

Archiv für Hygiene und Bakteriologie

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG, MÜNCHEN-BERLIN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung vorbehalten

Aus der filtertechnischen Forschungsabteilung der Seitz-Werke GmbH
(Leiter: Dr. H. Wilke)

und dem Medizinaluntersuchungsamt Trier
(Leiter: Med.-Rat Dr. J. Albrecht)

6

Adsorptionsfiltration von Viren mit Seitz-Entkeimungsfiltern

1. Teil

Von H. Wilke und J. Albrecht

Mit 1 Abbildung

Auf dem Gebiet der Virusfiltration sind in den letzten 30 Jahren viele interessante Untersuchungen durchgeführt und dabei wichtige Ergebnisse gewonnen worden. In manchen Fällen zeigten sich jedoch gewisse Widersprüche, die vielleicht dadurch zu erklären sind, daß bei der Auswertung der Versuche die Elementarvorgänge in den benutzten Filter nicht immer genügend berücksichtigt wurden.

Die „Filtration“* kleiner Partikel ist bei keinem der bekannten Filtermedien ausschließlich eine Folge der Porengröße. Selbst in den Filtermembranen, welche die allgemeine Vorstellung von einer „Siebung“ der Teilchen noch am ehesten verwirklichen, treten komplizierte Sorptionsvorgänge auf, die in Verbindung mit den meist hinzutretenden Verstopfungserscheinungen zu Fehlschlüssen führen können. Membranfilter sind nur in makroskopischer Sicht zweidimensionale Siebe mit rein mechanischer Trennwirkung. Deshalb sollten Versuche über die Größenbestimmung von Viren auch hier nur unter Berücksichtigung aller physikalisch-chemischen und kolloidchemischen Filtervorgänge ausgewertet werden.

Noch komplizierter wird die Beeinflussung des Filtervorganges bei starren Tiefenfiltern, die vorwiegend aus keramischem Material gefertigt werden. Hierzu rechnen Chamberlandkerzen (Porzellanmasse), Berkefeld-

* In der älteren mikrobiologischen Literatur spielt der Begriff „filtrierbar“ eine besondere Rolle zur Charakterisierung der Viren. Dieser Begriff sollte jedoch heute nur noch in der Bedeutung gebraucht werden, die in Übereinstimmung mit der allgemein gültigen Nomenklatur in Wissenschaft und Technik steht³. Danach sind Partikel „filtrierbar“, wenn sie in oder auf einem Filtermedium abgeschieden werden. Die Teilchen, die mit der flüssigen oder gasförmigen Phase das Filter passieren, dürfen demnach nicht als „filtrierbar“ bezeichnet werden, wie dies gelegentlich noch geschieht.

filter (gefrittete Kieselgur) und Glasfritten (Schottfilter). Bei diesen Filtermedien ist ebenfalls weniger die physikalisch bestimmte, mittlere Porengröße für den Filtrationseffekt maßgebend als eine Reihe anderer filtrationsbeeinflussender Faktoren. Wegen der für virologische Arbeiten meistens gewählten geringen Porenweiten spielt dabei die nie völlig auszuschaltende Blockierung der Durchgänge durch Begleitstoffe und Verunreinigungen der Substrate sowie durch die Mikroorganismen selbst eine besondere Rolle.

Besonders unübersichtlich scheinen jedoch die Verhältnisse bei der dritten Gruppe der Entkeimungsfilter, nämlich bei den Seitz-Filter-schichten zu liegen. Hier handelt es sich um lockere Tiefenfilter mit nicht definierter Porenausbildung, bei denen von einer siebartigen Beeinflussung so kleiner Partikel wie Viren nicht gesprochen werden kann. Wie unten ausgeführt, handelt es sich um teilweise adsorptiv wirkende Filter, die für Arbeiten in der Praxis den Vorteil der geringen Neigung zur Verstopfung haben.

Für jedes dieser drei Filtermedien bestehen bestimmte Verwendungsmöglichkeiten. Sollen durch Filtrationsversuche Werte für Teilchengrößen und Teilchenzahlen bestimmt werden, so können dazu nur Membranfilter mit sorgfältig gestuften Porenradien herangezogen werden^{4, 5, 11}. Für die Reindarstellung von Virussuspensionen sind neben Membranen auch keramische Filter verwendbar, wenn kleine Flüssigkeitsmengen vorliegen. Für Arbeiten mit größeren Substratmengen kommen vorwiegend Seitz-Filter in Frage.

In jedem Fall müssen die Auswirkungen der in den Substraten vorhandenen löslichen und unlöslichen Begleitstoffe auf die Filtration einer sorgfältigen Prüfung unterzogen werden, bevor über die Brauchbarkeit eines Filterverfahrens für einen bestimmten Zweck entschieden wird. In weitgehendem Maße erfüllt die Arbeit von Uecker¹⁶ über Membranfilter in der Bakteriophagenfiltration diese Forderung.

Aufbau und Wirkungsweise der Seitz-Filter.

Seitz-Entkeimungsschichten sind 4 bis 6 mm dicke, poröse Filterkartons, die aus einer Mischung von Zellulosefasern mit fein fibrilliertem Asbest bestehen. Diese bilden ein Gerüst mit vorwiegend in einer Ebene ausgerichteten Fasern. Auf physikalischem Wege kann man aus Durchflußmessungen einen fiktiven mittleren Porendurchmesser bestimmen, der bei den EKS-Schichten zwischen 1,2 und 1,5 μ schwankt. Wenn auch nicht von definierten Poren gesprochen werden kann, so muß doch ein Kanalsystem mit mittleren Wandabständen in der gemessenen Größenordnung vorliegen. Da die meisten Viren ein bis zwei Zehnerpotenzen kleiner sind und da es möglich ist, diese Partikel ohne Verstopfung des Filtermediums abzufangen, kann ein Siebvorgang zur Erklärung der Sorption in Seitz-Schichten nicht herangezogen werden. Vielmehr ist anzunehmen, daß im wesentlichen Adsorptionsvorgänge für den Filtereffekt maßgebend sind^{2, 8, 17}.

Die Adsorptionsfähigkeit der Asbestfaserschichten ist für Kolloide sowie für klein- und großmolekulare Verbindungen nachgewiesen worden. Von praktischer Bedeutung ist das Adsorptionsvermögen der Seitz-Entkeimungsschichten für die Entfernung von Pyrogenen aus wäßrigen Injektions- und Infusionslösungen¹⁹.

Das Gefüge einer Seitz-Entkeimungsschicht stellt einen Kapillarraum dar. In ihm werden durch die Faseroberflächen, die das Kanalsystem begrenzen, adsorptive Bindungen bewirkt. Solche Bindungen, gleichgültig welcher Natur sie sind, können nur erfolgen, wenn die zu bindenden Partikel in den Bereich des Kraftraumes der Faseroberflächen gelangen, also praktisch damit in Berührung kommen. Durch die große Zahl der Umleitungen der Flüssigkeitsfäden werden im Fasergerüst derartige Zusammenstöße begünstigt. Sie werden um so häufiger auftreten, je dichter die Schichten gepackt sind. Deshalb adsorbieren ESK-II-Schichten meist besser als die durchlässigeren EKS-Schichten. Andererseits ist auf diese Weise die merkliche Verminderung der Abscheidung von Teilchen aus viskosen Dispersionsmedien zu erklären. Da die Beweglichkeit der Partikel herabgesetzt ist, sind auch die Zahl der Zusammenstöße mit den Fasern und damit die Adsorption vermindert.

Dank der Adsorptionswirkung der asbesthaltigen Filterschichten können also Viren mit diesen verhältnismäßig grobporigen Filtern abgefangen werden. Das hat den Vorteil, daß relativ große Filtriergeschwindigkeiten im Vergleich zu Siebfiltern erreicht werden und gleichzeitig eine geringe Neigung zur Verstopfung den Filtrationsverlauf begünstigt.

Filtertechnische Aufgaben und filtrationsbeeinflussende Faktoren

Die Durchlässigkeit der Seitz-Filterschichten für Mikroorganismen der Größenordnung unter $0,1 \mu$ wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt^{1, 2, 10, 13, 17}. Tatsächlich ist es möglich, zu erreichen,

- a) daß Viren in den Asbestfaserschichten zurückgehalten werden, so daß man ein virusfreies bzw. virusarmes Filtrat erhält;
- b) daß Viren, nicht aber größere Partikel (z. B. Bakterien) die Schichten passieren. Das Resultat ist eine bakterienfreie, virushaltige Suspension.

Entsprechende Filteraufgaben, deren Effekte im Gegensatz zueinander stehen, werden heute von der Praxis gestellt. Die Aufgabe der Viruseliminierung ergibt sich zum Beispiel bei der Gewinnung von Trinkwasser aus Oberflächenwässern, die in beachtlichem Maß durch menschenpathogene Viren kontaminiert sein können^{7, 12}. Die Lösung dieser Aufgabe ist besonders schwierig, weil große Mengenleistungen erforderlich sind. Auf der anderen Seite steht das — etwa für die Produktion von Virusimpfstoffen bedeutende — Problem, reine Virussuspensionen möglichst ohne Titerverlust zu gewinnen, die frei von Bakterien und Geweberesten sind. Während frühere Untersuchungen sich vornehmlich auf die Filtration kleiner Substratmengen (bis 100 ml) beschränkten, ist den oben

genannten Aufgaben die Forderung nach wesentlich größeren Filtratmengen gemeinsam.

Hinweise zur Beeinflussung der Adsorption in den Filtern geben die allgemein gültigen Regeln, die in der Tabelle 1 auf die Verhältnisse der Seitz-Filtration übertragen wurden. Diese keineswegs vollständige Aufstellung läßt erkennen, wie groß die Anzahl der Parameter ist, die den Vorgang der Adsorptionsfiltration bestimmen können. Jede Adsorption führt früher oder später zur Einstellung eines Gleichgewichtes, das im wesentlichen durch die Konzentration des zu adsorbierenden Stoffes (Adsorptiv) und die Menge des Adsorbens bestimmt wird. Da das Adsorbens im vorliegenden Fall die Filterschichten sind, ist es sinnvoll, alle Versuche auf die Einheit der Filterfläche zu beziehen. Da ferner die meist unbekannte Konzentration des Adsorptivs zwangsläufig mit der Flüssigkeitsmenge gekuppelt ist, dient die pro Flächeneinheit durchgesetzte Flüssigkeitsmenge, die man als Filterbelastung bezeichnet, zur filtertechnischen Kennzeichnung des Adsorptionsvorganges, wenn ihr entsprechende Durchbruchswerte zugeordnet werden.

Zur Durchführung der früher erwähnten Aufgaben ist somit folgendes anzustreben:

- a) Für die Trinkwasserfiltration muß die ursprüngliche Adsorptionskraft der Filterschichten möglichst lange erhalten bleiben. Das Adsorptionsgleichgewicht soll erst nach großer Filterbelastung erreicht werden.
- b) Für die Reindarstellung von Virussuspensionen muß durch adsorptionsverhindernde Zusätze das Adsorptionsgleichgewicht so weit wie möglich an den Anfang des Filtrationsprozesses verschoben werden. Die Inaktivierung der Filterschichten sollte derart erfolgen, daß zwar noch alle Bakterien und Fremdstoffe zurückgehalten werden, Viren aber schon nach geringer Filterbelastung passieren.

Praktische Erfahrungen bei der Gewinnung bakterienfreier Virussuspensionen mittels Seitz-Filtration

Einer der ersten, die sich der Seitz-Filter bedienten, um Bakterien von Viren zu trennen, war Waldmann (zit. 8) bei der Gewinnung der Maul- und Klauenseuche-(MKS-)Vakzine. Da das Verfahren auch heute noch praktisch unverändert geübt wird, sollen an seinem Beispiel die Grundlagen der Reindarstellung einer Virussuspension in größerem Maßstab beschrieben werden.

Der zentrifugierte wäßrige Auszug eines aphthös veränderten Zungenepithels (7,5 kg 100 l) wird zunächst durch Seitz-Klärschichten „K 7“ vorfiltriert, um grob- und kolloiddisperse Trübungsstoffe zu entfernen. Hierbei ist der Virusverlust nur gering, sofern die K 7-Schichten nicht überlastet und dabei verstopft werden. Man filtriert deshalb meist nicht mehr als 175 l/m² in der Klärstufe. Nach ordnungsgemäßer Vorklärung erfolgt die Filtration durch Seitz-EKS-Schichten, deren Normalbelastung hierbei 127.5 l pro m² Filterfläche beträgt. Auch nach dem Passieren der EKS-Schichten sind in den meisten Fraktionen des Filtrats die gleichen Virustiter wie in der Ausgangssuspension festzustellen.

Tabelle 1: Adsorptionsbeeinflussende Faktoren

Adsorpt. Partner	allgemeine Faktoren	Seitz-Entkeimungsfilter	Filtrationseinfluß
Adsorbens	Adsorptionsmaterial (Adsorbens)	Zellstoff-Asbest in unterschiedlichem Mischungsverhältnis	A. abhängig von Schichtensorte: Je höher der Asbestgehalt, um so stärker die Adsorption, die in der Reihenfolge EK-EKS-EKS-I-EKS-II zunimmt.
	Verteilungszustand (spezifische Oberfläche)	Faden-Kapillarraum in 4—6 mm dicker Schicht. Fiktiver mittlerer Porendurchm. der EKS 1,2—1,5 μ . Innere Oberfläche je m ² EKS-Filterfläche ca. 5000 m ² .	A. um so größer, je dichter die „Packung“ der Fasern.
	Menge des Adsorbens im Verhältnis zur Flüssigkeitsmenge	Bei allen Seitz-EK-Schichten ca. 1200 g/m ² Filterfläche	A. abhängig von Flächenbelastung, d. i. l Flüssigkeit/m ² Filterfläche.
	Vorbeladung des Adsorbens	Blockierung der Adsorptionszentren durch Fremdstoffe	Verstopfung der Schicht. Einfluß der Vorfiltration des Substrates.
	Kontaktzeit	Abhängig von Strömungsgeschwindigkeit. Bei EKS-Schichten u. Filtriergeschwindigkeit 350 l/m ² h ca. 60" Verweilzeit	Einstellung des A.-Gleichgewichtes um so rascher, je niedriger Filtriergeschwindigkeit; damit abhängig vom Druck.
Adsorptiv (Disperse Phase)	Konzentration	Mol/l-Teilchenzahl/l	Je höher die Konzentration, um so größer die adsorbierte Menge und um so rascher Einstellung des A.-Gleichgewichtes
	Molekülgröße, Teilchengröße	Teilchen $> 1-2 \mu$ werden auf Filteroberfläche gesiebt, Teilchen zw. 0,1—1 μ können z. T. im Filtergefüge mechanisch u. Teilchen $< 0,1 \mu$ nur adsorptiv gebunden werden.	Größere Moleküle werden im allgemeinen leichter adsorbiert als kleine. Für kolloiddisperse Partikel gelten Adsorptionsisothermen nicht immer.
	Grenzflächenladung	Filterschichten in wäßrigem Medium normalerweise negativ geladen	Bessere A. von positiv geladenen Partikeln und Molekülen mit basischen Gruppen.
Adsorptionsmedium (Dispersionsmittel)	pH-Wert	pH-Wert bestimmt Grenzflächenladung des Filtermaterials und des Adsorptivs. Steigender pH bedeutet steigende negative Ladung.	In saurem Medium im allgemeinen besser Filtr. als im alkalischen. Je größer Differenz der Grenzflächenladung zw. Filter u. Teilchen, um so größer A.
	Grenzflächenaktive Begleitsubstanzen	Ladungsänderungen bereits durch niedrige Konzentrationen, Umladung zu positiven Grenzflächen möglich.	Grenzflächenaktive Stoffe können A. verhindern und Adsorbate eluieren.
	Art des Dispersionsmittels	Beeinflussung des Schichtengefüges durch polare und apolare Lösungsmittel. Lösungen mit Hydroxylgruppen quellen Cellulose.	In apolaren Lösungsmitteln haben EKS-Schichten nahezu doppelt so große Porendurchmesser als in H ₂ O.
	Viskosität	Strömungsgeschwindigkeit in Filterschichten umgekehrt proport. der Viskosität. Freie Weglänge der Partikel (Brownsche Bewegung) umgekehrt proport. der Viskosität.	Feindisperse Partikel lassen sich um so schwieriger abscheiden, je höher die Viskosität. Porenwandnahe Schichten stagnieren!

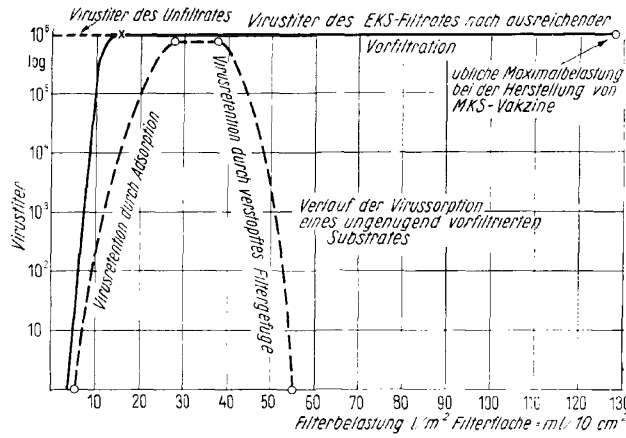


Abb. 1. Verlauf der MKS-Virus-Filtration bei der Vakzinherstellung.

Diese Verhältnisse sind durch die ausgezogene Kurve in Abb. 1 wiedergegeben (nach Ausführungen von Ubertini¹⁵). Die Kurve zeigt, daß die ersten 3,5 bis 4 Liter, die einen m² einer Seitz-EKS-Schicht passieren, virusfrei sind und etwa nach Durchgang von 15 l m² der ursprüngliche Virustiter von 10⁶ erreicht wird. Entsprechend verhält sich das Hämoglobin, das bei der Extraktion des Zungenepithels in das Substrat gelangt. Bis zu 3,5 l m² läuft ein farbloses Filtrat ab. Mit steigendem Virustiter nimmt auch die Rotfärbung des Filtrates bis zur Ausgangskonzentration zu, so daß man den Farbstoffdurchbruch als Indikator für die Beendigung des Durchlaufes der virusfreien Fraktion benutzen kann. Der relativ geringe Virusverlust bei einwandfreiem Filtrationsverlauf beruht zweifellos auf dem Gehalt der Virussuspension an Proteinen und Mucinen.

Die Abb. 1 gibt ferner ein Beispiel für eine Filtrationsstörung bei der MKS-Vakzine-Herstellung wieder (gestrichelte Kurve). Hierbei war insgesamt weniger Filtrat gewonnen worden mit nur einem Bruchteil der Virusmenge, die normalerweise erreicht wurde. Aus einem unbekannten Grund hatte man auf eine einwandfreie Vorfiltration verzichtet. Dadurch gelangten mit dem Virus kolloiddisperse Trübungsstoffe in die Entkeimungsfilterschichten, was zunächst zu einer verstärkten Sorption führte. Schon bevor der Gleichgewichtszustand erreicht wurde, war eine Verstopfung des Filtergefüges eingetreten, erkenntlich durch Minderung der Filterleistung. Dabei nahm die Viruskonzentration rasch ab, was im Zusammenhang mit der reduzierten Filtriergeschwindigkeit nur durch eine weitgehende Porenverengung zu erklären ist, so daß rein mechanisch Viren nicht mehr hindurchgelassen werden.

Die Erfahrungen bei der Gewinnung der MKS-Vakzine lassen erkennen, daß kleine Filterbelastungen Anlaß zu Fehlschlüssen über die Wirksamkeit der Filterschichten geben können. Zur Bewertung eines Filtrationsverfahrens sollten Überlastungsversuche mit möglichst großen Flüssigkeitsdurchsätzen pro Filterflächeneinheit durchgeführt werden. Ferner ist es wichtig, daß die zu filtrierenden Virussubstrate durch Vorfiltration geklärt werden.

Auch bei der Poliomyelitis-Impfstoffherstellung kommt den Filtrationsprozessen eine große Bedeutung für die Gewinnung unschädlicher und hochwirksamer Vakzinen zu. Anstelle der ursprünglich von Salk benutzten Glasfrittenfilter finden heute häufig Asbestfaserschichten Ver-

wendung⁹. Um einen Impfstoff mit möglichst hohem Antigengehalt zu gewinnen, hat es nicht an Versuchen gefehlt, die Virusverluste bei der Filtration herabzusetzen. Hierzu hat man sich verschiedener Methoden bedient, von denen folgende genannt sein sollen:

- a) Wirksame Vorklärung durch wenig adsorbierende Spezialschichten.
- b) Wahl einer möglichst kleinen Filterfläche. *Lamy* und Mitarb.⁹ geben eine Flächenbelastung von 1500 l/m² als optimal an, was zweifellos im Hinblick auf die Adsorptionsverluste günstig gewählt ist.
- c) Vorspülen der Filterschichten mit Hartley-Bouillon. Die „Inaktivierung“ von Filtermedien mit proteinhaltigen Lösungen ist aus den Arbeiten über Membranfilter und Filterkerzen schon seit etwa 30 Jahren bekannt^{4, 5, 6, 14}. Für Seitz-Filter hat man diese Methode in Form einer Vorbehandlung mit einer Bouillonart verwendet.
- d) Erhöhung der Menge an Aminosäuren im Substrat⁹.
- e) Zusatz grenzflächenaktiver Stoffe (z. B. Tween 80). Die adsorptionsvermindernde Wirkung grenzflächenaktiver Stoffe für Seitz-Filter beschreiben erstmalig *Lamy* und Mitarb.⁹, die mit 0,006 %iger Tween-80-Lösung Polioviren aus belasteten Schichten auch wieder eluiert haben.
- f) Verwendung calciumfreier Filterschichten. Calciumionen kommen in Spuren als Verunreinigung in den Schichten vor¹⁸. Ihre Wirkung wird so erklärt, daß Ca⁺⁺ mit dem Phosphat des Virussubstrats zu Calciumphosphat reagiert, welchen ein großes Adsorptionsvermögen gegenüber Viren zugeschrieben wird. Versuche mit calciumfrei gewaschenen Schichten haben im Falle der Polio-Impfstoffherstellung diese Annahme nicht bestätigen können.

Die erwähnten filtrationsbeeinflussenden Faktoren wurden von uns bei der Filtration größerer Flüssigkeitsmengen, in denen Coli-T3-Phagen suspendiert waren, untersucht. Die Versuchsergebnisse werden in einer weiteren Mitteilung veröffentlicht werden.

Zusammenfassung

Nach einer Übersicht über Aufbau und Funktion der Seitz-Filter werden Aufgaben besprochen, die heute an die Virusfiltration gestellt werden. Einerseits sind Flüssigkeiten durch Filtration von Mikroorganismen einschließlich der Viren zu befreien. Andererseits wird die Gewinnung von Virussuspensionen möglichst ohne Virusverlust gefordert, wobei alle größeren Partikel, vor allem Bakterien, eliminiert sein sollen. Häufig wird die rasche Filterung großer Flüssigkeitsmengen verlangt. Das Studium der Wirkungsweise sowie praktische Erfahrungen zeigen Möglichkeiten auf, um die genannten Forderungen zu erfüllen.

Summary

After a survey of the structure and function of Seitz filters, current problems arising in connection with virus filtration are discussed. In filtering liquids the purpose may either be the elimination of all microorganisms, including viruses, or the removal of just the larger particles, especially bacteria, from a virus suspension without loss of virus. Furthermore, there is frequently the

need for a means of rapid filtration of large quantities of liquid. On the basis of an investigation of filter function, as well as practical experience, possibilities are pointed out how to meet the above requirements.

Résumé

Après un coup d'oeil sur la construction et la fonction du filtre Seitz on discute des tâches qui s'imposent aujourd'hui en ce qui concerne la filtration des virus. D'un côté, il faut débarrasser des liquides par filtration des micro-organismes y compris des virus. De l'autre côté, on veut obtenir des suspensions de virus si possible sans perte de virus, tandis que les particules plus grosses, surtout les bactéries, doivent être éliminées. Souvent, on demande le filtrage rapide de grandes quantités de liquides. L'étude du fonctionnement ainsi que les expériences pratiques montrent des possibilités de satisfaire à ces demandes.

Schrifttum

- 1 Albrecht, J., Naturwiss. **44** (1957): 90 — 2 Bernoulli, R., Arch. Virusforsch. **2** (1943): 533 — 3 DIN-Normblatt 7051 — 4 Eiford, W. J., Brit. J. Exper. Path. **10** (1929): 126 — 5 ders., in: Doerr-Hallauer: Handbuch der Virusforschung. 1. Hälfte (1938), S. 126 — 6 Green, A. B. u. H. Eagles, Brit. J. Exper. Path. **12** (1931): 202 — 7 Kelly, S., Acta Med. Scand. **159** (1957): 63 — 8 Knöll, H., Erg. Hyg. **24** (1941): 266 — 9 Lamy, M., A. Prinzie u. P. de Somer, Leeuwenhoek **23** (1957): 266 — 10 Lippelt, H. u. G. Brand, Dtsch. Med. Wschr. **79** (1954): 165 — 11 Mayer, K. H. u. H. Beutelspacher, Kolloid-Zschr. **135** (1954): 10 — 12 Melnick, J. L., Amer. J. Hyg. **45** (1947): 240 — 13 Olitsky, P. K. u. L. Boez, J. Exper. Med. **45** (1927): 685 — 14 Tallerman, K. H., Brit. J. Exper. Path. **10** (1929): 360 — 15 Ubertini, B., Off. Int. Epizooties I **35** (1951): 627 — 16 Uecker, W., Zbl. Bakt. I. Orig. **168** (1957): 194 — 17 de Vincente Jordana, R., Appl. Microbiol. **7** (1959): 239 — 18 Wilke, H., Pharm. Ind. **18** (1956): 428 — 19 Wilke, H. u. H. E. Voss, Arzneimittel-Forsch. **4** (1954): 8.

2. Teil

Adsorptionsfiltration von Viren mit Seitz-Entkeimungsfiltren

Im 1. Teil dieser Arbeit haben wir auf die praktische Bedeutung sowohl der Reindarstellung von Virussuspensionen als auch der Abscheidung von Viren aus Flüssigkeiten hingewiesen (8). Im Folgenden sind Versuche mit Coli-T₃-Phagen als Virusmodell und Seitz-Entkeimungsschichten als Filtermaterial beschrieben, die angestellt wurden, um den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Filtration großer Mengen virushaltiger Flüssigkeiten zu untersuchen.

Versuchsordnung:

Als Filter benutzten wir eine Apparatekombination in Edelstahlausführung, bestehend aus einem Druckbehälter (Seitz-Einschichtenfilter Gr. 22 mit 10 Liter Fassungsvermögen) und einem darunter mittels Schraubverschluß und Dichtung befestigten Laborfilter von 6 cm Durchmesser (siehe

Abb. 1). Das Laborfilter diente zur Aufnahme der Entkeimungsschicht, die eine Filterfläche von 20 cm² hatte. Mit dieser Apparatur wurden jeweils ohne Unterbrechung Filterbelastungen von 10 000 ml/20cm² (= 5000 l/m²) erzielt. Im allgemeinen sind bei einer entkeimenden Filtration höhere Strömungsgeschwindigkeiten als 350 l/m²h nicht üblich, die bei nicht verstopften Schichten etwa bei einem Druck von 0,5 atü erreicht werden. Da unter diesen Verhältnissen die Filtration einer Menge von 10 Liter durch eine Filterfläche von 20 cm² ca. 30 Stunden gedauert hätte, haben wir die meisten unserer Versuche mit einem Druck von 2 atü durchgeführt, um zu Filtrationszeiten innerhalb von 6–8 Stunden zu kommen. Bei einigen Versuchen wurde der Einfluß der vom Druck abhängigen Filtriergeschwindigkeit auf den Abscheidungseffekt untersucht und dabei nennenswerte Differenzen der Abscheidung bei 0,8 atü und bei 2 atü nicht gefunden (siehe Tab. 1).

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß für praktische Arbeiten Strömungsgeschwindigkeiten von mehr als 350 l/m²h nicht empfohlen werden können.

Alle Versuche wurden mit der Filterschichtensorte Seitz-EKS durchgeführt, die von den drei Seitz-Entkeimungsschichten die größte Durchlässigkeit besitzt (7). Mit Hilfe der dichteren Schichten EKS-I und EKS-II läßt sich zwar eine stärkere Adsorption erzielen; da jedoch unsere Versuche auf die Filtration großer Flüssigkeitsmengen abgestellt waren, haben wir Schichten mit möglichst hoher Filterleistung gewählt. Für die meisten Versuche wurden Schichten benutzt, die nebeneinander aus einer großen Fläche herausgeschnitten waren, um auf diese Weise die Gleichmäßigkeit des Filtermaterials zu gewährleisten. Als Virusmodell dienten Coli-T₃-Phagen, die nach Williams und Fraser (9) einen sechskantigen Kopf von ca. 50 m μ Durchmesser und einen kurzen Stummelschwanz von 10 m μ Länge haben. Ihre Vermehrung erfolgte in üblicher Weise in Bouillonkulturen der Wirts-Colibakterien. Zur Trennung der Phagen von den Colibakterien bzw. den Bakterienzellresten wurde die Suspension durch großflächige Seitz-AS-Schichten geleitet. Es resultierte eine bakterienfreie phagenhaltige Bouillon, die für die Filterversuche mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1000 verdünnt wurde. Diese Flüssigkeit enthielt 10⁵ bis 10⁶ Phagen pro ml (siehe Tab. 1) und einen aus der Nährbouillon stammenden Eiweißgehalt von 1 bis 2 mg⁰/.

Der Nachweis der Phagen erfolgte in der Weise, daß die zu prüfende Phagensuspension je nach zu erwartender Phagenzahl unverdünnt blieb oder im Verhältnis 1:10, 1:100 usw. bis 1:10⁷ verdünnt wurde. Aus mindestens 3

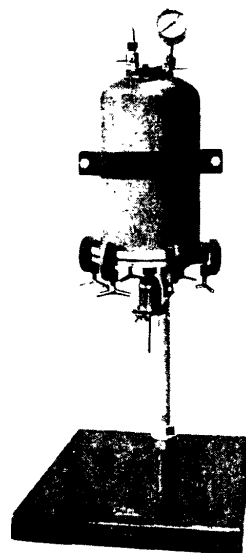


Abb. 1. Seitz-Filterapparatur mit großem Aufgußraum und kleiner Filterfläche.

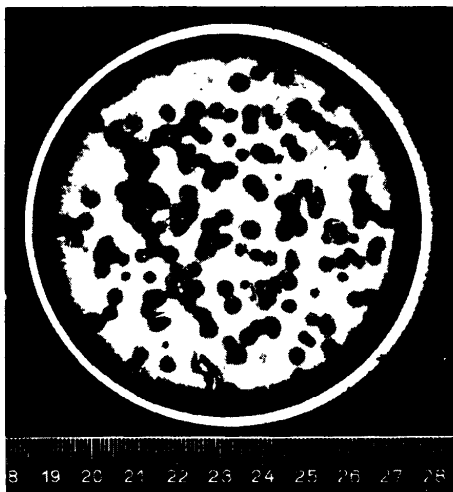


Abb. 2. Colibakterienrasen mit Phagenlöchern (Coli-T₃-Phagen).

Verdünnungsstufen wurden je 0,1 ml auf eine Nähragarplatte gegeben und auf deren Oberfläche gleichmäßig verteilt, nachdem die Agaroberfläche vorher mit den empfindlichen Colibakterien beimpft worden war. Nach 24-stündiger Bebrütung wurden die im Colibakterienrasen entstandenen „Plaques“ gezählt. Als sogenannte Großlochphagen bilden T₃-Phagen Plaques von solcher Gestalt, daß eine Zählung leicht möglich ist (siehe Abb. 2). In der Annahme, daß ein „Plaque“ im Bakterienrasen durch einen Phag hervorgerufen ist, wurde durch Auszählen der Phagenlöcher auf den Agarplatten, die mit der Phagensuspension in verschiedener Verdünnung beimpft war, die Anzahl der in der Suspension vorhandenen Phagen berechnet.

Entsprechend der Verwendung von maximal 0,1 ml der zu prüfenden Suspension lag die Nachweisbarkeitsgrenze bei 10 Phagen pro ml.

In Vorversuchen haben wir die Streubreite unserer Zählmethode ermittelt. Bei mehrmaligen, gleichzeitigen Bestimmungen des Phagengehaltes der gleichen Suspension nach der beschriebenen Weise ergaben sich Streuungen um den Mittelwert (doppelte Standardabweichung) zwischen 50 und 60%.

Die Zahl der Phagen im Unfiltrat wurde bestimmt durch Zählung sowohl vor Beginn als auch nach Beendigung eines jeden Versuches, in letzterem Fall im Rest der im Druckbehälter zurückgebliebenen Flüssigkeit. Je nach Durchlaufgeschwindigkeit lagen zwischen den beiden Bestimmungen Zeiten zwischen 2½ und 6½ Stunden. Eine Änderung des Phagengehaltes, insbesondere eine Abnahme durch den Aufenthalt im Druckbehälter, wurde nicht beobachtet; Differenzen der Meßwerte lagen innerhalb der Streubreite der Methode. Das Mittel aus den beiden Werten ergab die Zahl der Phagen im Unfiltrat.

Die Bestimmung der Phagenzahl im Filtrat erfolgte jeweils in dem ersten Milliliter der durch das Filter gelangenden Flüssigkeit sowie nach Filtration bestimmter Mengen Phagensuspension.

Versuchsergebnisse

a) Filtration großer Mengen eiweißarmer Flüssigkeit

8–10 Liter der 1:1000 verdünnten Phagenbouillon (pH 6,8, Eiweißgehalt ca 2 mg%) wurden in mehreren Versuchen durch 20 cm² Seitz-EKS-Schicht filtriert. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 aufgezeichnet, wobei die angegebene Menge filtrierte Flüssigkeit auf einen Quadratmeter Filterfläche bezogen ist. Die mittlere prozentuale Durchlässigkeit ist aus Tab. 3, 1. Spalte und Abb. 3 und 4, Kurve A ersichtlich. Der erste Phagendurchbruch erfolgt bei einer Belastung zwischen 1500 und 2000 l/m² Filterfläche. Mit steigender Filterbelastung nimmt der Phagendurchgang relativ langsam zu; nach Durchgang von 5000 l/m² Filterfläche waren im Filtrat in der Größenordnung 10% der im Unfiltrat ermittelten Phagenzahl nachzuweisen. Eine Steigerung des Filtrationsdruckes von 0,8 auf 2 atü ergab keine Änderung der Durchlaßquoten.

Die Durchlaufzeiten waren druckabhängig; sie betrugen im Mittel bei einer Filterbelastung von 3000 l/m² 2 1/2 h (0,8 atü) bzw. 1 h 25 min (2 atü), bei einer Filterbelastung von 5000 l/m² und einem Filtrationsdruck von 2 atü 2 h 36 min.

Mit den Versuchen Nr. 9–11 sollte nachgeprüft werden, ob im Filter vorhandene Kalziumionen einen Einfluß auf die Phagenfiltration ausüben. Die Seitz-Entkeimungsschichten enthalten pro m² etwa 0,4–1,0 g Kalzium, das bei der Herstellung nicht restlos aus Zellstoffen und Asbest entfernt werden kann. Um die Schichten kalziumfrei zu machen (7), wurden sie angefeuchtet, 5 min. lang mit 1/50 Salzsäure durchtränkt und anschließend mit 500 ml dest. Wasser nachgewaschen. Wie die in Tab. 1 aufgezeichneten Werte zeigen, verhielten sich die kalziumfreien Schichten im Hinblick auf den Phagendurchlaß ebenso wie die unbehandelten Schichten.

b) Filtration eiweißarmer Phagensuspensionen durch peptonvorbehandelte Schichten.

In den folgenden Versuchen (Nr. 12–21) wurden die Seitz-EKS-Schichten vor der Phagenfiltration mit peptonhaltigen Flüssigkeiten vorgespült. Zu diesem Zweck haben wir unter einem Druck von 2 atü in steigenden Mengen (100 bis 500 ml/20 cm² = 50 bis 250 l/m²) 0,1 bzw. 0,2%ige wäßrige vorfiltrierte Peptonlösung (pH zwischen 7,0 und 7,2, Pepton der Fa. Witte) und unmittelbar anschließend, ohne Nachspülung, bis zu 5000 l/m² Filterfläche 1:1000 verdünnte Phagenbouillon durch die Schichten filtriert. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 aufgezeichnet, wobei der Phagendurchbruch in % der Phagen vor dem Filter angegeben ist. Die Resultate der Versuche Nr. 14 und 15 sowie 20 und 21 sind in Abb. 3 graphisch dargestellt (Kurven B–E). Nach Vorbehandlung mit 50 l Peptonlösung pro m² Filterfläche unterscheiden sich die Meßwerte (Phagendurchbruch, Durchlaufzeiten) nicht wesentlich von denen, die ohne Vorbehandlung der Schichten ermittelt wurden (Tab. 3, 1. Spalte). Mit zunehmender Intensität der Peptonvorspülung sind

Tabelle 1
Ergebnis der Seitz-Filtration phagenhaltiger, eiweißarmer Flüssigkeit

Vers.- Nr.	Druck atü	Suspensions- medium	Vorbehandlung der Schichten	Unfiltrat	Anzahl Phagen pro ml										
					Filterbelastung (l/m² Filterfläche = ml/cm²)										
					0,5	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
1	0,8	1:1000 verd. Bouillon	ohne	820 000	Ø	Ø	Ø	—	Ø	—	300	X			
2	0,8	„	ohne	707 500	Ø	Ø	Ø	—	10	—	1010	—	7 900	X	
3	0,8	„	ohne	855 000	Ø	Ø	Ø	—	220	1450	6480	—	28 000	X	
4	0,8	„	ohne	1 490 000	Ø	Ø	Ø	—	Ø	80	810	—	8 640	X	
5	0,8	„	ohne	1 110 000	Ø	Ø	Ø	—	Ø	Ø	Ø	Ø	160	X	
6	2,0	„	ohne	939 000	Ø	Ø	Ø	—	30	—	70	—	640	—	3 150
7	2,0	„	ohne	587 500	Ø	Ø	Ø	—	60	—	4470	—	24 970	—	81 500
8	2,0	„	ohne	861 000	Ø	Ø	Ø	—	Ø	—	190	—	3 150	—	15 350
9	2,0	„	HCl gewaschen, Aquadest. nachgespült	236 000	Ø	Ø	Ø	Ø	125	—	1850	—	7 150	—	13 550
10	2,0	„	„	367 000	Ø	Ø	Ø	20	610	—	585	—	4 300	—	151 000
11	2,0	„	„	146 500	Ø	Ø	Ø	Ø	120	—	1733	—	3 050	—	28 430

Zeichenerklärung: Ø = < 10 Phagen/ml
— = nicht gemessen
X = Versuch beendet

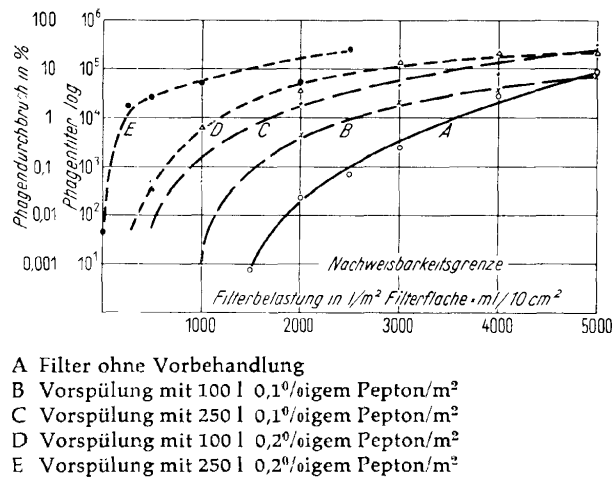
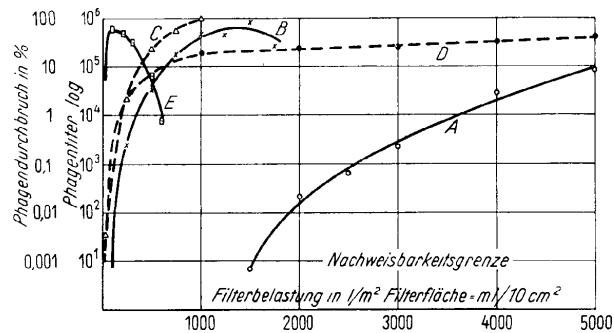


Abb. 3. Einfluß der Vorbehandlung der Seitz-Entkeimungsschichten mit Peptonlösungen auf die Phagenabscheidung.

ein verstärkter Phagendurchbruch und verlängerte Durchlaufzeiten zu verzeichnen. Die Vorbehandlung mit 250 l einer 0,2%igen Peptonlösung pro m^2 Filterfläche hatte zur Folge, daß bereits in den ersten Tropfen des Filtrats Phagen nachzuweisen waren, deren Anzahl nach einem Durchsatz von 250 l/m^2 auf 1% der Phagen im Unfiltrat anstieg. Aus zeitlichen Gründen wurden die Versuche mit Vorspülung von 200 l bzw. 250 l 0,2% Pepton pro m^2 Filterfläche nach 6 h 20 min. (Filterbelastung 4000 l/m^2) bzw. 6 h (Filterbelastung 2500 l/m^2) abgebrochen.

c) Filtration eiweißhaltiger und viskoser Phagensuspensionen.

Der 1:1000 verdünnten Phagenbouillon wurden verschiedene Substanzen in folgenden Mengen zugesetzt: 0,1 bzw. 0,2% Pepton (Fa. Witte), 0,2% Laktalbumin (Fa. Difco) und 0,01% Agar-Agar (Fa. Difco). Das pH der Eiweißlösungen lag bei 7,0, das pH der Agar-Agar-Lösung bei 7,5. Diese Flüssigkeiten haben wir in gleicher Weise wie vorher beschrieben bei einem Druck von 2 atü durch Seitz-EKS-Schichten filtriert. In den Spalten 2–5 der Tab. 3 ist die mittlere prozentuale Phagendurchlässigkeit von je 4 Versuchen (mit Agar 3 Versuche) aufgezeichnet; in Abb. 4 sind die Werte graphisch aufgetragen und mit der Kurve des Phagendurchbruches bei Verwendung der 1:1000 verdünnten Bouillon ohne Zusätze verglichen. Während bei Filtration der 1:1000 verdünnten Bouillon der Phagendurchbruch relativ spät begann und dann nur langsam zunahm (Kurve A), wurde nach Zusatz von 0,2% Laktalbumin zum Dispersionsmittel das Adsorptionsvermögen der Filterschichten schnell herabgesetzt (Kurve D). Nach einer Filterbelastung von 500 l/m^2 war ein Durchbruch von ca. 10% zu verzeichnen, der in dieser Größenordnung bei Belastung bis zu 5000 l/m^2 erhalten blieb. Das Mittel der Durchlaufzeit für 5000 l/m^2 war von 2 1/2 h auf 3 h leicht erhöht.



- A 1:1000 verdünnte Bouillon ohne Zusätze
 B 1:1000 verdünnte Bouillon + 0,1% Pepton
 C 1:1000 verdünnte Bouillon + 0,2% Pepton
 D 1:1000 verdünnte Bouillon + 0,2% Laktalbumin
 E 1:1000 verdünnte Bouillon + 0,01% Agar-Agar

Abb. 4. Einfluß proteinhaltiger und viskoser Dispersionsmedien auf die Phagenabscheidung in Seitz-Entkeimungsschichten.

Auch während der Filterung der peptonhaltigen Lösungen war ein relativ früh einsetzender und rasch zunehmender Phagendurchbruch zu beobachten (Kurven B und C). Mit steigender Filterbelastung nahmen die Durchlaufzeiten deutlich zu, so daß die Versuche nach etwa 6 Stunden bei 1750 l/m² (0,1% Pepton) bzw. 1000 l/m² (0,2% Pepton) abgebrochen wurden. Es ist zu vermuten, daß der Durchsatz der Lösungen durch eine einsetzende Verstopfung der Filterschichten erschwert war.

Hinsichtlich der Aufhebung der Phagenadsorption am wirksamsten erwies sich die 0,01%ige Agar-Agar-Lösung (Kurve E). Bereits nach einem Durchsatz von 100 l/m² waren im Filtrat 60% der im Unfiltrat vorhandenen Phagen nachzuweisen. Mit steigender Filterbelastung nahm die Phagenzahl im Filtrat ab, gleichzeitig war die Durchlaufzeit stark verlängert. Dies läßt auf eine zunehmend stärker werdende Verstopfung des Filtergefüges mit mechanischer Retention der Phagen schließen.

Diskussion der Versuchsergebnisse

Bei einer Erörterung der Filtrationsmechanismen in Zellulose-Asbestfaser-Schichten ist zu berücksichtigen, daß viele Faktoren auf den Filtrationsvorgang einzuwirken vermögen. Da für den Filtereffekt im wesentlichen Adsorptionsvorgänge maßgebend sind (8), sollten sich Untersuchungen hierüber nicht nur auf Einflüsse des Filters selbst (z. B. Porenweite) oder der zu filternden Teilchen (z. B. Teilchengröße), sondern vor allem auch auf den Einfluß des Mediums erstrecken, das als Dispersionsmittel für die zu filternden Teilchen dient. Unterschiedliche Zusammensetzungen der Adsorptionsmedien führen innerhalb des adsorbierenden Systems zu kolloid-

Tabelle 2

Phagendurchbruch nach Vorbehandlung der Seitz-Filterschichten mit eiweißhaltigen Lösungen

Versuch-Nr.	Suspensions-medium	Vorbehandlung der Schichten pro m ² Filterfläche	Phagendurchbruch in %								
			bei Filterbelastung (l/m ² Filterfläche = ml/10 cm ²)								
			0,5	250	500	1000	2000	2500	3000	4000	5000
12	1:1000 Bouillon	50 l 0,1% Pepton	Ø	—	Ø	Ø	0,02	—	0,15	1,23	1,5
13	1:1000 Bouillon	50 l 0,2% Pepton	Ø	—	Ø	Ø	0,006	—	0,28	0,82	4,41
14	1:1000 Bouillon	100 l 0,1% Pepton	Ø	—	Ø	Ø	0,47	—	1,19	2,56	8,1
15	1:1000 Bouillon	100 l 0,2% Pepton	Ø	—	0,05	0,72	3,72	—	11,8	17,5	18,2
16	1:1000 Bouillon	150 l 0,1% Pepton	Ø	—	0,09	0,34	4,05	—	45,0	39,0	43,4
17	1:1000 Bouillon	150 l 0,2% Pepton	Ø	0,34	0,28	2,36	9,2	—	7,2	11,8	19,3
18	1:1000 Bouillon	200 l 0,1% Pepton	Ø	—	0,044	0,25	1,7		17,3	12,9	83,6
19	1:1000 Bouillon	200 l 0,2% Pepton	Ø	1,23	0,99	3,4	5,1	—	16,4	17,3	X
20	1:1000 Bouillon	250 l 0,1% Pepton	Ø	—	0,035	0,046	1,9	—	4,7	8,4	26,0
21	1:1000 Bouillon	250 l 0,2% Pepton	0,005	1,5	2,7	4,5	3,8	22,1	X		

Virusfiltration

Zeichenerklärung: siehe Tabelle 1

15

Tabelle 3

Phagendurchbruch bei Seitzfiltration eiweißhaltiger und viskoser Medien

Suspensions- medium	Mittel aus Ver- suchen	Phagendurchbruch in % bei Filterbelastung (l/m Filterfläche — ml/10 cm²)																		
		0,5	100	200	250	300	400	500	600	750	1000	1250	1500	1750	2000	2500	3000	3500	4000	5000
1:1000 Bouillon	11	○	—	—	—	—	—	○	—	—	○	—	0,0008	—	0,02	0,07	0,2	—	1,3	9,0
1:1000 Bouillon + 0,1% Pepton	4	○	—	—	0,2	—	—	3,2	—	18,1	44,3	44,0	84,0	23,5	X					
1:1000 Bouillon + 0,2% Pepton	4	0,0004	—	—	2,0	—	—	21,7	—	53,0	100	X								
1:1000 Bouillon + 0,2% Lact- albumin	4	○	—	—	—	—	—	8,9	—	—	16,3	—	—	—	21,2	—	27,0	—	35,5	56,0
1:1000 Bouillon + 0,01% Agar- Agar	3	○	59,5	44,7	—	31,5	44,7	6,3	0,8	X										

Zeichenerklärung: siehe Tabelle 1

chemischen Veränderungen, die sowohl die Teilchen als auch die innere Oberfläche der Filterschicht betreffen.

Bei den vorliegenden Versuchen blieben von den Adsorptionspartnern Adsorbens und Adsorptiv weitgehend konstant, während die Zusammensetzung des Adsorptionsmediums Veränderungen erfuhr.

Für Partikel in der Art und Größe der Coli-T₃-Phagen zeigten die Seitz-Entkeimungsschichten ein starkes Adsorptionsvermögen, wenn wäßrige Medien ohne Zusätze als Dispensionsflüssigkeit dienten und die Schichten nicht vorbehandelt waren. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, eine völlig eiweißfreie Phagensuspension herzustellen. Abgesehen von den Phagen selber enthielt die 1:1000 verdünnte Bouillon ca. 2 mg⁰/₀ Eiweißsubstanzen. Im Verlauf der steigenden Filterbelastung wurden diese und evtl. andere, im vorfiltrierten Dispensionsmittel in geringer Menge gelöste Substanzen im Filter angereichert, wodurch die langsame Abnahme der Adsorptionsfähigkeit der Schichten und der Filtrier-Geschwindigkeit erklärt werden kann.

Eine Vorspülung der Schichten mit Peptonlösungen bewirkte eine deutliche Verminderung der Adsorptionskraft des Filters. Je mehr Pepton zur Vorbehandlung verwendet wurde, um so stärker war der beobachtete Phagendurchbruch. In ähnlicher Weise war eine rasche Abnahme der Adsorptionsfähigkeit der Filter für Phagen zu verzeichnen, wenn die Eiweißsubstanzen dem Dispersionsmedium zugesetzt waren. Im Vergleich zu den Kurven, die nach Filtervorbehandlung erzielt wurden, waren die Durchbruchskurven jetzt steiler; schon bei geringer Filterbelastung erfolgte der Phagendurchbruch in verstärktem Maße. Bei Filterung der in den Peptonlösungen suspendierten Phagen zeigte sich ferner eine Abnahme der Filtriergeschwindigkeit (= Zunahme der Durchlaufzeit), wodurch nach Erreichen eines maximalen Phagendurchbruchs der Filtrationsvorgang schließlich sistierte. Dieses Ereignis wird auf eine zunehmende Verstopfung des Filtergefüges zurückgeführt; es fand sich in weit geringerem Maß, wenn statt des Peptons Lactalbumin als Zusatz zur Filterflüssigkeit gewählt wurde (siehe Abb. 4, Kurven B und D).

Um nähere Aufschlüsse über die Natur der Vorgänge im Filtergefüge bei Anwesenheit von Proteinen zu erhalten, haben wir an EKS-Filterschichten dynamische Adsorptions- und Desorptionsmessungen für 0,1 und 0,2⁰/₀ Pepton und 0,1 und 1⁰/₀ Serumeiweißlösungen durchgeführt. Abhängig von der Menge der filtrierten Flüssigkeit und der Eiweißkonzentration resultieren Sorptionskurven, von denen in Abb. 5 diejenige für 500 l/m² Spülung mit 0,2⁰/₀ Pepton wiedergegeben ist. Es wurde gefunden, daß beim Durchspülen einer 0,1⁰/₀igen Peptonlösung mit einer Filtriergeschwindigkeit von 1000–2000 l/m² h bis zu 14,3 g Pepton pro m² Filterfläche, aus einer 0,2⁰/₀igen Peptonlösung bis zu 24,2 g Pepton pro m² Filterfläche von den Schichten sorbiert wurden. Das Adsorptionsgleichgewicht trat bei 0,1⁰/₀iger Peptonlösung nach etwa 350 l/m², bei 0,2⁰/₀iger Peptonlösung nach etwa 200 l/m² ein. Durch Auswaschen mit destilliertem Wasser konnte der größte

Teil des Adsorptivs wieder eluiert werden. Schon nach Durchgang von 50 l/m² waren 70–80% der desorbierbaren Menge herausgelöst. Nach 200 l/m² ließ sich im Waschwasser Pepton nicht mehr nachweisen, gleichgültig wie hoch die Eiweißbelegung ursprünglich war. Wir stellten aber fest, daß eine nicht auswaschbare Resteweißmenge an den Fasern der Schichten gebunden blieb. Auch nach Auswaschen mit 1000 l Wasser pro m² Filterfläche konnte mittels der Murexidprobe noch Eiweiß in den Schichten nachgewiesen werden. Die fixierte Restmenge läßt sich aus den Adsorptions- und Desorptionskurven für die mit 0,2% Pepton gespülten Filter zu 6,2 g/m² und für die mit 0,1% Pepton gespülten Schichten zu 3,05 g/m² errechnen.

Aus den Ergebnissen unserer Versuche schließen wir, daß der Durchbruch von Phagen bei Gegenwart von Eiweiß-Substanzen in Seitz-Filterschichten vorwiegend Folge einer Adsorptionsverdrängung ist. Durch Adsorption der Eiweißmoleküle, die etwa um den Faktor 100 kleiner sind als die Phagen, werden die Adsorptionszentren im Zellstoff-Asbestfaser-System mit einer fest-haftenden Eiweißschicht belegt, so daß ihre Fähigkeit zur adsorptiven Bindung von Phagenpartikeln teilweise oder ganz verloren geht. Inwieweit bei diesem Vorgang weitere filtrationsbeeinflussende Faktoren eine Rolle spielen, ist noch nicht bekannt. Es ist möglich, daß auch eine Schutzkolloidwirkung der Eiweiß-Stoffe, Änderungen der elektrischen Ladungsverhältnisse an den Grenzflächen sowie eine Steigerung der Viskosität des Suspensionsmediums das Adsorptionsvermögen der Schichten herabsetzen. Diese Vermutung wird durch die Feststellung verschiedener Untersucher gestützt, wonach neben Eiweißsubstanzen (z. B. Serumeiweiß [1,6], Bouilloneiweiß [1, 3], Gelatine [5]) auch Polysaccharide (z. B. Alginate [2]) und oberflächenaktive Substanzen (z. B. Tween 80 [4]) die Adsorptionsfähigkeit der Seitz-Filterschichten für Viruspartikel verringern. Unsere Versuche mit Agar-Agar-Lösungen haben gezeigt, daß Polysaccharide in besonderem Maß zu Filtrationsanomalien neigen. Wir konnten einen starken Phagendurchbruch bei geringer Filterbelastung sowie gleichzeitig eine deutliche Reduzierung der Filtrateleistung — wahrscheinlich infolge rasch zunehmender Verstopfung des Porengefüges — beobachten (siehe Abb. 4, Kurve E). Weitere Untersuchungen, besonders mit geringeren Agar-Konzentrationen, werden Aufschluß darüber geben, inwieweit diese Vorgänge auf eine ausnehmend starke Blockierung der Adsorptionszentren, auf die deutlich erhöhte Viskosität (0,01% Agarlösung 1,7 cP) oder auf andere, früher (8) genannte filtrationsbeeinflussende Faktoren zurückzuführen sind.

Von der Praxis werden der Virusfiltrationstechnik heute hauptsächlich 2 verschiedene Aufgaben gestellt, deren Ziele im Gegensatz zueinander stehen; nämlich:

- a) Herstellung virusfreier bzw. virusarmer Filtrate, etwa zur Gewinnung von Trinkwasser aus Oberflächenwässern, wobei große Mengenleistungen erforderlich sind,
- b) Gewinnung von Virussuspensionen möglichst ohne Virusverlust, die frei

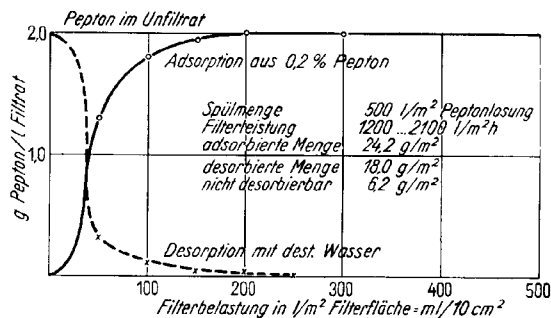


Abb. 5. Adsorption und Desorption von Pepton an Seitz-EKS-Schichten.

von Bakterien, Gewebsresten und anderen korpuskulären Bestandteilen sind, zu. B. bei der Herstellung von Virusimpfstoffen.

Auf Grund der in der Literatur wiedergegebenen und unserer eigenen Erfahrungen empfehlen wir, bei der Verwendung von Seitz-EKS-Schichten für diese Aufgaben folgende Regeln zu beachten:

zu a) Zur Herstellung eines virusfreien Filtrats sollten kleine Flüssigkeitsmengen durch große Filterflächen filtriert werden. Das Suspensionsmedium darf nur geringe Mengen an hochmolekularen Stoffen (besonders Proteine und Polysaccharide) und an oberflächenaktiven Substanzen enthalten. Die Entkeimungsschichten sind nicht mit trübstoffreichen Flüssigkeiten zu belasten, was durch ausreichende Vorfiltration erreicht werden kann.

zu b) Bei der Gewinnung bakterienfreier Suspensionen mit möglichst hohem Virusgehalt sollten kleine Filterflächen für große Flüssigkeitsmengen Verwendung finden. Die Viruskonzentration vor dem Filter ist möglichst hoch zu wählen. Das Suspensionsmedium sollte hochmolekulare Substanzen enthalten, die eine Adsorptionsverdrängung der Viren bewirken, oder die Filterschichten sollten mit solchen Substanzen vorgespült werden. Hierbei wird man insbesondere bei der Vakzineherstellung den Polysacchariden vor den Eiweißstoffen wegen der antigenen Wirksamkeit der letzteren meist den Vorzug geben.

Wir weisen darauf hin, daß diese Filtrationsregeln keine Gesetzmäßigkeiten darstellen. Die komplizierten Vorgänge bei der Adsorptionsfiltration sind noch zu wenig untersucht worden, als daß man bereits Gesetze aufstellen könnte, die eine Vorausberechnung der Filtrationsvorgänge gestatten.

Zusammenfassung

Mit Coli-T 3-Phagen als Virusmodell wurden Filtrationsversuche bei Belastungen von Seitz-Entkeimungsschichten bis zu 5000 l/m² durchgeführt. Das Suspensionsmedium für die Phagen war teils begleitstoffarm, teils waren ihm Pepton, Lactalbumin oder Agar-Agar zugesetzt, oder die Schichten waren mit Pepton vorgespült. Das gute Adsorptionsvermögen der Zellstoff-Asbestfaser-Schichten für Phagen in begleitstoffarmen Medien war durch Proteine und Polysaccharide deutlich herabgesetzt. Die Ursachen hierfür werden diskutiert. Regeln zur Durchführung der von der Praxis gestellten Virusfiltrationsaufgaben werden aufgestellt.

Summary

Filtration experiments with Seitz bacterial filters at stresses up to 5000 l/m² were conducted with coli phage T₃ as a virus model. The medium in which the phages were suspended contained partly only low concentrations of foreign material, partly peptone, lactalbumine or agar-agar were added, or the layers were pre-rinsed with peptone. The good adsorptive capacity of the cellulose-asbestos layers for phages suspended in media poor in foreign material is clearly decreased by proteins and polysaccharides. The causes for this phenomenon are discussed and rules set up for handling problems of virus filtration.

Résumé

On procède à des essais de filtrage avec des T₃-coli-phages comme type de virus et avec des couches de stérilisation Seitz chargées jusqu'à 5000 l/m². Le milieu de suspension des coli-phages était tantôt sans addition, tantôt avec addition de peptones, de lactalbumine ou d'agar-agar, ou bien on avait rincé les couches de stérilisation aux peptones. La haute puissance d'adsorption des couches de cellulose et de fibres d'amiante pour coli-phages en milieu sans addition était fortement diminuée par les protéines et les polysaccharides. On discute les causes de ce phénomène. On fixe des règles pour les filtrages de virus qui sont nécessaires dans la pratique.

Schrifttum für Teil 2 (Schrifttum für Teil 1 siehe Seite 8)

1 Albrecht, J., Naturwiss. **44** (1957): 90 — 2 Hyslop, N. S. G., Nature **191** (1961): 305 — 3 Kanarek, A. D., A. P. Goffe u. A. J. Woidwood: zit. 5 — 4 Lamy, M., A. Prinzie u. P. de Somer, Leeuwenhoek **23** (1957): 266 — 5 Mares, J., M. Drevo u. D. Slonim, Acta virol **5** (1961): 220 — 6 Ubertini, B., L. Nardelli, G. Sartero u. G. Panina, Symp. Internat. Virol, Lyon (1958): 101 — 7 Wilke, H., Pharmaceut. Indust. **18** (1956): 428 — 8 Wilke, H. u. J. Albrecht, Arch. Hyg. **145** (1961): 137 — 9 Williams, R. C. u. D. Fraser, J. Bact. **66** (1953): 458.