til dyrene.

Filtertyper:

Filtre kan opdeles i to grupper: dybdefiltre og net (screen) filtre i overensstemmelse med deres virkemåde.

DYBDEFILTRE består af et sammenpresset materiale, eksempelvis fibre eller partikler. Herved danner materialet nogle tilfældige passager, hvorigennem væsken kan løbe. Urenheder opfanges i filtermaterialet bl. a. ved adsorption til dette. Dybdefiltre har ifølge sagens natur ikke nogen porestørrelse, hvorfor man eksperimentelt må bestemme en nominal tilbageholdelsesgrad for en given kornstørrelse (under kontrollerede tryk og strømningsforhold). Dybdefiltrets force ligger deri, at det har en stor smudskapacitet – dog kan de tilbageholdte kontaminanter langsomt blive presset dybere og dybere ned og til sidst helt igennem filtermaterialet. Selve filtermaterialet vil under uheldige omstændigheder kunne løsrive sig og overføres til filtratet.

NETFILTRE fungerer i princip som en almindelig køkkensi. Det tilbageholdte materiale befinder sig på overfladen af det størrelsesmæssige veldefinerede net.

MEMBRANFILTRET kan karakteriseres som en mikroporøs si. Det kan porestørrelse-bestemmes og garanterer herved en 100 % tilbageholdelse af partikler og mikroorganismer større end den angivne porestørrelse – dette uafhængigt af tryk og strømningsforhold. Filtermateria-

let er et hele, hvorfor der ikke er noget, der kan løsrives og derved afgives til filtratet. Den homogene struktur hindrer også, at mikroorganismer vokser igennem. Millipore membranfiltre er fremstillet af biologisk inaktive cellulose esthere eller andet polymert materiale, der sikrer brugeren forskellig kemisk modstandsdygtighed. Membranfilter type GS (general sterilization) har en pore størrelse på 0,22 μm ($\pm 0,02 \mu\text{m}$) og bruges normalt til sterilisering af vand og vandige opløsninger. Da den mindste bakterie (tilhørende pseudomonas familien) har en gennemsnitlig minimum-diameter på 0,3 μm , er det altså nødvendigt at bruge et filter med mindre pore størrelse for at sikre en 100 % tilbageholdelse og dermed sterilitet. Dybdefiltre bør ikke anvendes til steriliseringsformål, da de ikke kan garantere en 100 % tilbageholdelse, og der kan naturligvis ikke tales om et eks. 98 % sterilt vand. Derimod er dybdefiltre velegnede til beskyttelse af membranfiltre, idet de vil forlænge levetiden ved at forfiltrere det meste smuds fra. Normalt anvendes et 0,5 μm nominelt glasfiber dybdefilter til beskyttelse af et 0,22 μm membranfilter.

Trykkilder

En filtrering kræver naturligvis en trykdifferens over filtersystemet for at få en væskestrøm igennem. Ved sterilisering af hanevand bruges blot hanetrykket, men hvor der er tale om tilberedninger, eksempelvis til sætning af næringsmidler, bruges der et reservoir (tryktank), hvorfra vandet så presses gennem filtersy-

stemet ved hjælp af overtryk i form af luft/gas eller pumpe.

Større volumina, der eksempelvis har gennemgået en renseproces (destillation, omvendt osmose), kan fremføres til de ønskede rum eller afdelinger fra en opsamlingsbeholder ved hjælp af en pumpe og helst i et recirkulations-kredsløb (stabiliserer trykforholdene ved åbning og lukning af tappepunkter). Den anvendte pumpe bør være af sanitær udførelse, hvilket vil sige let adskillelse og rengøring.

Dimensionering af system

Ved sammensætning af et filtersystem må der tages hensyn til bl. a. følgende forhold: ønsket filtreringshastighed, total kapacitet, arbejdstryk. Filtreringshastighed og total kapacitet er direkte proportionelle med filterarealet. Hastigheden er også proportional med arbejdsstrykket, men aftager i takt med, at filtret tilstopper. Et filter kan anses for tilstoppet, når det ikke længere kan levere det ønskede flow med det givne tryk i systemet. Specielt ved gnotobiologisk arbejde er totalkapaciteten vigtig, da et for tidligt tilstoppet filter vil betyde en afbrydelse ved filterskift og med deraf påfølgende risiko for kontaminering. Ved dimensionering af større anlæg foretages der gerne en filtreringstest, udfra hvilken det så er muligt at sammensætte det mest effektive og økonomiske system.

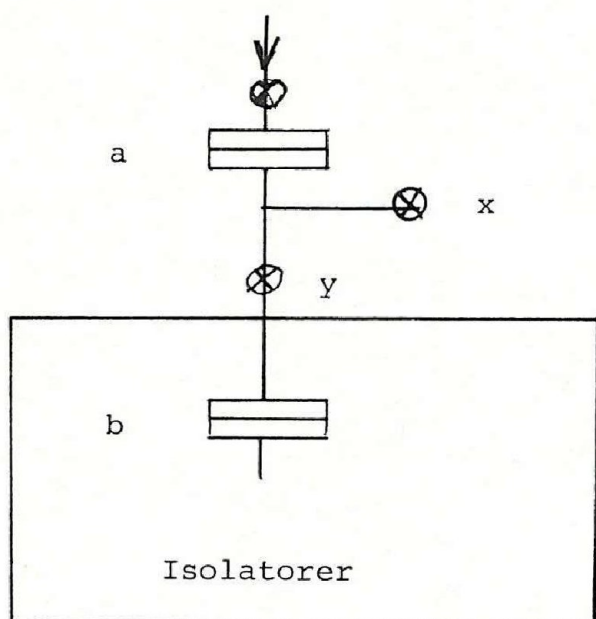
Sterilitet

Ved sterilfiltrering skal filtersystemet selvfølgelig også være sterilt. Dette opnås enten ved simpelthen at

bruge de nævnte klar-til-brug enheder, der er præsteriliserede og som bortkastes efter brug, eller man steriliserer sit filtersystem rent fysisk, normalt ved at foretage autoklavering ved 121°C i passende tidsrum. Sterilisering kan også foregå kemisk ved hjælp af ethylen-oxid, formalin eller natrium-hypochlorit. Senere i artiklen nævnes nogle eksempler, hvor pereddikesyre har været anvendt med godt resultat.

Eksempler på filtersystemer

På fig. 1 er vist et Duplex arrangement, hvor to sterilfiltre sidder i serie – et udenfor og et indenfor isolatoren. Dette princip giver den fordel, at man ved en eventuel tilstopning af første filter ikke behøver at



Duplex filtersystem

- a. Tilgangsfilter (behøver ikke være sterilt).
- b. Sterilt slutfilter.
- xy. Ventiler, der tillader filterskift og evt. tilledning af kammer-steriliseringsmiddel.

bryde sterilitet og isolation for at skifte dette.

Millipores Millex (0,22 μ), 25 mm i diameter, engangsfiltre i den nævnte opstilling er velegnede til føddning af et enkelt dyr, f. eks. mus, for forsøg i en størrelsesorden af tre ugers varighed. (Millex sterilfiltrerer også let ved hjælp af en sprøjte).

Til større fødemængder, eksempelvis til isolatorer, med 2–3 mus eller en enkelt rotte, er filter og holder i 47 mm passende. Holdere i denne størrelse leveres ikke præsteriliserende klar-til-brug, hvorfor man selv må foretage sterilisering ad kemisk vej eller ved hjælp af autoklave. Ved filterskift er det ikke nødvendigt at sterilisere det yderste filter. Eksperimentvarighed 6 uger eller mere.

Millipore Twin-90 (2×90 mm i diameter) er igen et præsteriliseret engangsfilter-og-holder i et. Det kan karakteriseres som det måske mest anvendelige filter til gnotobiologisk og SPF dyrepassning, idet Twin-90 er passende for en inkubator indeholdende eksempelvis 5 lag a 5 mus eller 2×3 rotter. I nyligt afsluttede forsøg gav Twin-90 sterilt vand igennem 14 uger.

Store mængder vand som til central føddning af SPF-rum, afdelinger, etc. eller for isolatorer med større dyr kræver et stort flow og derfor større filteroverflader. Her bruges cartridge filtre (patroner), der i forbindelse med slutfilter på de enkelte tappesteder klarer opgaven – se venligst fig. 2–3. I Europa er der systemer i brug, der kontinuerligt leverer sterilt vand til SPF afdelinger med op til 30.000 dyr og med total mængde på over 200.000 m³.

Typisk system til centralforsyning i SPF rum

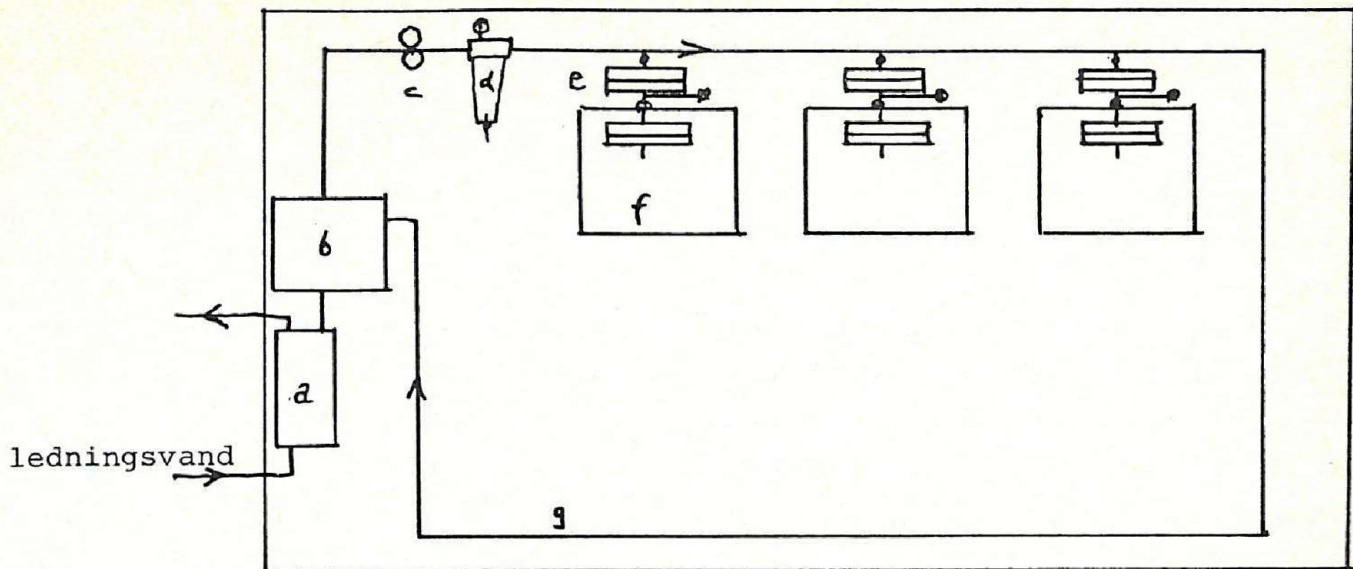


Fig. 2.

- a. Omvendt Osmose vandbehandling
- b. Reservoir tank
- c. Pumpe
- d. Forfilter patron
- e. Duplex filtre
- f. Isolatorer
- g. Recirkulationsloop

Autoklaving skal foregå med en ikke-pulserende cyklus. Detaljeret vejledning følger med filterholderne, men følgende generelle punkter kan fremhæves:

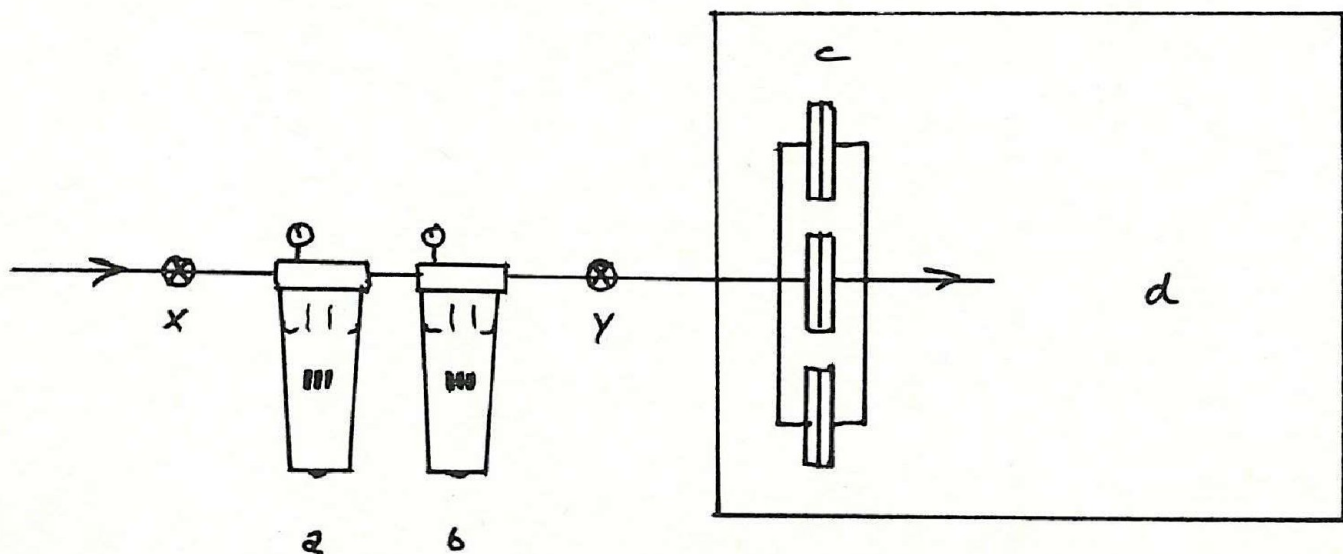
System Sterilisering

Det simpleste er at anvende engangsfilter-enhederne, men hvor man af økonomiske grunde foretrækker at bruge filterholdere (plast eller stål) og løse filtre – ja, her må der foretages sterilisering.

Typisk on-line system for større dyr i isolation (kalv/gris)

Fig. 3.

- a. Forfilter grov (0,8 my)
- b. Forfilter fin (0,3 my)
- c. Twin-90 sterilfilter
- d. Isolatorer
- xy. Ventiler, for udskiftning af filtre



1. Overstig ikke 121°C.
2. Brug ikke hurtig evakuering – vakuum/damp pulsering vil kunne strække membranfiltrene og eventuelt ødelægge dem.
3. Filterholderen spændes »let« før autoklaving og efterspændes før brugen. Det giver membranfiltrene mulighed for at arbejde.
4. Dampen må ikke indeholde aromatiske aminer, da disse ødelægger cellulose membranerne.
5. Grundig rensning af filterholdere og efterskylning til fjernelse af vaskemidler og andre alkaliske forbindelser før autoklaving er vigtig.
6. Tildæk ind- og udgange med kraftpapir, ikke uigennemtrængeligt alu-folie el. lign.

In-line dampsterilisering kan kun foretages med filterholdere af en speciel konstruktion, der beskytter membranen.

Kemisk sterilisering

Da det er let og da der i øvrigt er et stigende forbrug af kemiske steriliseringsmidler, er der gjort forsøg med at udarbejde optimale metoder ved brug af pereddikesyre i forbindelse med membranfilter-systemer. Resultaterne har været helt igennem tilfredsstillende, og det følgende giver en summering, der vil kunne bruges som rettesnor.

- a. 4 % pereddikesyre (vandig) opløsning. Hele filtersystemet fyldes op inkl. tilhørende slanger etc. og henstår i 30 minutter. Herefter skylles med maksimalt flow i andre 30 minutter. Både

pereddikesyre og vand skal være filtreret før at beskytte filtret mod tilstopning.

- b. Pereddikesyre damp er nok den mest effektive måde at sterilisere filtersystemer på. Hele systemet inkl. isolatorer kan nemlig inline steriliseres, og der findes automatiske dampgeneratorer på markedet, eksempelvis »Sterivap GL« (Cie Aerovap., 19, Rue de la Varenne, 94100 Saint Mauer, Frankrig). Der anvendes normalt en 10 % opløsning. Før selve fordampningen opvarmes opløsningen til 40°C. Bæregassen er normalt trykluft. Afhængig af systemets størrelse er kontakttiden ca. 2 timer ved damp flow på op til 120 lpm. Før filtersystemet tages i anvendelse anbefales en afgangningsperiode på 5–6 timer.

- c. Pereddikesyre spray. Normalt er en 2–10 % opløsning velegnet til sterilisering af uvendige overflader på filterhuse før introduktion i det sterile miljø. Da det vil være svært at få tilstrækkelig kontakt indvendig i filterholderne, bruges spray kun til eksterne overflader, og her er en kontakttid på 20–30 minutter tilstrækkelig.

Vandbehandling

Hvor der ønskes en oprensning af vandforsyningen, bruges normalt destillation eller eventuelt ionbytning. Et nyt alternativ er omvendt osmose, der vil reducere indholdet af opløste stoffer, ligesom det mikrobielle indhold fjernes fra råvandet.

Det er udenfor denne artikels ramme at beskrive denne teknik, men det kan ganske kort nævnes, at der er tale om en membranteknik, og at der tilbageholdes organisk materiale, ioner, mikroorganismer og partikler. Kun vandmolekylerne passerer, og »filtratet« opsamles i et reservoir og /eller bruges. Detaljeret litteratur kan rekvireres.

Konklusion

Membranfiltrering er – ikke mindst med tanke på energi- og arbejdskraftbesparelser – et økonomisk og sikkert alternativ som metode for oprensning og sterilisering af drikkevand til forsøgsdyr, der lever under kontrollerede betingelser.

Som vist kan dette ske on-line og kontinuerligt direkte til det/de enkelte dyr.

SCAND-LAS NYE AUDIOVISUELLE PROGRAMMER

Laboratory Animals: Handling and Basic Techniques

1. The Laboratory House
2. The Laboratory Rat
3. The Laboratory Rabbit
4. The Laboratory Cat
5. The Laboratory Dog

Hvert program består af 36 dias og 1 kassettebånd med engelsk kommentar. Manuskript til den engelske tekst medfølger. Pris pr. program Nkr. 345,-; Nkr. 1.550,- for alle fem programmer. Priserne er excl. forsendelsesomkostninger.

Serien kan bestilles ved at udfylde og indsende nedenstående kupon til: Universitetsforlaget, Postbox 7508, Skillebek, N-Oslo 2.

Rlg. programmer ønskes tilsendt:

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1. The Laboratory Mouse | <input type="checkbox"/> |
| 2. The Laboratory Rat | <input type="checkbox"/> |
| 3. The Laboratory Rabbit | <input type="checkbox"/> |
| 4. The Laboratory Cat | <input type="checkbox"/> |
| 5. The Laboratory Dog | <input type="checkbox"/> |

.....
Navn

Adresse