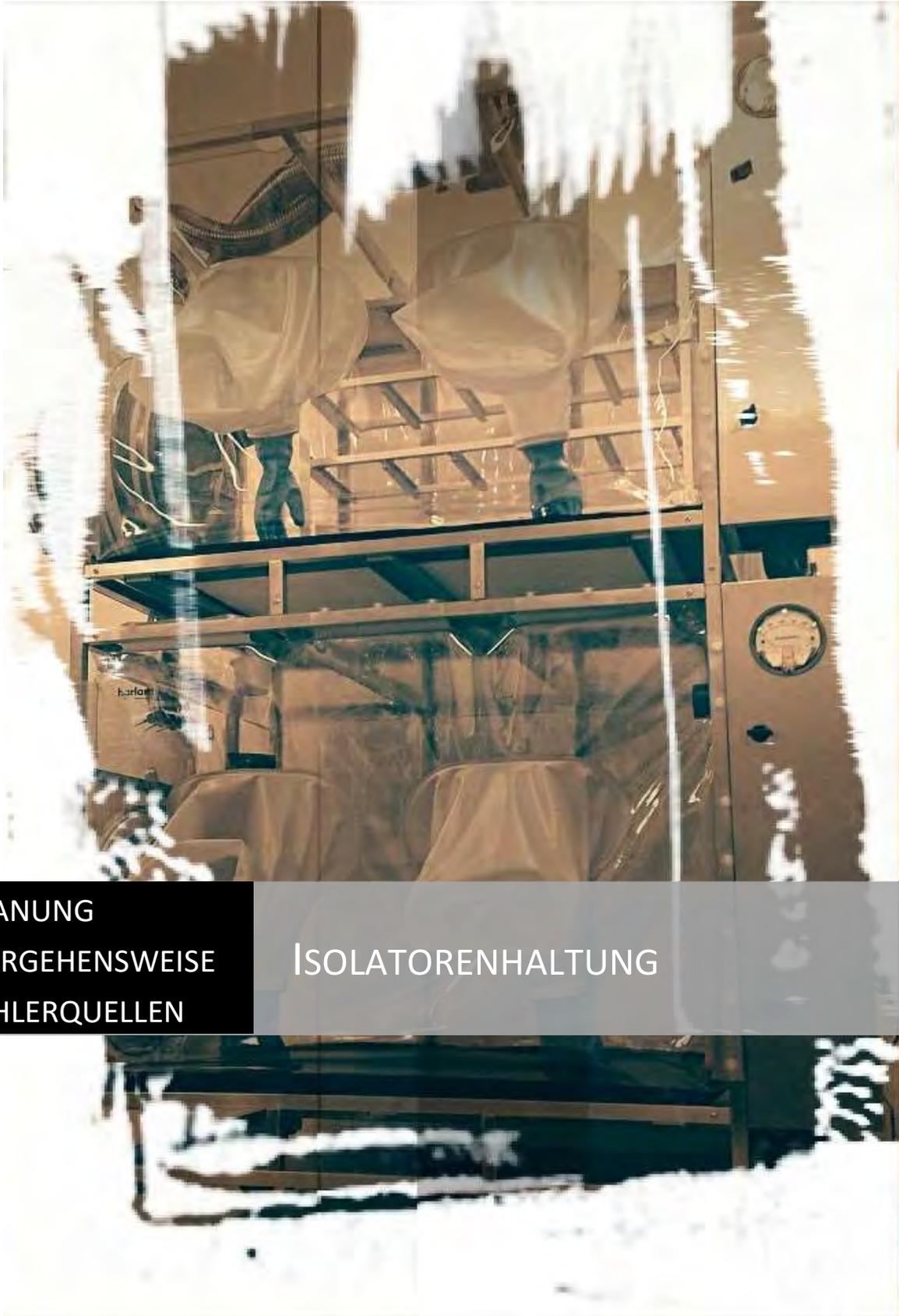


2.2.2015



PLANUNG
VORGEHENSWEISE
FEHLERQUELLEN

ISOLATORENHALTUNG

Haltung von gnotobiotischen Mäusen | Melanie Klein

Inhalt

Aufbau – Prinzip eines Folienisolators	3
Überdruck.....	3
Unterdruck	5
Optionale „rundum –Zirkulation“ am Isolator	7
Isolatorenhaltung	9
Allgemeine Hinweise	9
Erste Sterilisierung / Neubesatz	11
Erste Schritte:	11
1. Säubern des Isolators Material:	11
2. „Leak Test“ = Druckverlust testen	12
3. Sterilisation.....	14
4. Ventilation / Lüften	16
5. Ausstattung / Bestückung	17
6. Sterilitätstest / Probennahme vor Mäuseimport.....	17
Mäuse Export - Import	20
1. Vorbereitung der Tonnen - Export	20
2. Ausschleus-Vorgang	23
3. Transport	28
4. Einschleusvorgang.....	29
5. Tierpflege.....	34
6. Tägliche Kontrolle.....	38
Überprüfen des Isolators auf Schwachstellen.....	41
Handschuhkontrolle:	41
Kontrolle der Schweißnähte.....	42
Kontrolle der Zu- und Abluftverbindungen / HEPA-Filter	43
Anbringen der Port Kappen (Verschließen des Isolators)	44
Handschuhwechsel.....	49
Filterwechsel am Isolator im laufenden Betrieb	57
Bestückung der Tonnen (Versorgungszylinder)	62
Erstbesatz:	62
Futter / Einstreu:	63

Umschleusen / Gnotokäfige	64
Verschließen der Tonne	65
Filterwechsel der Tonne	67
Autoklavieren der Wasserflaschen.....	68
Einbringen der Wasserflaschen in den Isolator.....	70
Pflegehinweise	71
Gesundheitszeugnisse / Überprüfen des Hygienezustandes	72
Peressigsäure Verdünnungstabelle	73
Materialliste	74

Aufbau – Prinzip eines Folienisolators

Überdruck

Ein Isolator wird immer dann im Überdruck benutzt, wenn die Tiere darin vor jeglicher Kontamination von außen geschützt werden sollen.

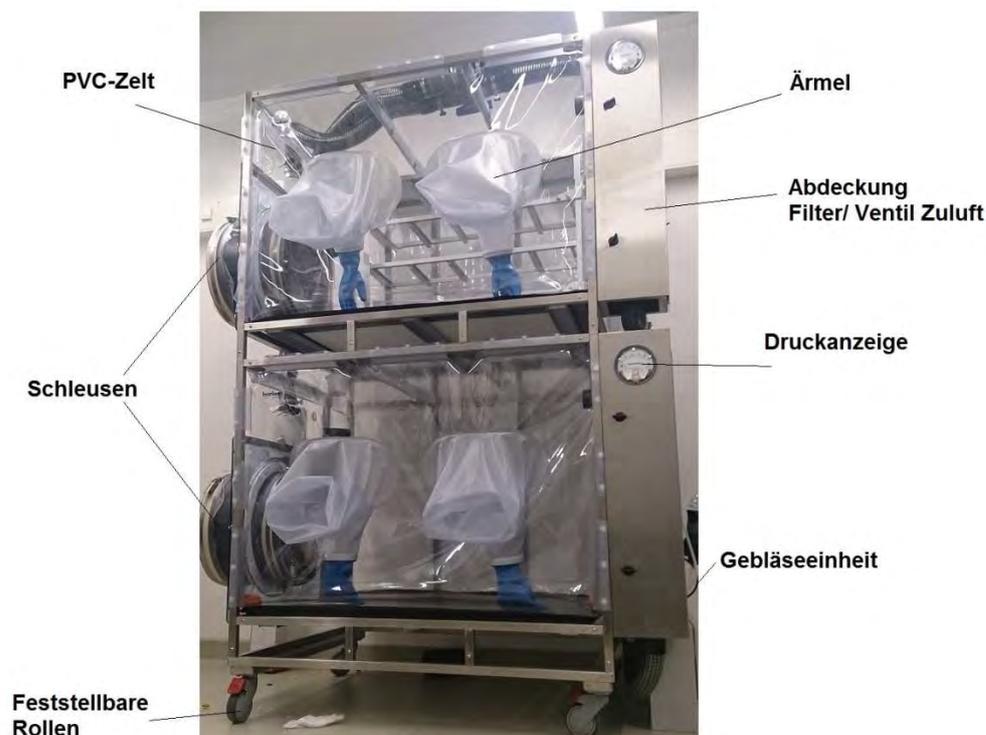
Das Prinzip ist denkbar einfach. Der Isolator an sich besteht aus einem in sich geschlossenem „Zelt“ aus PVC (dem sog. Canopy), in welchem durch eine Gebläse-einheit ein Überdruck erzeugt wird. Die Zu- und Abluft wird jeweils durch einen HEPA Filter geleitet und dadurch sterilisiert. Sollte also ein Loch in dem Zelt oder Handschuh am Isolator auftreten, ist es zwar möglich dass der Isolator kontaminiert wird, die Wahrscheinlichkeit dafür ist jedoch gering, da der Überdruck dafür sorgt, dass sterile Luft kontinuierlich von innen nach außen gepreßt wird. So ist es möglich eine keimfreie Haltung relativ einfach aufrechtzuerhalten.

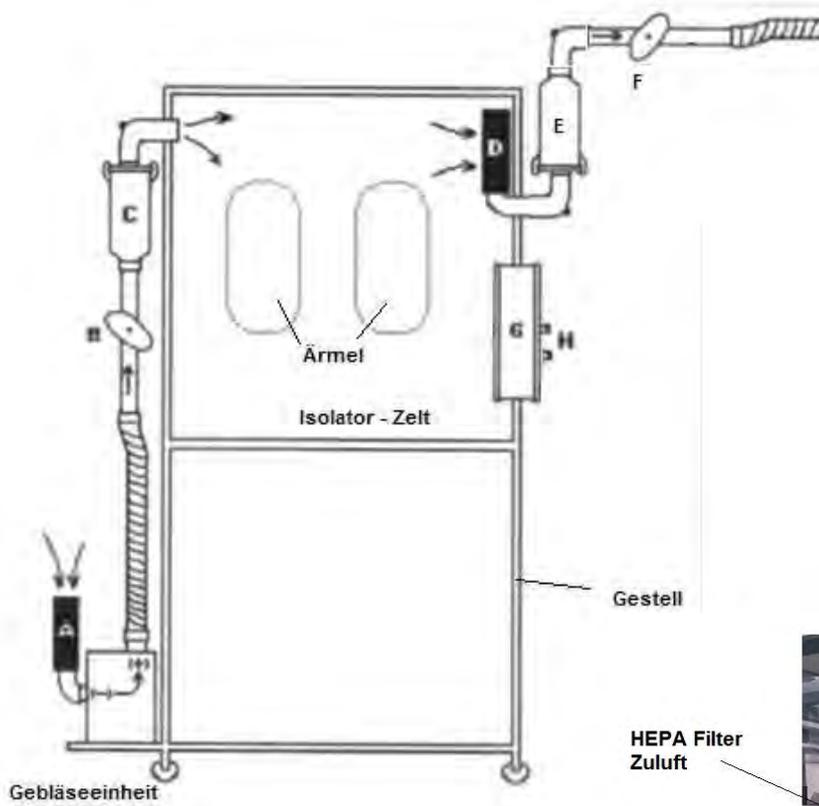
Der konstante Druck wird durch die Regulierung der Zu- und Abluft Ventile erreicht.

Erfahrungsgemäß ist ein Druck von 100hPa ausreichend.

Selbst bei einem Stromausfall und damit dem Ausfall der Gebläse-einheit und des Überdrucks, ist der Inhalt des Isolators nicht gefährdet, da sowohl bei der Zu- als auch bei der Abluft ein HEPA Filter angebracht ist. In diesem Zustand wäre allerdings ein Loch oder Riß im PVC-Zelt eine große Gefahr.

Prinzipiell ist es dies ein relativ sicheres System, eine sorgfältige Arbeitsweise ist dennoch sehr wichtig um Gefahren rechtzeitig zu erkennen und Kontaminationen zu vermeiden.





- A – Vorfilter Zuluft
- B – Ventil Zuluft
- C – HEPA Filter Zuluft
- D – Vorfilter Abluft
- E – HEPA Filter Abluft
- F – Ventil Abluft
- G – Port (Schleuse)

Gestell

Gebälseeinheit

HEPA Filter Zuluft

Ventil Zuluft

Gebälseeinheit

Vorfilter Abluft

"Zelt" (Canopy)

Zuluft

Schleuse (Port)

Abdeckung für HEPA Filter und Ventil der Zuluft

Ärmel

Unterdruck

Ein Unterdruck ist immer dann erforderlich, wenn Mitarbeiter vor Keimen im Isolator geschützt werden sollen. Zum Beispiel, wenn Tiere mit pathogenen Keimen assoziiert (S2-Versuche) sind. Dadurch ist die Gefahr die Tiere im Isolator selbst mit Keimen von außen zu kontaminieren größer, aber pathogene Keime vom Inneren des Isolators können nicht in die Raumluft gelangen und somit eine Gefahr für Mitarbeiter darstellen.

Im Unterdruck ist es grundsätzlich schwieriger im Isolator zu arbeiten. Es ist weniger Platz vorhanden und die Gefahr, das PVC Zelt zu verletzen, ist größer. Da im Falle eines Loches die Luft von außen angesogen wird, ist damit natürlich die Wahrscheinlichkeit, dass Keime von außen in den Isolator gelangen relativ hoch.

Um den Isolator auf Unterdruck umzustellen, müssen die Schläuche an der Gebläse-Einheit getauscht werden. Außerdem muss auch der Schlauch an der Druckanzeige umgesteckt werden. Der Unterdruck wird in der Regel zwischen 50 und 100 Pa eingestellt. Die Gebläse-Einheit sollte nun auch mit einem Schlauch an die Abluft des Raumes angeschlossen werden, um diese nicht mit dem Geruch vom Isolator zu belasten. Der Schlauch der früheren Abluft wird nun zur Zuluft und sollte entfernt werden, oder das Ventil daran komplett geöffnet werden. Dort kann dementsprechend ein Vorfilter angebracht werden. Der Druck wird nur über das Ventil der jetzigen Abluft eingestellt!



Schlauch entfernen und Vorfilter anbringen, da im Unterdruck nun Zuluft

Vorfilter hier entfernen



Ventil entfernen oder komplett öffnen

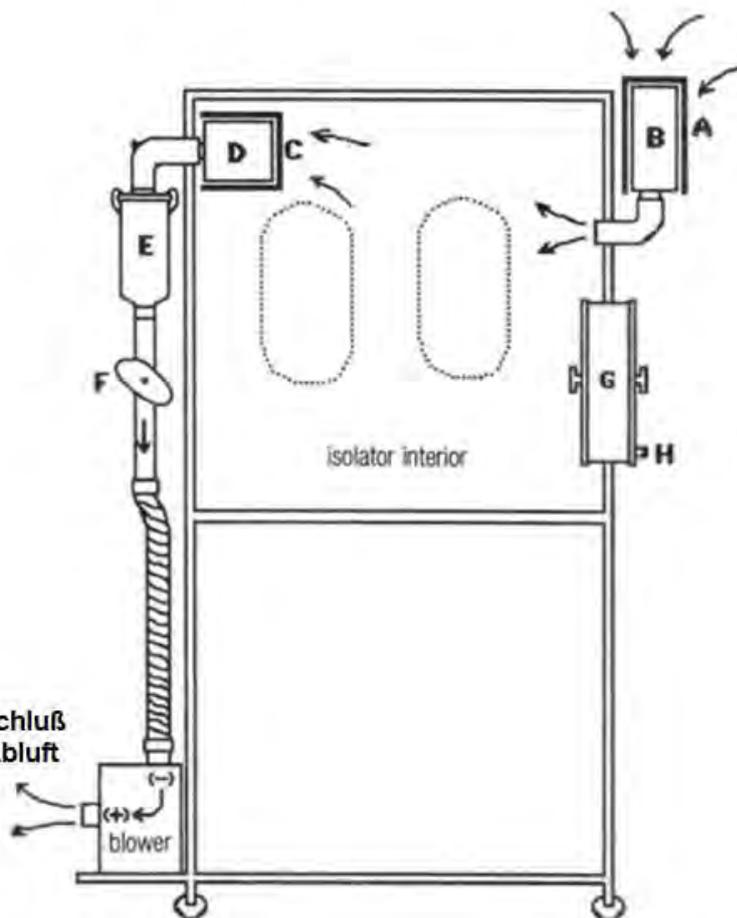
Vorfilter für Abluft hier anbringen



Schlauch für
Druckluft
umstecken

jetzt Abluft

Ventil um Druck
einzustellen



A – Vorfilter Zuluft (optional)

B – HEPA Filter Zuluft

C – Vorfilter Abluft

D – HEPA Filter Abluft
(optional)

E – HEPA Filter Abluft

F – Ventil Abluft

G – Schleuse

H - Sprühventile

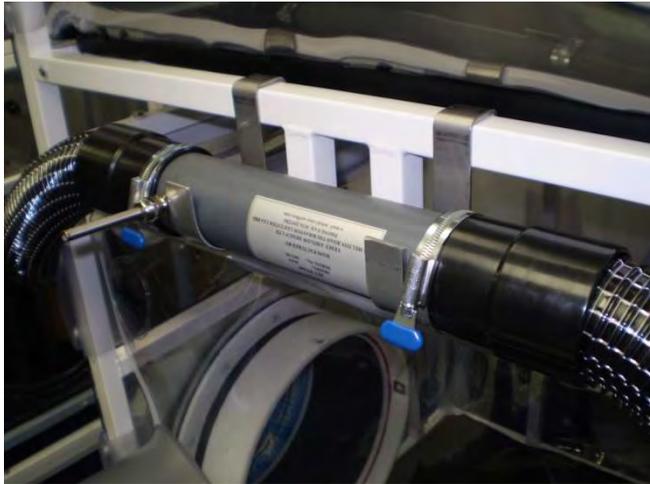
Anschluß
an Abluft

blower

isolator interior

Optionale „rundum-Zirkulation“ am Isolator

Soll eine Rund-um Zirkulation stattfinden (im Falle einer Sterilisation), kann ein zusätzlicher Schlauch an der Zuluft sowie der Abluft hinter dem HEPA Filter angeschlossen werden. Dies ermöglicht eine zusätzliche Sicherheit wenn die Luft im System nach Einwirkzeit der Sterilisation erst einmal „durchgeblasen“ werden soll um sicher zu gehen das wirklich alle Zuleitungen mit sauberer Luft „arbeiten“:



Schlauch zur Sterilisation mit Druckluft Inlet (Ventile und Schläuche weichen bei den meisten Modellen ab – hier bitte vorab überprüfen ob dies bei dem gegebenen Modell überhaupt möglich ist).

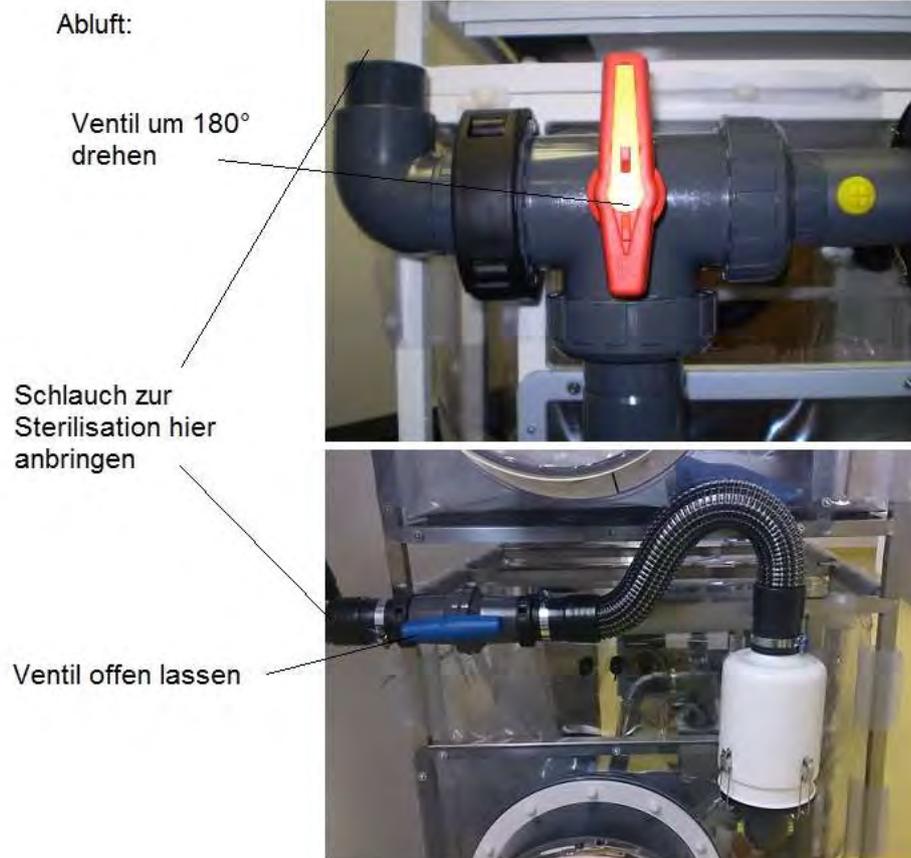


Zuluft:

Schlauch zur Sterilisation hier anbringen

Ventil auf diese Position umstellen





Ist der Schlauch angeschlossen und die Ventile dementsprechend eingestellt, wird der Isolator von innen mit Peressigsäure komplett eingesprüht. Mit einem Kompressor kann dann die Luft im Isolator und allen zugehörigen Schläuchen zirkulieren. Alternativ könnte man auch eine Formaldehyd „Bombe“ verwenden. Unter den meisten Sicherheitsbestimmungen ist dies jedoch verboten.

Aus eigener Erfahrung ist es allerdings nicht unbedingt zu empfehlen, diese aufwendige Art der Sterilisation durchzuführen. Wenn man den Isolator mit Peressigsäure sterilisiert wie unter *Erste Sterilisation / Neubesatz S.11* beschrieben ist dies im Normalfall ausreichend. Dabei wird auch vermieden das die Ventile anschließend falsch eingestellt werden.

Isolatorenhaltung

Allgemeine Hinweise

Arbeiten mit Isolatoren erfordert grundsätzlich eine gute Organisation und ein Auge zum Detail. Die Vorgehensweisen wie hier beschrieben, sind Anhaltspunkte und Erfahrungen mit den Isolatoren der Firma Harlan-Isotec und nicht als Vollständig zu betrachten. Andere Haltungen haben andere Vorgehensweisen, die genauso richtig und funktionsfähig sind. Dieses Protokoll soll jeglich eine Hilfestellung sein wenn man wenig oder gar keine Erfahrung mit einer Isolatorenhaltung hat.

Am wichtigsten ist es, sich ständig bewusst zu machen, welcher Bereich steril ist / bleiben soll und welcher Bereich unsteril ist. Man muss sich schulen, auf Kleinigkeiten zu achten und sich selbst ständig kontrollieren, keine Kompromisse eingehen und sich immer gut überlegen, wann etwas schiefgehen könnte. Um so mehr man sich der Gefahr bewusst ist, um so leichter kann man sie vermeiden.

Grundsätzlich ist darauf zu achten sauber zu arbeiten. Alles was im Isolator benutzt wird (auch der Isolator selbst) sollte auch schon vor der Sterilisation so sauber wie möglich sein. Je weniger Keime vorhanden sind, umso geringer das Risiko. Der Zugang zur Isolatorenhaltung sollte auch auf die Personen beschränkt werden, die diese tatsächlich nutzen. Die Mitarbeiter sollten gut geschult werden um auch mit kritischen Situationen umgehen zu können. Tritt ein Problem (meist Loch im Handschuh) auf ist es wichtig sofort richtig zu handeln, und nicht erst viel Zeit darauf zu verwenden die relevante Person ausfindig zu machen.

Die Haltung im Überdruck ist grundsätzlich ein robustes System mit dem es unter Berücksichtigung der Protokolle relativ leicht möglich ist einen gewissen Hygienestatus aufrecht zu erhalten. Es ist dafür wichtig den Status im Isolator regelmäßig mit Probennahmen (Gramfärbung) zu überprüfen. Bei diesen Kontrollen sollte man sich darüber im Klaren sein, das immer nur der letzten Schleus-Vorgang überprüft wird. Bei der Probennahme ist immer ein Ausschleusen nötig, welches wiederum ein Risiko darstellt das erst nach einer weiteren Kontrolle bewertet werden kann.

Gefahr einer Kontamination besteht immer dann, wenn man den Isolator benutzt (Handschuhe können kaputt gehen) sowie bei jedem Ein- oder Ausschleusvorgang. Deshalb ist es grundsätzlich wichtig den Isolator nur dann zu öffnen, wenn dies unbedingt notwendig ist. Wird der Isolator geöffnet, sollte man immer so viele Vorgänge wie möglich (z.B. Probennahmen, Ausschleusen für Experimente, Material-Import, etc) miteinander verbinden. Je öfter der Isolator geöffnet wird, desto größer das Risiko! Auch die Innere Tür oder Kappe sollte aus diesem Grund nie länger geöffnet sein, als unbedingt notwendig.

Optional- jeder Nutzer hat hier seine eigenen Präferenzen!:

Jeder Isolator hat sein eigenes Paar autoklavierte Baumwollhandschuhe, die mindestens einmal in der Woche gewechselt werden. Die Handschuhe, die am Isolator selbst angebracht sind, werden nur mit diesen Baumwollhandschuhen „angezogen“. Dafür gibt es drei wesentliche Gründe:

- das Anziehen der Handschuhe ist viel leichter
- mögliche Kontamination von Isolator zu Isolator wird reduziert
- zusätzliche Schutzschicht zwischen den Handschuhen

Die Handschuhe eines Isolators (oder einer Schleuse) sind die größte Schwachstelle und müssen deshalb immer besonders sorgfältig und oft überprüft werden!! Deshalb werden diese bei jedem An- und Aus-ziehen kontrolliert!

(siehe Überprüfen des Isolators auf Schwachstellen S.41)

Zur Sterilisation, wie hier beschrieben, wird grundsätzlich Peressigsäure einer Konzentration von 3% verwendet, die man durch Verdünnung des Produktes „P3-Oxonia aktiv“ von Ecolab bekommt. (Verdünnungstabelle siehe *Peressigsäure Verdünnungstabelle S 73*).

Peressigsäure ist ein sehr starkes Desinfektionsmittel, welches schon als Gas/Aerosol eine sehr gute Wirkung hat, und deshalb eine einfache und effektive Desinfektion ermöglicht. Da die Dämpfe allerdings sehr ätzend sind, muß bei jeder Anwendung Schutzkleidung und eine Vollmaske getragen werden!

Diese Art der Tierhaltung ist sehr zeitaufwendig. Deshalb sollte man für alle Arbeiten immer genug Zeit einplanen. Fehler passieren meist dann, wenn man unter Zeitdruck steht.

Erste Sterilisierung / Neubesatz

Erste Schritte:

1. Säubern
2. „Leak Test“ Druckverlust testen
3. Sterilisation
4. Ventilation / Lüften
5. Ausstattung / Bestückung
6. Sterilitätstest

Zeitplanung: Säubern, Drucktest und Sterilisation kann an einem Tag durchgeführt werden. Ventilation und erste Bestückung frühestens am 2. Tag. Für den Sterilitätstest sollte mindestens eine Woche eingeplant werden, bevor die ersten Mäuse in den Isolator importiert werden.

1. Säubern des Isolators

Material:

- Tücher / Zewa
- Mildes Desinfektionsmittel (Pursept A)
- Seifenlauge

Als erstes muss der Isolator komplett leer geräumt werden. Dann wird der Isolator mit Seifenlauge und anschließend einem milden Desinfektionsmittel komplett gereinigt. Nicht vergessen, den Vorfilter der Abluft zu entfernen und mit milder Seifenlauge zu waschen. Alle Innenwände des Isolators werden mit einem Tuch und dem Desinfektionsmittel abgewischt. Die Wände des Isolators müssen gut trockengewischt werden, damit keine Wasserflecken zurückbleiben. Dabei den Isolator auf Schwachstellen / Löcher oder dergleichen überprüfen! Es muß hierbei nicht steril gearbeitet werden, aber es sollte so sauber wie möglich gearbeitet werden.

Anfällige Schwachstellen für Löcher:

- Handschuhe
- Ärmel
- Schweißnähte
- Port Kappen

(siehe auch: Überprüfen des Isolators auf Schwachstellen S.41)

Bei diesem Schritt werden auch die HEPA-Filter der Zu- und Abluft kontrolliert, ob diese getauscht oder gereinigt werden müssen. Es gilt als Faustregel für Abluftfilter bei Dauerbetrieb diese alle 1,5 bis 2 Jahre zu wechseln, die Filter der Zuluft (je nach Staubbelastung im Raum) alle 3 bis 4 Jahre. Das Protokoll zum Filterwechsel siehe *Filterwechsel am Isolator im laufenden Betrieb S.57*.

2. „Leak Test“ = Druckverlust testen

Hierbei wird der Isolator auf Gas-Dichtigkeit überprüft. Dazu wird die Lüfter-Einheit des Isolators eingeschaltet, der Vorfilter, inklusive Rohrverbindung, der Abluft ist nicht angebracht. Als Erstes wird das Zelt an sich getestet. Dazu wird zuerst die Abluft mit dem orangenen Gummistopfen gut verschlossen. Die Hand/ der Ärmel in der Nähe der Abluft kann dann herausgezogen werden. Der Isolator soll sich stark aufblähen (Druckanzeige über 250 hPa) um dann die Zuluft auch mit einem Gummistopfen zu verschließen (es dabei mit dem Überdruck nicht übertreiben, man möchte den Isolator nicht unnötig stressen). Nun auch diese Hand aus dem Ärmel nehmen und beide Ärmel wieder etwas hineinstecken damit der Druck bei ca. 250-200hPa bleibt. (Tipp: Ärmel evtl. mit Wäscheklammern fixieren, bei „weichen“ Ärmeln ist das nicht nötig). Nun sollte der Druck innerhalb von 10 min nicht gravierend abfallen (Druckabfall sollte nicht mehr als 50hPa in 10min betragen).



Druck ansteigen lassen



Druck fällt dann meist etwas ab. Sollte nun beobachtet werden

Als Zweites wird die Druckdichtigkeit nur mit den blauen Ventilen getestet. Dabei überprüft man die Dichtigkeit der Rohr- und Schlauchverbindungen vom Zelt des Isolators bis zum Ventil, inklusive HEPA Filter. Es ist wichtig zuerst zu wissen das das Zelt an sich dicht ist, damit man bei einem eventuellen Druckabfall undichte Stellen schneller finden kann!



Die gelben Rohrkappen und die Dichtung zum HEPA Filter sind hier die häufigsten Gründe warum Luft austritt. Ein anderer Grund kann natürlich auch sein, das das Ventil an sich nicht mehr dicht schließt, oder die Gummidichtung am Filter porös oder gebrochen ist. Alles hinter dem HEPA Filter beeinträchtigt nicht die Sterilität des Isolators, aber ein Wechsel diverser Komponenten sollte immer vor Inbetriebnahme erfolgen



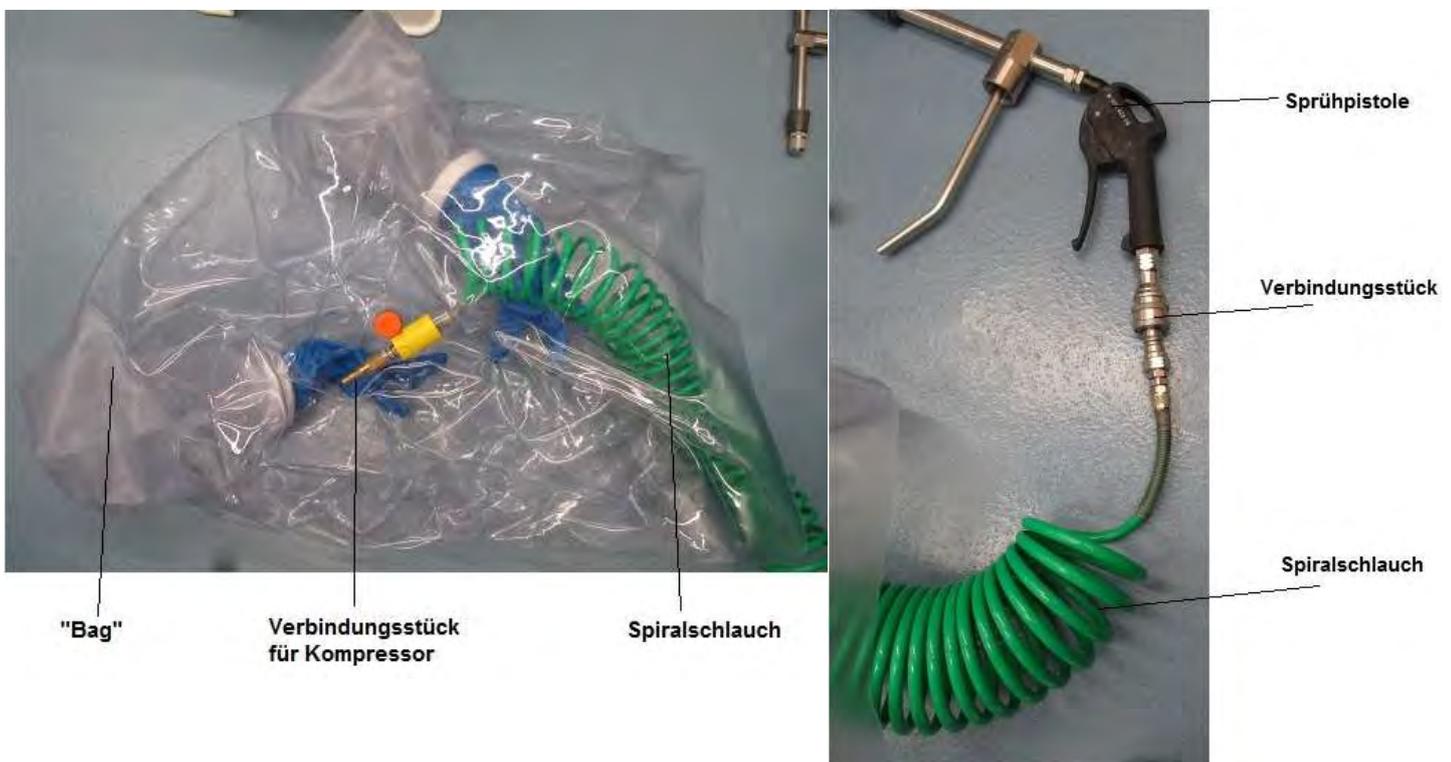
Sollte man feststellen dass der Druck beim ersten Test abfällt, sind mögliche Gründe alle Schwachstellen die regelmäßig überprüft werden sollten (*siehe Überprüfen des Isolators auf Schwachstellen S.41*).

3. Sterilisation

Material:

- 350ml 3%ige Peressigsäure (*Peressigsäure Verdünnungstabelle, S.73*)
- Vollmaske tragen
- Kompressor
- „Bag“ zum Einsprühen mit Sprühpistole/ Spiral-Schlauch
- Klammern / Gummi zum Befestigen am Port
- Innere Kappe / 2 Gummis und Klammer in den Isolator legen
- Für Zuchtisolatoren → Käfig Rack
- Vor-Filter und Anschlußwinkel für Abluft in den Isolator legen
- Material das nicht autoklaviert werden kann, aber in den Isolator eingesprüht werden sollen

Um den Isolator komplett einzusprühen, ohne den kompletten Raum mit Peressigsäure-Dämpfe zu vernebeln, muss der Port verschlossen werden. Hierfür wird die Sprühpistole am Spiralschlauch angebracht, welcher in einem „Bag“ durch eine der Sprüh-Öffnungen mit dem Kompressor verbunden wird. Die Peressigsäure-flasche (und eventuell zusätzliche Materialien) in den Isolator stellen. Dann Sprühpistole in den Port legen und den „Bag“ an den Port anbringen. Den Kompressor mit dem Spiralschlauch verbinden und einschalten.



Nun zieht man die Baumwollhandschuhe und die Handschuhe des Isolators an, und schraubt anschließend die Peressigsäure-Flasche an die Sprühpistole. Sicherstellen, dass die Verbindung von Sprühpistole zum Schlauch dicht ist (notfalls festdrehen). Ist dies der Fall, beginnt man damit den Isolator gut auszusprühen. Zuerst die Stopfen in der Zu- und Abluft entfernen und in die Öffnungen sprühen. Anschließend die Öffnungen wieder mit dem eingesprühten Stopfen verschließen.



An der Decke des Isolators beginnen, Rückwand, Seitenwände, Boden und übriges Material systematisch besprühen. Besonders sorgfältig bei schwierig zugänglichen Stellen arbeiten, wie z.B. die kleinen Taschen an den Seitenwänden, die Anschlußstellen des Druckschlauches, die Ecken und um den Port herum.



Anschlußstellen
Druckschlauch

Tasche



Port von Innen

Dann die Handschuhe und Ärmel einsprühen. Als letztes wird die Sichtfläche besprüht. Beim Sprühen darauf achten kurze Sprüh-stöße abzugeben. Wird der Hebel an der Pistole lange gedrückt, ist die Verteilung des Aerosols nicht so gut und man benötigt wesentlich mehr Peressigsäure. Grundsätzlich werden alle Oberflächen so besprüht, dass man überall eine feine Tröpfchenbildung erkennen kann. Ist die Innenseite ausreichend besprüht legt man die Pistole in den Port und verschließt diesen (Siehe auch *Anbringen der Port Kappen (Verschließen des Isolators) S.44*).

Von außen kann nun der „Bag“ wieder entfernt werden. Zur Sicherheit den Port von außen auch aussprühen, dabei vor allem bei dem Rand der inneren Kappe sorgfältig arbeiten. Durch die Sprühöffnung der Kappe auch die Luft im Port mit Peressigsäure sättigen, dann Verschlusskappe einsprühen und die Öffnung zügig verschließen.

Die Einwirkzeit für den Isolator beträgt mindestens 24h.

4. Ventilation / Lüften

Am nächsten Tag kann der Isolator in Betrieb genommen werden. Dazu schaltet man die Lüftereinheit ein und öffnet die blauen Ventile der Zu und Abluft. Die Stopfen, mit denen die Luftzufuhr im Isolator verschlossen wurde, müssen auch entfernt werden. Der Vor-Filter und Anschlußwinkel wird wieder auf das Abluft-Rohr gesteckt.



Die blauen Ventile der Zu- und Abluft nun so regulieren, dass ein konstanter Druck von ca. 125hPa angezeigt wird. Die Ventile sollten dabei eher auf einer offenen Position stehen um eine gute Luftzirkulation zu gewährleisten. Das heißt zuerst wird das Abluftventil komplett geöffnet, dann die Zuluft. Die Anzeige beim

Aufdrehen des Ventils kontrollieren, bis sich der gewünschte Druck eingestellt hat. (Dieser Druck kann auch erreicht werden, wenn die beiden Ventile fast geschlossen sind. Allerdings ist damit die erreichte Luftmenge zu gering um eine gewünschte 10 bis 20-fache Luftwechselrate pro Stunde zu erreichen; (*GV-Solas Tiergerechte Haltung von Labormäusen 7.2.3 Luftwechselraten im Raum*). Der Isolator sollte vor der ersten Bestückung 24h ventilieren können, um die Peressigsäure ausreichend abdampfen zu lassen. Ist der Isolator trocken hinterlässt die Peressigsäure weiße Flecken, die vor allem auf dem Boden und an den Handschuhen zu erkennen sind. Das ist normal und kann mit Wasser weitgehend entfernt werden.

5. Ausstattung / Bestückung

Bevor die ersten Mäuse in den Isolator gebracht werden, müssen die erforderlichen Materialien in den Isolator eingebracht werden. Bestimmend ist hierfür die spezifische Nutzung des Isolators. Je nach Experiment oder Anwendung sollten die Versorgungszylinder / Tonnen explizit bestückt werden.

Bei kleineren Isolatoren wird das Rack als erstes in einer Tonne autoklaviert und eingeschleust. Bei einem größeren Isolator (ab M40 Zuchtisolator) passt das Rack nicht in eine Tonne und muss deshalb schon bei der Sterilisation im Isolator vorhanden sein.

Siehe S.62 *Bestückung der Tonnen (Versorgungszylinder)*:

Bei allen Tonnen ist grundsätzlich zu beachten, dass diese nicht zu voll gepackt werden, um noch eine gute Zirkulation für den Autoklaviervorgang zu gewährleisten. Eine Chargenkontrolle muss grundsätzlich **immer** dabei sein und sollte an eine Stelle gepackt werden, die vom Dampf des Autoklaven schwer zugänglich ist, aber dennoch so weit vorne das sie beim Auspacken der Tonne leicht erreichbar und kontrolliert werden kann. Alle Materialien sollten so hineingepackt werden, dass alles wieder leicht entnommen werden kann. Kleine Teile im hinteren Teil der Tonne sind beim Einschleusen unerreichbar!! 2 Sets Wattestäbchen und Probegefäße für den Sterilitätstest müssen unbedingt in der ersten Tonne enthalten sein. Ein Set sollte sofort zur Probenahme hergenommen werden, das zweite ist zur Kontrolle/als Ersatz dabei. Sollte der erste Test unklar sein, kann man diesen zeitnah wiederholen. Set enthält:

- 4 Wattestäbchen
- 4x2ml Eppis
- 2x5ml Eppis

Wie beschrieben unter *Einschleusvorgang S.29*

6. Sterilitätstest / Probenahme vor Mäuseimport

Der Isolator muss vor den Probenahmen ausreichend belüftet werden, damit keine Peressigsäure-Reste mehr im Isolator sind. Bei den Probenahmen ist darauf zu achten das keine Peressigsäure aus der Schleuse / Port an die Proben gelangt, da sonst eine eventuelle Kontamination nicht entdeckt werden kann.

Außerdem sollten sämtliche Käfige, Tücher, Tüten, Wasser, Futter und Einstreu im Isolator vorhanden sein, um möglichst umfangreich testen zu können.

Zur Probenahme werden 3 bis 4 Wattestäbchen mit Wasser von den Trinkwasserflaschen benetzt und damit jegliche Stellen im Isolator „ausgewischt“.

Stellen, die nicht vergessen werden sollten:

- Rohr für die Zu- und Abluft
- Schwarze Verbindungsstücke / Druckluftschlauch
- die Taschen an den Seiten
- das Rack, an diversen unzugänglichen Stellen, Bohrlöcher
- Handschuhe
- Borsten des blauen Besen, Käfige, etc...
- um den Port selbst
- Sonstige Oberflächen
- Wenn Wasserflaschen und Futter vorhanden: Probe vom aufgeweichten Futter
- Einstreu mit Wasser vermischt.

Die benutzten Wattestäbchen in die 2ml Eppis geben (Stiel abbrechen)
Futter/Wasser/Einstreu Gemisch in die 5ml Eppis geben.

Die Proben werden am gleichen Tag entnommen und sollten deshalb mit einem geplanten Ein- oder Ausschleusvorgang verbunden werden.

Proben-Aufbereitung:Material:

- Sterilbank / Alkohol zur Desinfektion
- 3 Platten Blutagar
- Sterile Pinzette
- LB Medium
- Objektträger (mit Bleistift beschriften!)

Die Wattestäbchen werden unter einer Sterilbank mit einer Pinzette steril entnommen und auf Blutagar ausgestrichen. Von den Futter/Wasser/Einstreu Gemisch wird eine Gramfärbung gemacht und anschließend LB Medium dazugegeben. Für die Gramfärbung das Eppi gut vortexen, die größeren Teile kurz absetzen lassen, vom flüssigen Überstand etwas herauspipettieren, auf einem Objektträger ausstreichen und eine Gramfärbung nach einem allgemeinen Protokoll durchführen.

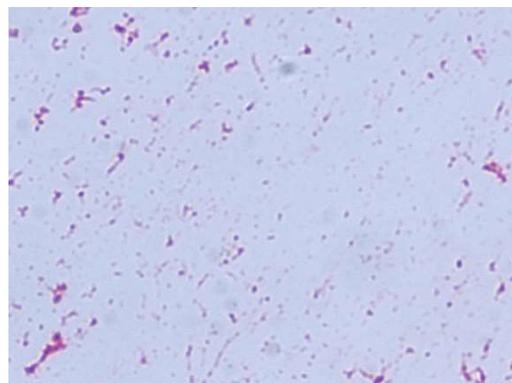
Die Platten und Flüssigkultur **mindestens eine Woche** bei 37°C bebrüten. Eine aerobe Inkubation sollte ausreichen, da eine Kontamination mit anaeroben Bakterien unwahrscheinlich ist.

Mäuse sollten erst dann importiert werden, wenn der Sterilitätstest negativ ausgefallen ist.

Dies ist nur ein kurzes Protokoll zum Testen des Isolators. Es ist zu empfehlen sich mit erfahrenen Mikrobiologen auszutauschen, wie ein solcher Test am Besten durchgeführt werden sollte. Außerdem ist eine Gramfärbung von Fecesproben nicht immer einfach zu beurteilen und erfordert Erfahrung und Übung um eine richtige Aussage treffen zu können.



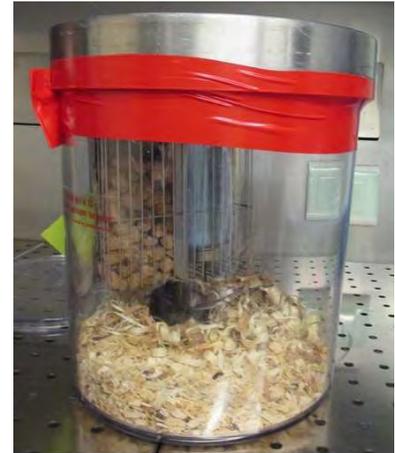
Gramfärbung mit Bakterien



Gramfärbung keimfrei

Mäuse Export - Import

1. Vorbereitung der Tonnen - Export
2. Ausschleus-Vorgang
3. Transport
4. Einschleus-Vorgang
5. Tierpflege
6. Tägliche Kontrolle



Gnoto-Käfig

1. Vorbereitung der Tonnen - Export

Zuerst sollte man sich bewußt machen, zu welchem Zweck die Mäuse ausgeschleust werden sollen:

- Experiment → wieder einschleusen in Isolator
- Verschicken
- Sampeln / Probenahmen

Die Mäuse werden immer in sog. Gnotokäfigen ausgeschleust. Maximal passen 4 Gnotokäfige in eine Tonne. Wenn es sich um Mäuse handelt, die wieder eingeschleust werden, sollte der Besatz 5 Mäuse pro Käfig nicht überschreiten. Das heißt in einem Ausschleus-Vorgang für Experimente können maximal 20 Mäuse ausgeschleust werden.

Werden die Mäuse nur für Organentnahme verwendet, können auch mehr Mäuse im Käfig sein. Es muß nur bedacht werden, das die Tiere in solchen Käfigen nicht länger als 24h gehalten werden dürfen.

Handelt es sich um Mäuse zum Verschicken, gelten die gleichen Regeln wie bei den Experimenten, da davon ausgegangen werden muss, dass diese Mäuse auch wieder eingeschleust werden müssen.

Außerdem muß bei der Bestückung der Tonne bedacht werden, ob die Mäuse von einem keimfreien Isolator kommen, oder ob es sich um kolonisierte (S2) Mäuse handelt! (abgeklebte Filterdeckel!)



Filterdeckel

Filterdeckel mit Plastikdeckel
abgeklebt

Zusätzlich sollte man bedenken was in dem Isolator sonst noch gebraucht wird und sofern möglich bei dieser Gelegenheit mit in die Tonne gepackt werden kann. Z.B. Futter, Einstreu, Tüten etc... (siehe auch *Bestückung der Tonnen (Versorgungszylinder)* S. 62)

Tonne für Keimfrei:

- Gnotokäfige
- Chargenkontrolle
- Filterdeckel, Futterraufen / leere Tränkflaschen falls nötig (in den Gnotokäfig stellen, nicht einhängen, da sonst Gefahr besteht mit den spitzen Haken der Raufe die Folie oder Handschuhe zu verletzen!!)
Klebeband
- Beim Verschicken: kleine Autoklavierbeutel für Naßfutter (Flaschen können nicht verwendet werden, da diese beim Transport auslaufen würden)
- Bei S2 Tieren: Filterdeckel müssen schon mit einem Plastikdeckel abgeklebt sein, da die Gnotokäfige beim Ausschleusen noch einmal eingesprüht werden müssen!



Deckel abgeklebt

Die Tonne verschließen, mit einem Tuch abdecken und autoklavieren. Das Tuch wird dann später in der entsprechenden Schleuse (Umkleide D) wieder abgenommen und dient dazu, die Tonne auf dem Transportweg sauber zu halten.

Autoklavierprogramm: 30min Sterilisation bei 121°C, 20min Trockenzeit

WICHTIG: Filter sind nur im trockenen Zustand effektiv!! Nach dem Autoklavieren muß man die Tonne abtasten um zu überprüfen ob der Filter der Tonne ausreichend getrocknet ist!!!

Stellt man fest, dass der Filter noch feucht ist, darf die Tonne nicht verwendet werden!!!

Die autoklavierte Tonne sollte möglichst am nächsten Tag verwendet werden. Es ist nicht ratsam die Tonne tagelang stehen zu lassen bis sie gebraucht wird. Der Filter garantiert zwar Sterilität, aber je länger etwas einer unsterilen Umgebung ausgesetzt ist, umso größer ist das Risiko das etwas passiert.



2. Ausschleus-Vorgang

Materialien:

- 200ml 3% Peressigsäure
- Sprühpistole
- Atemschutzmaske
- Blaue Pipettenspitze
- Tonne mit Gnotokäfigen (autoklaviert)
- Schleuse Tonne-Isolator
- (Materialien die in den Isolator gesprüht werden sollen)
- 2. Person

Beim Ausschleusen gibt es verschiedene Möglichkeiten:

- Separates Ausschleusen das einen Import der Transportkäfige (Gnotokäfige) erfordert (wie unten beschrieben)
- Direktes Umschleusen von Isolator zu Isolator (Vorgehensweise bleibt weitgehend gleich, mit dem Unterschied das 2 Isolatoren miteinander verbunden werden)
- Verbinden des Isolators mit speziellen Transport-Verpackungen (z.b. Taconic shippers, hier nicht beschrieben)

Ausschleusen mit Import der Transportkäfige:

Die Tonne wird in den jeweiligen Raum gefahren und entweder auf den Hubwagen gestellt, oder befindet sich schon auf einem Wagen, der ein andocken an den gewünschten Isolator ermöglicht. Es ist darauf zu achten das die Tonne auf einer rutschfesten Unterlage steht, damit sie nicht vom Wagen rutschen kann.

Bevor man die Tonne an den Isolator anschließt noch einmal alles Wichtige kontrollieren:

Tonne:

- Filter trocken?
- Mylar-Folie ohne Risse?
- Rand des Klebebands ohne Falten oder Vertiefungen die schlecht ausgesprüht werden können

Verbindungsschleuse:

- Handschuhe ohne Loch?
- Schweißnähte noch in Ordnung?
- Ärmel, PVC allgemein in gutem Zustand?

Isolator:

- Druckanzeige in Ordnung?
- Äußere Kappe in Ordnung, richtig angebracht?
- Innere Kappe in Ordnung, richtig verschlossen?

Erst wenn diese Kontrollen abgeschlossen sind wird die Verbindungsschleuse angebracht und mit Gummiband und Klammer fixiert.

Den Wagen mit der Tonne nun in die richtige Position bringen um diese am Isolator anschließen zu können.

Nun die Atemschutzmaske verwenden und die Peressigsäure an die Sprühpistole anbringen. Kompressor einschalten. Die äußere Kappe des Isolators entfernen und den Port aussprühen. Es ist besonders darauf zu achten, dass der Spalt zwischen Kappe und Rohr gut eingesprüht wird.



Die Innenseite des Port gut einsprühen



Besonders den Rand zur inneren Kappe gut aussprühen. Dabei die Kappe ggf. nach innen drücken

Materialien, die mit Peressigsäure eingesprüht werden können, werden abgesprüht und in den Port gelegt.

Anschließend wird die Schleuse mit dem Port verbunden und wiederum mit Gummibändern und Klammer fixiert.





Durch die Sprühöffnungen der Schleuse wird diese nun systematisch eingesprüht.



Alle Oberflächen sollen dabei gut benetzt werden. Das Sprühen soll wiederum, wie schon bei der Sterilisation des Isolators, in kurzen Sprühstößen erfolgen um eine gute Aerosolbildung zu gewährleisten. Besonders gründlich sind die Handschuhe und Ärmel der Schleuse einzusprühen. Die Schleuse bläht sich bei dem Einsprühvorgang etwas auf. Die Kappen beim Herausziehen der Sprühpistole einsprühen und die Öffnung zügig verschließen.

Einwirkzeit 40min

Der Druck in der Schleuse sollte nach der Einwirkzeit nicht wesentlich nachgelassen haben. Hat die Schleuse viel Druck verloren, muss davon ausgegangen werden, dass die Schleuse undicht ist. In diesem Fall müssen die Schwachstellen noch einmal genau überprüft werden, bevor die Tonne geöffnet wird!

Potentielle Schwachstellen:

- Verbindung- Schleuse-Tonne
- Verbindung-Schleuse-Isolator
- Schweißnähte der Schleuse
- Handschuhe

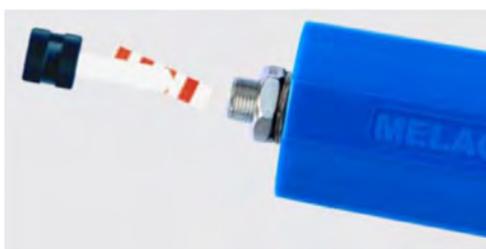
Ist alles in Ordnung können die Materialien, die sich im Port befinden, in den Isolator eingebracht werden.

Dazu die Baumwollhandschuhe für den Isolator (oder Frische) verwenden. Dann die Handschuhe des Isolators anziehen und als Erstes die Handschuhkontrolle vornehmen. Dann kann die Kappe des Ports entfernt werden und das Material eingebracht werden. Alles mit einem Tuch abwischen um die Mäuse nicht zu lange den Peressigsäure-dampf auszusetzen. Die blaue Pipettenspitze im Port lassen. Das getränkte Tuch auch in die Schleuse legen.

Die innere Kappe des Isolators auf Löcher hin überprüfen! Dann den Port wieder schließen. (siehe auch *Anbringen der Port Kappen (Verschließen des Isolators) S.44*)

Nun kann die Tonne geöffnet werden. Dazu ist die zweite Person von Vorteil, die nun Baumwollhandschuhe anzieht um in die Handschuhe der Schleuse zu gehen. Mit Hilfe der blauen Pipettenspitze die Mylar-Folie durchstechen und aufreißen.

Zuerst wird die Chargenkontrolle der Tonne entnommen um den Autoklaviervorgang zu überprüfen.



Auswertung MelaPro Kontrollstreifen

	Hellbraune Verfärbung: Temperatur, Keine Luftentfernung, somit keine Dampfdurchdringung
	Unvollständiger Farbumschlag: Unzureichende Luftentfernung und unzureichende Dampfdurchdringung
	Vollständiger Farbumschlag: Ausreichende Dampfdurchdringung, Sterilisiertemperatur und -zeit

Ist der Teststreifen schwarz kann der Inhalt der Tonne komplett in den Isolator importiert werden. Dies ist zu zweit viel einfacher da man die Gnotokäfige und Materialien direkt weiterreichen kann.

Bei den Filterdeckeln ist darauf zu achten das der Filter nicht naß wird! Dieser darf also nicht mit den nassen Wänden der Schleuse in Berührung kommen!

Es gilt das gleiche Prinzip wie für den Filter der Tonne. Ein feuchter / nasser Filter ist nicht dicht!!!

Nun können die Mäuse in die Gnotokäfige verpackt werden.

Zum Umschleusen oder Verschicken der Mäuse muss in die kleine Autoklaviertüte ausreichend Nassfutter gefüllt werden. Der Rand der Tüte wird dann so weit wie möglich umgeschlagen um den Mäusen den Zugang zum Futter zu ermöglichen.

Etwas Nistmaterial und normales Futter noch hinzugeben (kann direkt vom Käfig mitgenommen werden).

Ist eine Futterraufe vorhanden kann dort Futter und eventuell eine Tränkflasche benutzt werden (nicht zum Verschicken! Flasche läuft aus!).

Ist alles für die Mäuse vorhanden, den Käfig verschließen. Beim Zukleben darauf achten das der obere Rand frei bleibt, bzw. das obere Klebeband nicht überdeckt wird. Eine Lasche am Ende lassen, um das spätere Öffnen im Isolator zu vereinfachen.



Klebeband - Plastikdeckel

← Spalt freilassen

Klebeband - Käfig

Alle Materialien die nun im Isolator nicht mehr benötigt werden können zurück in die Tonne gepackt werden. Die Gnotokäfige teils in die Tonne teils in der Schleuse stehen lassen. Dann den Isolator von innen wieder verschließen. Ist alles dicht kann die Schleuse abgenommen werden.



Handelt es sich um S2 Tiere muss die Tonne mit einem Beutel verschlossen werden und die Schleuse nochmals mit Peressigsäure ausgesprüht werden um die S2 Keime abzutöten.

Einwirkzeit 20min

Atemschutzmaske benutzen!

Schleuse vom Isolator abnehmen. Gnotokäfige vorsichtig herausnehmen.

Bei S2 Tieren, nun den Plastikdeckel entfernen, damit die Mäuse nicht ersticken. → Tonne richtig verschlossen autoklavieren um S2 Keime abzutöten.

Den Port einmal durchwischen, nochmals aussprühen und mit der äußeren Kappe wieder verschließen. Über die Sprühöffnungen die Luft im Port sättigen. Das Sterilisieren des Ports nach dem Entfernen der Schleuse gibt eine zusätzliche Sicherheit um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Diese Vorsichtsmaßnahme ist speziell bei der Verwendung der Kappen zu empfehlen, da unter diesen Umständen kleine Löcher an der inneren Kappe keine schlimmen Folgen nach sich ziehen. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die Gummis an den Ports durch den ständigen Kontakt mit Peressigsäure mit der Zeit porös werden. Darum ist es zu empfehlen diese so trocken wie möglich zu halten, bzw. rechtzeitig auszutauschen, bevor sie reißen.

Die Schleuse/Schlauch wird mit Tüchern ausgewischt um die Peressigsäure Reste zu entfernen. Dann die Schleuse mit klarem Wasser durchspülen. Die Handschuhe und Ärmel gut ausspülen, damit das Material nicht vorzeitig porös wird.

3. Transport

Die Mäuse werden in den Gnotokäfigen in einen zusätzlichen Behälter / Kiste gepackt, in dem die Käfige nicht umfallen können und sicher in einem Auto oder auf einem Wagen transportiert werden können.

Für Fahrten auf öffentlichen Straßen ist es Pflicht, einen Warenbegleitschein mitzuführen. (Artikel 18.2 THE CARTAGENA PROTOCOL ON BIOSAFETY)

Weiterhin ist darauf zu achten, dass die Tiere nicht unnötigen Erschütterungen ausgesetzt werden und die äußeren Verhältnisse wie Temperatur und Feuchte für die Tiere keine Extrembelastung darstellen.

4. Einschleusvorgang

Materialien:

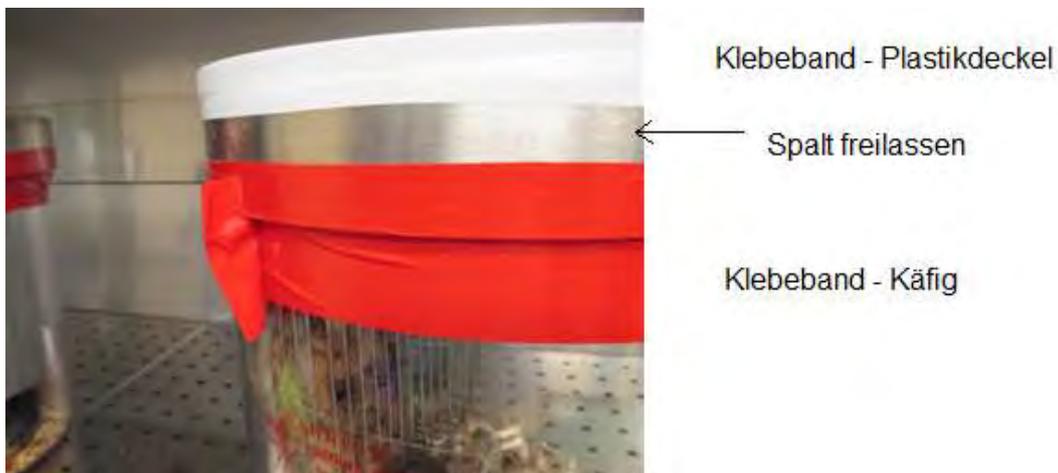
- 200ml 3% Peressigsäure
- Sprühpistole
- Atemschutzmaske
- Gnotokäfige, und Plastikdeckel zum luftdichten verschließen
- Port „Bag“ zum Einschleusen oder falls eine Tonne mit eingeschleust wird, eine Schleuse Tonne – Isolator
- Weißer Isolator-wagen (Port stand), oder sonstige Vorrichtung um die Fläche unter der Schleuse zu unterstützen
- Blaue Pipettenspitze und eventuell eine Tonne die gleichzeitig mit eingeschleust werden soll
- Uhr um die Zeit messen zu können
- 2. Person

Der Einschleusvorgang sollte auf jeden Fall von 2 Personen durchgeführt werden, da immer eine Person die Käfige / Materialien festhalten kann, während die andere Person das Einsprühen übernimmt.

Zuerst wird die Schleuse oder der „Bag“ auf Schwachstellen / Löcher überprüft, wie dies schon beim Ausschleusen der Fall war. Anschließend wird der Bag eingesprüht. (Atemschutzmaske verwenden!) Da die Gnotokäfige recht groß sind, ist es einfacher alle Oberflächen schon jetzt einzusprühen, als dies erst dann zu tun, wenn die Schleuse am Isolator angebracht ist.

Wird eine Tonne mit eingeschleust, wird auch diese überprüft, in die richtige Position gebracht und ausgesprüht.

Sind diese Vorbereitungen abgeschlossen, werden die Gnotokäfige mit dem Plastikdeckel luftdicht verschlossen. Dabei beachten, das sich die beiden Klebebänder nicht überlagern, sonst kann der Käfig im Isolator nicht steril geöffnet werden! **Der Bereich unter dem Plastikdeckel und neu angebrachtem Klebeband ist nicht steril!!**



Nun die Zeit vermerken, ab wann die Käfige luftdicht verschlossen wurden! Die Mäuse sollten nicht länger als **eine Stunde** in den Käfigen ohne Frischluftzufuhr ausharren müssen. Alle weiteren Schritte sollten sorgfältig aber auch zügig durchgeführt werden um die Zeit von einer Stunde nicht zu überschreiten. Ansonsten droht Erstickungsgefahr für die Mäuse!!

Zuerst wird der Port am Isolator ausgesprüht. Der erste Gnotokäfig kann anschließend in den Port gestellt werden und wird gut abgesprüht. Besonders sorgfältig ist die Lasche des Klebebands einzusprühen.



Jetzt die Schleuse / Tonne / „Bag“ in die richtige Position bringen und den Wagen oder andere Vorrichtung so ausrichten, dass die Käfige in der Schleuse / „Bag“ in der Einwirkzeit abgestellt werden können.

Die Zweite Person kann dabei den Käfig so drehen, das alle Stellen gut erreichbar sind. Dies wird so oft wiederholt, bis alle Gnotokäfige eingesprüht sind.



Anschließend bringt die erste Person die Schleuse am Isolator an und befestigt diese mit Gummi und Klammer.



Anschließend wird die Schleuse über die Sprühöffnungen nochmals gut eingesprüht, besonders wichtig ist dabei die Verbindungsstelle zum Isolator! Die zweite Person hilft dabei die Gnotokäfige immer so zu verschieben, dass alle Stellen gut erreicht werden können und die Luft in der Schleuse am Ende gut mit Peressigsäure-Aerosolen gesättigt ist. Die Sprüh-öffnung zügig verschließen.



Die **Einwirkzeit sollte mindestens 30 Minuten betragen**, aber insgesamt muss darauf geachtet werden, dass die Zeit für die Mäuse nicht zu knapp wird (**1 Stunde maximal luftdicht verpackt, Mäuse beobachten**).

Nach Ablauf der Zeit, die innere Kappe des Isolators entfernen und die Käfige in den Isolator einbringen und mit einem Tuch den Großteil der Peressigsäure entfernen. Bei allen Käfigen das untere Klebeband lösen und den Deckel kurz anheben um den Mäusen wieder Luft zukommen zu lassen.



Danach die innere Kappe des Isolators wieder anbringen. (S.44)

Jetzt können die Mäuse in die jeweiligen Käfige umgesetzt werden.



Wird eine Tonne mit eingeschleust, kann diese **bei geschlossenem Isolator geöffnet werden und die Chargenkontrolle überprüft werden.**

Ist alles in Ordnung kann das Material in den Isolator eingebracht werden. Müll, Gnotokäfige und überflüssiges Material kann dann, wie schon beim Ausschleusen mit herausgenommen werden.

Für S2 Experimente spezielle Vorgehensweise beachten!!

Ist alles erledigt, die innere Kappe wieder anbringen. Anschließend kann die Schleuse abgenommen werden.

Den Port nun einmal durchwischen, nochmals aussprühen und mit der äußeren Kappe wieder verschließen. Über die Sprühöffnungen die Luft im Port sättigen. Das Sterilisieren des Ports nach dem Entfernen der Schleuse gibt eine zusätzliche Sicherheit um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Diese Vorsichtsmaßnahme ist speziell bei der Verwendung der Kappen zu empfehlen, da unter diesen Umständen kleine Löcher an der inneren Kappe keine schlimmen Folgen nach sich ziehen.

Die Schleuse wird mit Tüchern ausgewischt um die Peressigsäure Reste zu entfernen. Dann die Schleuse mit klarem Wasser durchspülen. Die Handschuhe und Ärmel gut ausspülen, damit das Material nicht vorzeitig porös wird.

5. Tierpflege

Im Isolator wird die Tierpflege grundsätzlich genauso durchgeführt wie bei jeder anderen Haltung. Der einzige Unterschied dabei ist, dass alle benötigten Materialien schon im Isolator vorhanden sein müssen und nicht erst bei Bedarf geholt werden können.

Es empfiehlt sich deshalb folgende Materialien im Isolator immer griffbereit zu haben:

- autoklavierte Käfigkarten aus festerem buntem Papier
- unlackierter Bleistift (oder auch 2 wenn einer abbricht)
- festere Tücher zum Wischen (Papiertücher verursachen zu viel Staub, besser geeignet sind Fasertücher, z.B. Wipall X60)
- große Papiertüten oder kleinere Autoklaviertüten für den Müll (mind. 32x45cm)
- Kleine Papiertüten (für Proben, tote Mäuse etc.)
- Klebeband
- Teigschaber
- Große Pinzette (zum Mäuse-fangen und Material greifen)
- Besen (zum säubern des Isolators)
- Ausreichend Futter, Einstreu und Wasser
- Eppis für Proben



Kleine Tüten

Nistmaterial

Käfigkarten

große Tüten

Tücher



Wasserflaschen

Häuschen

Naßfutter

Mülltüte

Säcke Einstreu
Futter

Die einzelnen Bestandteile der Tierpflege sind:

- Umsetzen
- Absetzen
- Ohrmarkierungen setzen
- Wiegen für Experimente

Die hier aufgeführten Vorgehensweisen sind Empfehlungen und auf persönliche Erfahrungen zurückzuführen. Sie sollten also nicht als Vorschrift sondern eher als Anregung und Hilfestellung gesehen werden, die natürlich auf jeweilige Situationen, Linien und Erfahrungen angepasst werden können.

Umsetzen

Beim Umsetzen werden die Käfige nicht wie in anderen Haltungen gegen frische Käfige getauscht, sondern nur ausgekratzt, durchgewischt und wieder verwendet. Es empfiehlt sich, dafür einen leeren Käfig zur Verfügung zu haben. Dieser wird mit Einstreu gefüllt und neben den Käfig gestellt der umgesetzt werden soll. Die Mäuse, Nistmaterial und Häuschen werden, soweit noch sauber genug, vom Alten in den frischen Käfig gesetzt. Der Gitterdeckel wird vom ursprünglichen Käfig weiterbenutzt.



Mäuse, Häuschen etc umsetzen



Futter auffüllen

Beim Umsetzen sollte routinemäßig Geschlecht und Anzahl der Mäuse kontrolliert werden!



Käfig entleeren



Auskratzen / Säubern

Der frische Käfig mit den Mäusen wird wieder zurück in das Rack geschoben, der Dreckige in die Mülltüte geleert. Anschließend wird dieser mit einem Teigschaber ausgekratzt und mit einem Tuch ausgewischt. Danach wieder mit Einstreu befüllen und für den nächsten Käfig weiterverwenden.



Frisch befüllen



Fertig für den nächsten Käfig

Bei diesem System wird ein Käfig immer an die nächsten Mäuse weitergereicht. Es empfiehlt sich daher, das Umsetzen mit Männchen zu beginnen. Männchen tendieren zu Machtkämpfen wenn sie ihren „Eigengeruch“ neu etablieren müssen. Zu besonders schlimmen Machtkämpfen kann es kommen, wenn diese in einen Käfig gesetzt werden, in dem sich vorher Weibchen befanden. Bei manchen Linien empfiehlt es sich sogar, die Mäuse wieder in ihren eigenen Käfig zurückzusetzen um solche Kämpfe auf ein Minimum zu reduzieren. Weitere Maßnahmen um die Rivalenkämpfe zu reduzieren, sind ausreichend Nistmaterial zur Verfügung zu stellen und auf Häuschen zu verzichten. Das kann allerdings je nach Mauslinie unterschiedlich sein.

Weibchen sind in dieser Hinsicht unkompliziert und können im Normalfall auch aus verschiedenen Käfigen zusammengesetzt werden.

Absetzen

Grundsätzlich sollten die Mäuse beim Absetzen mindestens 21 Tage alt sein. Sind die Mäuse dann noch recht klein, kann man sie noch etwas länger bei der Mutter lassen, sofern diese nicht schon wieder hochschwanger ist. Bei den abgesetzten Mäusen immer etwas Nassfutter mit in den Käfig geben. Diese Maßnahme erleichtert die Umstellung vom säugen zu normalem Futter.

Sind mehrere Würfe zur selben Zeit abzusetzen ist es möglich Männchen aus verschiedenen Würfen in einen Käfig zu setzen. Sind die Mäuse noch jung, tendieren diese weniger zu Machtkämpfen. Sitten die Männchen allerdings schon länger getrennt sollte man diese nicht mehr zusammensetzen. Je nach Mauslinie kann dies unterschiedliche Probleme aufwerfen und sollte je nach Erfahrung gehandhabt werden.

Ohrmarkierungen setzen

Dies sollte gleich beim Absetzen geschehen, damit man Männchen und Weibchen von verschiedenen Würfen zusammen in einen Käfig setzen kann. Allein schon aus Platzgründen ist diese Vorgehensweise empfehlenswert.

Bei Linien die Genotypisiert werden müssen, sollte man das Absetzen, bzw. die Ohrlochung mit einem Einschleusvorgang verbinden, damit man den Isolator nicht extra für die Biopsien öffnen muss.



Biopsie für Genotypisierung

Wiegen der Tiere für Experimente

Bei vielen Versuchen ist man darauf angewiesen das Körpergewicht der Tiere regelmäßig zu überprüfen. Die Tiere im Isolator zu wiegen ist aber nicht unproblematisch, da man nicht einfach eine Waage mit hineinnehmen kann. Autoklavierbare Waagen gibt es nicht, also muss man sich etwas einfallen lassen.

Die Vorgehensweise hier ist relativ einfach, hat aber den Nachteil, dass das Gewicht nicht unbedingt als absolut oder sehr akkurat angesehen werden kann.

Eine Briefwaage (Proscale 222 oder 333) wird in eine Tüte eingeschweißt. Ein Abstandhalter aus festerem Papier dient dazu, dass der Becher besser auf der Wiegefläche aufliegt und der Wert nicht unnötig verfälscht wird.

Die Tüte kann nun mit Peressigsäure eingesprüht werden und die Mäuse mit einem Plastikbecher darauf gewogen werden.

Dabei muss nur beachtet werden das man die Waage auch auf NULL stellt, bevor man die Mäuse in den Becher „wirft“. Es erfordert etwas Übung, aber nach einer gewissen Zeit bekommt man ziemlich gute Werte, die sogar von den Gewichten außerhalb des Isolators gemessen, nicht übermäßig abweichen.

6. Tägliche Kontrolle

Bei einer Isolatorhaltung beschränkt sich die Kontrolle nicht nur auf die Mäuse sondern erstreckt sich auch auf den gesamten Isolator. Ist dieser nicht in einem einwandfreien Zustand, ist die Haltung darin immer in Gefahr. Die Kontrolle ist daher einer der Wichtigsten, wenn nicht DER wichtigste Aspekt in Bezug auf die Aufrechterhaltung eines entsprechenden Hygienezustandes.

Siehe auch Überprüfen des Isolators auf Schwachstellen S.41

Gesamtzustand – Druckanzeige

Je nachdem, ob der Isolator im Überdruck oder Unterdruck läuft, wird zunächst die Anzeige überprüft. Ist der Druck stark abgefallen wird automatisch ein Alarm ausgelöst, ein zu hoher Druck hingegen würde unbemerkt bleiben, den Isolator aber auf Dauer schaden, da die Schweißnähte unnötig belastet würden.

Ein veränderter Druck kann folgende Ursachen haben:

- Druck zu niedrig:
 - Lüftereinheit nicht eingeschaltet (Stromausfall oder versehentlich ausgeschaltet)
 - Zuluft Ventil (Isolator) wurde verstellt / nicht weit genug geöffnet
 - Ist der Isolator direkt an die Raum-Abluft angeschlossen, könnte diese zu stark ziehen (kann nach/bei Wartung der Lüftungsanlage auftreten)
 - Zuluft-Filter verstopft (Vorfilter, oder HEPA-Filter)
 - Isolator hat ein (großes) Loch (ist das Loch klein kann man keine Druckveränderung feststellen)

- Druck zu hoch:
 - Abluft-Schlauch ist nicht am Stutzen angebracht
 - Abluft- Ventil (Isolator) wurde verstellt / ist nicht weit genug geöffnet
 - Raum-Abluft „zieht“ zu wenig, oder steht (Brandschutzklappen zu?? nach Wartung der Lüftung möglich)
 - Abluftfilter verstopft (Vorfilter im Isolator oder HEPA-Filter)

Überprüfen der Nähte

Die Schweißnähte des Isolators sind vor allem im Überdruck einer ständigen mechanischen Belastung ausgesetzt, die im Laufe der Zeit die Nähte schwächt und eventuell reißen lässt. Die Nähte unter den Ärmeln sind durch die ständige Benutzung am stärksten beansprucht und deshalb besonders anfällig. Bei der Kontrolle auf hellere Stellen achten und eventuell ein Leck-Such-Spray verwenden um Undichtigkeiten zu erkennen.



Kontrolle der Kappen

Darauf achten das die Gummibänder gut übereinander liegen und die Klammer auf den Gummis aufliegt. Auch die Dichtigkeit der Kappen wird kontrolliert. Bläht sich die äußere Kappe auf, ist die Innere nicht dicht verschlossen. Dazu sollte man einen Verschluss der äußeren Kappe öffnen und etwas Luft ablassen, dann wieder schließen und die Kappe beobachten. Es kann sein, dass eine Wölbung der Kappe noch vom letzten Sprühvorgang verursacht wurde. Bläht sie sich wieder auf ist die innere Kappe undicht, bleibt es unverändert ist alles in Ordnung. Eine undichte innere Kappe sollte beim nächsten Schleusenvorgang gut kontrolliert und eventuell die Kappe selbst, oder die zugehörigen Gummis, ausgetauscht werden. Auf keinen Fall versuchen die innere Kappe ohne Sterilisiervorgang dicht zu bekommen!!

Handschuhkontrolle: siehe auch S. 41

Ist soweit alles in Ordnung werden die Baumwollhandschuhe für den Isolator angezogen bevor man die Handschuhe des Isolators überzieht. Danach werden diese Handschuhe sorgfältig auf Schwachstellen / Löcher untersucht. Besonders betroffene Stellen sind die Bereiche zwischen den Fingern und am Übergang zum Ärmel. An diesen Stellen ist der Handschuh oft geknickt und deshalb anfälliger für Löcher.

Die Handschuhkontrolle ist **immer** durchzuführen sobald die Handschuhe an- oder ausgezogen werden!!

Sind die Handschuhe nicht in Ordnung, muss der betreffende Handschuh / Ärmel herausgezogen werden und sofort mit der Ärmelklemme abgeklemmt werden. Die Kontrolle der Mäuse muss dann mit einer Hand durchgeführt werden. Mit dem betroffenen Handschuh, darf nicht's angefasst werden! Ist der Handschuh abgeklemmt kann dieser gewechselt werden. Siehe Protokoll *Handschuhwechsel S.49*.



Sind die Handschuhe in Ordnung können die Käfige kontrolliert werden. Dafür die Käfige nacheinander herausziehen und nachsehen, ob die Mäuse darin in Ordnung sind. Besondere Aufmerksamkeit ist dabei den Zuchtpaaren zu widmen. Sind alle Käfige kontrolliert, muss noch Wasser und Futter kontrolliert und gegebenenfalls aufgefüllt werden.

Jegliche Auffälligkeiten sind am Logsheet des jeweiligen Isolators zu notieren!

Überprüfen des Isolators auf Schwachstellen

Handschuhkontrolle:

Die wichtigste Kontrolle die immer dann durchgeführt wird wenn die Handschuhe an- oder ausgezogen werden.

Dabei die Stellen **zwischen den Fingern** besonders gut kontrollieren. Dadurch, dass der Handschuh dort immer knickt, sind diese Stellen besonders anfällig für Risse und kleine Löcher.

Auch an der Verbindung zum Ärmel ist eine Stelle die öfter Löcher aufweisen kann. Bei der Kontrolle die Ärmel an sich nicht vergessen! Diese Stellen können eventuell Schnitte aufweisen, die durch das Arbeiten im Isolator entstehen können!

Bei der Kontrolle das Handschuhmaterial etwas ziehen um die Stellen auch gut beurteilen zu können. Tritt ein Loch auf, ist dieses meist sehr klein und man kann erkennen dass das weiße Innenfutter durchscheint. (*Bild siehe Handschuhwechsel S.49*)

Es sollte beim Ausziehen der der Handschuhe deshalb immer darauf geachtet werden, die Handschuhe möglichst faltenlos in den Isolator hängen zu lassen. Handschuhe werden mit der Zeit porös. Erfahrungsgemäß halten sie gut ein Jahr lang, was allerdings auch insgesamt von Lagerzeit und Beanspruchung allgemein abhängig ist.



Gut zwischen den Fingern kontrollieren.



Ärmelverbindung. Dabei auch die Ärmel an sich mit kontrollieren, nicht nur das Handschuhmaterial!

Kontrolle der Schweißnähte

Die Schweißnähte sind die nächste Schwachstelle eines Folienisolators. Durch den Ständigen Überdruck sind diese einer konstanten mechanischen Belastung ausgesetzt. Im Laufe der Zeit kann dies dazu führen, dass die Nähte dünner werden und schließlich reißen.

Besonders belastet sind die Nähte unter den Armen, da diese durch die Bewegung bei der Arbeit im Isolator zusätzlich in Anspruch genommen werden.



Kontrolle der Zu- und Abluftverbindungen / HEPA-Filter

Bei den Rohren sind vor allem die gelben Kappen anfällig (falls überdreht-gerissen) genauso wie der Dichtungsring bei der Abdeckung des HEPA Filters. Sind die gelben Kappen betroffen ist die Sterilität im Isolator nicht mehr gewährleistet. Bei den Dichtungsringen ist ein pröser Ring nicht so schlimm, da dieser Bereich schon im „unsterilen“ Bereich, nach dem HEPA Filter liegt, sollte aber trotzdem zeitnah ausgetauscht werden. Dies ist zwar ohne weiteres auch im Betrieb möglich, bei der Zuluft ist es allerdings schwierig die Abdeckung zu entfernen ohne den Filter selbst abzuschrauben.



Abdeckung
(HEPA Filter)

O-Ring

gelbe
Kappen

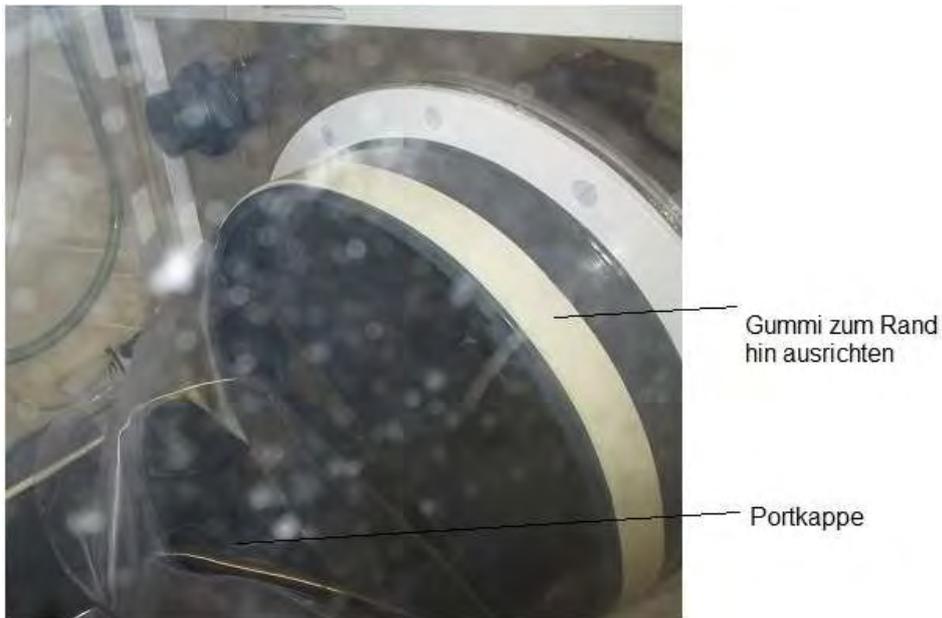
Eck-Verbindung



Anbringen der Port Kappen (Verschließen des Isolators)

Vorgehensweise von innen nach außen:

Erst einen Gummi an das Rohr anbringen und diesen zum Rand hin ausrichten damit er bündig mit dem Rohr abschließt.



Die Kappe anschließend über das Rohr und den Gummi stülpen und mit Hilfe des abstehenden Randes so weit wie möglich über das Rohr ziehen.



Kappe gut nach hinten ziehen, damit sie vorne gut abschließt

Nun den zweiten Gummi über die Kappe ziehen und so positionieren, daß er über dem ersten Gummi liegt.

Jetzt die Klammer über den Gummi legen und festklammern. Darauf achten, dass die Klammer komplett auf dem Gummi aufliegt und den Verschuß so ausrichten dass er auch beim Öffnen leicht zugänglich ist.



zweites
Gummiband über
die Kappe ziehen



Gummi so
ausrichten, das
dieser über dem
Ersten liegt



Klammer anbringen:
sollte überall auf dem
Gummi aufliegen

Zur Sicherheit den Port von außen auch aussprühen, dabei vor allem am Rand der inneren Kappe sorgfältig arbeiten.



Besonders den Rand zur inneren Kappe gut aussprühen. Dabei die Kappe ggf. nach innen drücken



Die Innenseite des Port gut einsprühen

Die äußere Kappe selbst absprühen und dann wieder am Isolator anbringen. Mit dem zweiten Gummi und Klammer fixieren.



Kappe außen mit Peressigsäure gut einsprühen

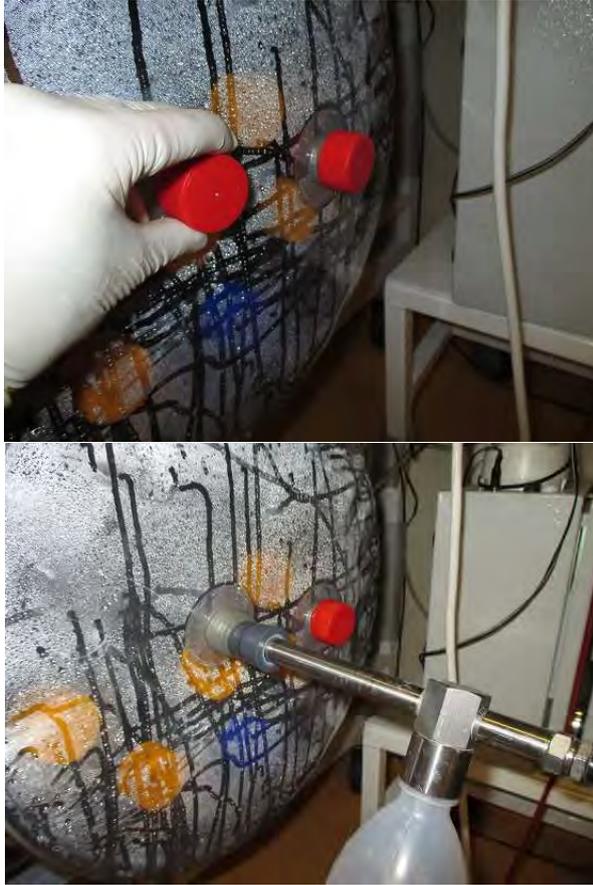


Äußere Port-Kappe:
Wieder erst den Gummi anbringen und nach vorne ausrichten,
dann Kappe darüberziehen



Gummis und Klammer müssen aufeinander liegen

Durch die Sprühöffnung der Kappe auch die Luft im Port mit Peressigsäure sättigen, dann Verschlusskappe einsprühen und die Öffnung zügig verschließen.



Handschuhwechsel

Hat man im Handschuh ein Loch entdeckt, muss dieser sofort abgeklemmt und so bald als möglich gewechselt werden. Wenn ein Handschuh einmal ein Loch hat, kann dieses schnell aufreißen und zu einem großen Problem werden. Ist es noch klein ist meist noch nicht's passiert (sofern der Isolator im Überdruck läuft).

Wie hier am Beispiel zu erkennen sind die Löcher am Anfang noch sehr klein. Nur als weiße Stellen sichtbar wenn man die Handschuhe etwas auseinander zieht.



Abklemmen:

Zuerst den Ärmel mit dem betroffenen Handschuh aus dem Isolator herausziehen, dann eine Klemme am Ärmel faltenfrei anbringen. Die Klemme sollte nicht zu hoch am Ärmel sitzen, aber auch nicht zu tief, damit man beim Anbringen des neuen Handschuh noch genug Platz hat.

Da die Klemme relativ schwer ist und eine gewisse Zeit dort hängen bleiben muss, diese am Rahmen des Isolators mit einem Gummi o.Ä. befestigen, damit auf der Schweißnaht des Ärmels nicht zu viel Zug entsteht!



nicht zu weit oben
abklemmen

faltenfrei abklemmen

genug Platz für
neuen Handschuh

Der Isolator ist jetzt sicher, und der alte Handschuh kann bequem entfernt werden. Dazu einfach alle Klebebänder lösen und den Handschuh aus dem Ärmel ziehen. Der Bereich unter der Klemme wird nun unsteril, der Bereich darüber bleibt steril. Diese Klemme ist nach dem Wechsel als letztes zu lösen!!

Die nächsten Schritte des Handschuhwechsels können dann unsteril stattfinden.

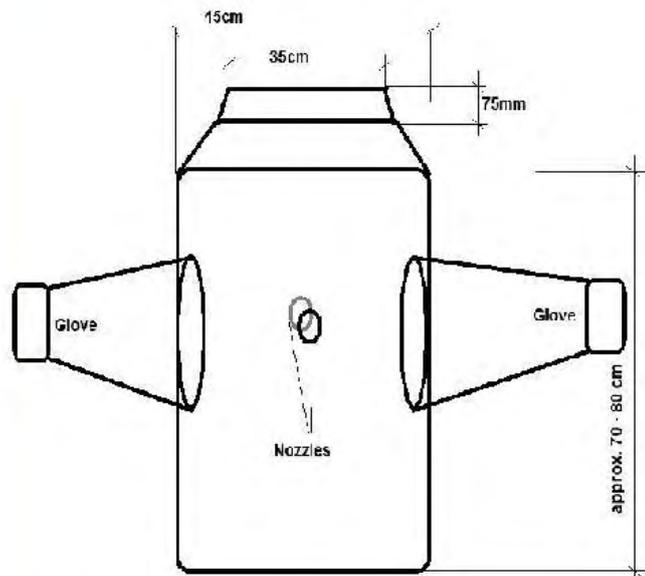
Man braucht zum sterilen Wechsel des Handschuhs einen neuen Handschuh, autoklavierte Schere, Klebeband und Tücher und einen sog. Glove-change-Bag.



Neuer Handschuh mit Plastik Ring und Dichtungsringen



Glove change Kit (Schere Tücher Klebeband) autoklaviert



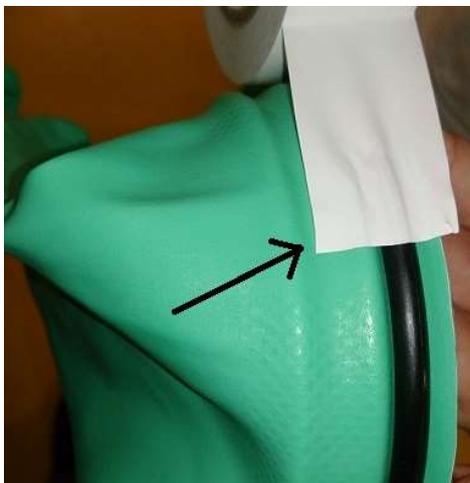
Der Glove-change-bag hat Sprayöffnungen vorne und hinten um das Einsprühen des Ärmels und Handschuhes zu erleichtern

Zuerst wird der neue Handschuh am Plastik-Ring angebracht. Dazu diesen Ring mit der verjüngenden Seite Richtung „Finger“ in den Handschuh stecken und mit dem ersten Gummi an der etwas breiteren Seite fixieren.



Nun das überstehende Ende des Handschuhs knapp am Plastikring abschneiden.

Jetzt wird das Ganze mit PVC Klebeband fixiert. Dabei muß das Klebeband gut gedehnt über den ersten Gummi aber nicht weiter als bis zur Mitte der zweiten Rille geklebt werden. Damit vermeidet man, dass das Klebeband ins Innere des Isolators kommt, wo sich das Klebeband lösen könnte und unsterile Stellen freilegen würde.



Klebeband gut auf Zug halten, damit es sich gut um den oberen Rand des Plastikringes legt.



Wird das Klebeband nicht straff genug gezogen bilden sich Falten und später kann sich das Klebeband leicht lösen!!



Den Bag und die Materialien darin am Besten schon vor dem anklebmen am Ärmel mit Peressigsäure aussprühen. Die am Ärmel angebrachte Klammer in den Bag stecken.



Dann den Bag am Ärmel über der ersten Klemme faltenfrei festklemmen.

Nun kann der Beutel noch einmal gut ausgesprüht werden. Besonders wichtig ist die Innenseite des Ärmels die sich nach dem Handschuhwechsel wieder im Isolator befindet und der Bereich um die erste Ärmelklemme.

Den Bag mit den Stopfen wieder verschließen und mindestens 20 min einwirken lassen.

Nach der Einwirkzeit kann der Handschuh dann angebracht werden. Die Bilder hier sind ohne Bag. Wird dies im Bag gemacht, wird erst das Ende des Ärmels mit den sterilen Tüchern trocken gewischt, genauso wie der Handschuh und der Gummi damit das Klebeband auf einer trockenen Fläche angebracht werden kann.

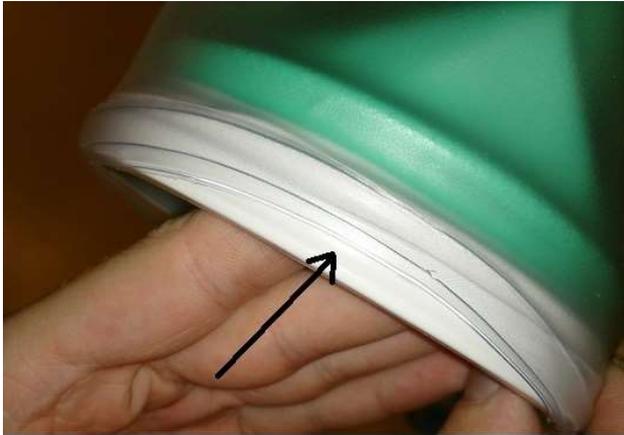


Den Handschuh in der richtigen Orientierung (Daumen nach oben) in den Ärmel stecken



Zweiten O-Ring über den Ärmel stecken, dann den Handschuh so weit zurückziehen das der Plastikring bündig mit dem Ende abschließt. Dann mit dem O-ring fixieren.

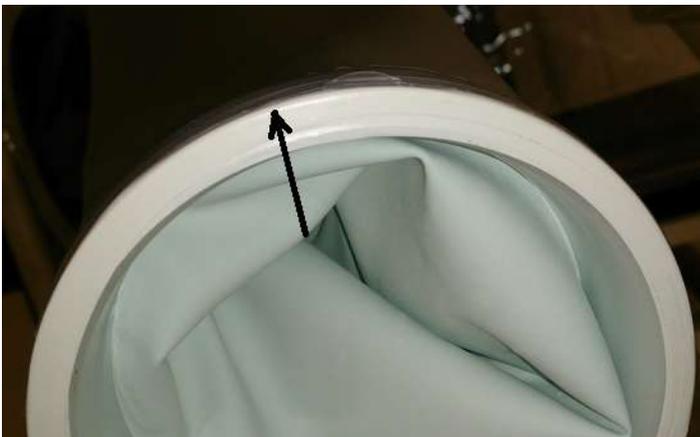
Das Ende des Ärmels soll bündig mit dem Plastikring abschließen, damit das Klebeband an beiden Teilen gut hält und sich nicht vorzeitig löst!



Schließt nicht bündig ab!



Ärmel steht zu weit über



Passt die Orientierung des Handschuh und schließt der Ärmel auch bündig ab, wird das Ganze mit dem Gummi fixiert. Dabei darauf achten, dass der Ärmel faltenfrei unter dem Gummi liegt!



Nun wird das ganze noch mit dem Klebeband fest angeklebt. Auch hierbei wieder darauf achten, dass das Klebeband gut straff angezogen wird und sich straff und Faltenfrei um das Ende des Ärmels und den Plastik ring legt. Je besser dies angeklebt ist, umso besser hält der Handschuh.



Damit kann nun der Bag wieder abgenommen werden. Vollmaske tragen, Persessigsäure-Dämpfe!!

Bevor die letzte Klemme entfernt wird, noch einmal überprüfen, ob der Handschuh richtig sitzt und fest ist.

Bis zum nächsten Tag den Ärmel noch herausgezogen lassen, damit der Rest der Peressigsäure abdampfen kann.

Filterwechsel am Isolator im laufenden Betrieb

Ein Filterwechsel sollte möglichst dann stattfinden, wenn der Isolator nicht in Betrieb ist. Bei einem Zuchtisolator ist dies meistens ein Dilemma, da man diesen im besten Fall über Jahre in Betrieb hat. Grundsätzlich wäre hier der Ratsschlag die Tiere in einem sauberen Isolator zu transferieren, diesen zu testen und erst nach erfolgreichem Transfer den Ursprungs-Isolator ausser Betrieb zu nehmen und dann die Filter des leeren Isolators zu wechseln. Sollte es dennoch notwendig werden den Filter im Betrieb zu wechseln, wenn der Druck im Isolator ansteigt oder abfällt und es außer einem verstopften Filter keine Erklärung für die Druckveränderung gibt sollte diese sehr sorgfältig überlegt und geplant werden. Bei manchen Isolatoren ist der Wechsel des Hepafilters der Zuluft gar nicht (mehr) möglich. Dies sollte bei den Routinekontrollen festgestellt werden, siehe *Tägliche Kontrolle S.38*.

Beim Wechsel im laufenden Betrieb ist das Risiko einer Kontamination besonders groß, wenn der Zuluft-Filter gewechselt werden muß! Dabei alle Teile sorgfältig desinfizieren! Dies nur durchführen wenn es nicht anders möglich ist. Ist die Zucht sehr wichtig ist es zu empfehlen einen Reserve-Isolator mit dieser Zucht zur Verfügung zu haben!

Wird der Filterwechsel durchgeführt wenn der Isolator sowieso gereinigt wird, ist der Vorgang derselbe, wobei man auf die Sterilisation mit Peressigsäure verzichten kann. Eine Begasung des HEPA Filters ist trotzdem zu empfehlen!

Material:

- 100ml 3% Peressigsäure
- HEPA Filter (mit H₂O₂ begast, steril verpackt)
- Sprühpistole, Kompressor

Vorgehensweise:

- Im Betrieb zuerst den zugehörige Zu- oder Abluftstutzen von innen mit dem Gummistopfen verschließen



- Verbindungsrohr abdrehen und die Klemmen daran lösen



Hier abdrehen

Klemmen lösen



- Den Verschuß der Schutzhülle des HEPA Filters öffnen



➤ Rohrverbindung lösen



HEPA Filter

Rohr nach vorne drücken und Filterabdeckung auf der Klammer absetzen Dann HEPA Filter abdrehen

Rohr



- HEPA Filter abdrehen und komplett mit Abdeckung entfernen
- In die Öffnung Peressigsäure sprühen
- Neuen Filter in die Abdeckung stecken
- Klammern der Hülle nach oben ausrichten und so wieder umgekehrt an das Rohr schrauben



Bei der Abdeckung, Verschlüsse hochgeklappt einsetzen



- Gelben Verschluss im Verbindungsstück herausdrehen und mit Peressigsäure einsprühen



- Verschluss wieder hineindreihen (nicht zu fest, sonst bricht das Gewinde!)
- Eine Stunde einwirken lassen
- Gummistopfen entfernen
- Isolator ist wieder betriebsbereit





Bestückung der Tonnen (Versorgungszylinder)

Immer zusätzlich zur Chargenkontrolle!!

Grundsätzliches:

Am wichtigsten ist bei der Bestückung der Versorgungszylinder zu beachten das nicht zu viel Material eingebracht wird und immer eine gute Zirkulation unter Sterilisationsbedingungen gegeben ist. Am besten sollte das System mit einer „vollgepackten“ Tonne und einem geeigneten Gerät validiert werden. Wobei die Validierungs-Kontrolle an einer schwer zugänglichen Stelle in der Tonne sein sollte. Wenn die Materialien nicht ausreichend sterilisiert werden können ist dies Kontaminationsquelle Nummer 1!!

Erstbesatz:

- 4 Käfige groß (6 klein) mit Gitter
- 4 Tränkflaschen mit Kappen
- Häuschen
- 1 Blech Futter
- 4-6 Beutel mit Einstreu
- Papiertüten (groß und klein)
- Tücher
- Eppies
- 2x Sterilitätstest Set:
 - 4 Wattestäbchen
 - 4x2ml Eppis
 - 2x5ml Eppis
- Nistmaterial
- Besen
- Bleistift
- Lange Pinzette



Futter / Einstreu:

- 4 Bleche mit Futterpellets (eine Schicht Futter jeweils!!)
- 3 leere Baumwollbeutel (zum Einfüllen des Futters)
- Bis zu 8 Beutel Einstreu, so arrangiert das man die Beutel wieder gut herausnehmen kann (mit Tüchern verschlossen, damit kein Einstreu herausfällt)
- Evtl Tücher, Tüten, Klebeband.... je nachdem was gebraucht wird

Das Futter darf immer nur in einer Schicht autoklaviert werden, um sicher zu gehen, das die Pellets durch und durch sterilisiert sind. Futter ist eines der häufigeren Kontaminationsquellen, da die Pellets so gepresst sind, das gute Dampfdurchdringung schwierig ist. Darum ist es auch wichtig, das das Autoklavierprogramm eine längere Sterilisierzeit hat, als „normale“ Autoklavierprogramme.

Autoklavierprogramm: 30min Sterilisation bei 132°C, 20min Trockenzeit (empfohlen für Arbeiten mit Keimfreien Tieren)

Um das Abfüllen später leichter zu machen, kann man durchlöchernte Autoklaviertüten verwenden, in denen das Futter nicht kleben bleibt. Es ist wichtig die Tüten gut zu durchlöchern, da ansonsten kein Dampf an die Pellets gelangt!!

Autoklavierbeutel, zugeschnitten und durchlöchert:



Beutel mit Einstreu „eingehängt“ um diese leicht aus der Tonne herausnehmen zu können:



Umschleusen / Gnotokäfige

- Bis zu 4 kleine Gnotokäfige
- Evtl. Raufen, kleine Tränkflaschen / Kappen
- Einstreu oder eine Schicht Futter im Gnotokäfig
- Filterdeckel / für S2 abgeklebte!!!
- Klebeband
- Beutel mit Einstreu, Papiertüten, Tücher etc. je nach Platz / oder was noch gebraucht wird

Um 4 Gnotokäfige in eine Tonne packen zu können, dürfen maximal die zwei untersten Bleche verwendet werden, sonst reicht der Platz in der Tonne nicht aus! Bei den kleineren Tonnen ist es sogar zu empfehlen nur das unterste Blech zu verwenden und dieses falsch herum in die Tonne zu schieben.

Wird die Raufe in den Gnotokäfigen verwendet, dies nicht im Becher einhängen, sondern einfach hineinstellen. Der Haken der Raufe ist scharfkantig und kann entweder die Mylar-Folie durchstechen oder später beim Ausräumen den Handschuh der Schleuse!!

Falsch!



scharfkantiger Haken,
nicht einhängen!!

Richtig



Deckel abgeklebt

Verschließen der Tonne

Wird die Tonne verschlossen wird ein Stück Mylar-Folie in der richtigen Größe abgeschnitten und diese faltenfrei über die Öffnung der Tonne gelegt.

Zur Vorbereitung schneidet man sich auch kleine Stückchen Klebeband zurecht, um mit diesen die Folie an der Tonne zu befestigen.

Zuerst klebt man die Folie am unteren Ende ca. 1 cm hinter dem Tonnenrand fest. Dann schneidet man das obere Ende so ab, dass auch hier ca. 1 cm Folie übersteht und klebt dies auch sofort fest. Nun kann man links und rechts genauso verfahren. Ist die Folie an 4 Stellen fixiert, ist es einfacher mit der Schere die Folie so zurechtzuschneiden, dass rund um die Tonne ca. 1 cm übersteht.



Jetzt alles mit vielen kleinen Klebestücken und unter Zug festkleben. Die Folie soll am Ende straff über der Öffnung sitzen.



Ist alles gut fixiert benutzt man das 5cm breite Klebeband und klebt alles gut fest. Dabei das Klebeband gut straff ziehen um Falten zu vermeiden. Man beginnt ca. 5mm hinter den kleinen Klebestreifen und zieht das Klebeband eine Runde um die Tonne um alle Klebestreifen abzudecken.





Bei einer zweiten Runde wird es etwas mehr nach vorne gezogen damit sich dort ein ca. 1 cm breiter Rand um das Ende der Tonne legt. Ist der Kreis komplett, das Klebeband wieder leicht nach hinten führen, damit man es ohne Falten am Rand der Tonne abschneiden kann.

Die Mylarfolie sollte am Ende noch immer straff über der Öffnung liegen und vor allem am Rand zum Klebeband keine Falten schlagen.



Filterwechsel der Tonne

Der Filter einer Tonne wird immer dann gewechselt wenn er entweder zu dreckig geworden ist, oder Risse aufweist. Die Risse kann man gut erkennen, wenn man die Tonne komplett geleert hat und in die Tonne hineinschaut. Ist ein Riß im Filter vorhanden, kommt an dieser Stelle mehr Licht von außen durch, auch wenn der Riß noch nicht alle Schichten des Filters betrifft.

Filtergröße:

4,5 m lang (3 Schichten Filtermaterial pro Tonne)

55-60 cm breit (Der Filter muss breit genug sein, um alle Löcher der Tonne zu überdecken, aber immer noch genug Platz zwischen Filter – Füße – Griffe sein um den Filter gut ankleben zu können.)

Zuerst den alten Filter der Tonne entfernen und die Tonne gut auskehren / säubern.

Den neuen Filter zurechtschneiden, oben an der Tonne beginnen und den Filter dort mit einem Streifen Klebeband fixieren.

Anschließend den Filter um die Tonne wickeln. Es ist wichtig den Filter möglichst straff anzubringen, damit er gut hält und keine Falten wirft. Anschließend das Ende wieder mit einem Klebestreifen fixieren.

Die Ränder müssen nun auf beiden Seiten mit 2 bis 3 Runden Klebeband gut festgeklebt werden und mit dem Spannring nochmals fixiert werden.



Autoklavieren der Wasserflaschen

Die Glasflaschen sind grundsätzlich gut zu reinigen um jegliche Schmierreste zu entfernen. Außerdem sollten sie frei von jeglichen Klebeband und dessen Rückständen sein. Maximale Befüllmenge sollte die maximale Markierung an den Flaschen nicht überschreiten, um der Flüssigkeit genug Platz zu bieten sich beim Erhitzen ausdehnen zu können. Der Deckel wird nur lose auf die Flasche geschraubt, damit der Dampf, der in der Flasche entsteht, entweichen kann. Sonst droht Gefahr das die Flasche platzt.



Kappen nur lose auf die Flaschen schrauben

Maximale Füllhöhe

Wasserflaschen kann man auch im Versorgungszylinder autoklavieren. Das Problem dabei ist, das man einen Weg finden muss, den Filter der Tonne nach dem Autoklavieren ausreichend trocken zu bekommen. Dabei kann man die Flaschen in die Tonne in Käfigschalen stellen und muß das unterste Blech der Tonne mit viel saugfähigem Material auslegen. Außerdem sollte man einige Autoklavierprogramme ausprobieren um eines zu finden, welches den Filter gut trocknen lässt.



Flaschen mit Käfigschale in Autoklavierbeutel packen

Alternativ autoklavieren wir die Flaschen separat in Tüten verpackt. Anschließend werden diese mit einem ganz normalen Autoklavierprogramm für Flüssigkeiten autoklaviert. Dabei nicht vergessen, das die Referenzflasche im Autoklav ein größeres Volumen an Flüssigkeit enthalten muss, als die größte Flüssigkeitsmenge die zu autoklavieren ist! Zur Sicherheit ist es zu empfehlen die Flaschen zweimal zu autoklavieren.

Nach dem Autoklaviervorgang sind die Flaschen sofort fest zuzudrehen, ohne den Beutel dabei zu öffnen. Am Beutel müssen auch jegliche Löcher die entstanden sind zugeklebt werden! Die Flaschen sollten innerhalb einer Woche in den Isolator eingeschleust werden!



Den Beutel mit den Flaschen mit Klebeband verschließen (funktioniert am Besten, wenn man sich das Klebeband mit an den Beinen festklebt).



Dann den Rand des Klebebandes / Beutel einfach umfalten.

Einbringen der Wasserflaschen in den Isolator

Die Flaschen werden am Besten bei einem ganz normalen Einschleusvorgang in den Isolator mit eingebracht um zusätzliche Schleusvorgänge zu vermeiden. Es ist aber auch möglich, die Flaschen nur über den Port einzubringen.

Zuerst wird dabei der Port ausgesprüht um anschließend die Flaschen einzuspühen. Dazu werden die Beutel der Flaschen kurz vor dem Einsprühen aufgerissen und die Flaschen zuerst überprüft ob die Deckel gut verschlossen sind. Sind Deckel zu locker wird diese Flasche **nicht** in den Isolator eingebracht! Dann nimmt man sich die Flaschen einzeln heraus und sprüht diese ab. Dabei die Flasche auf den Kopf drehen, damit Peressigsäure in den Flaschenhals laufen kann und auch diese Stelle der Flasche gut desinfiziert wird.



Sind alle Flaschen im Port (maximal 9 1L Flaschen möglich), wird noch einmal über alle Deckel gesprüht und anschließend entweder die Schleuse der Tonne / für den anderen Isolator, oder die Portkappe eingessprüht und angebracht.

Die Luft in der Schleuse oder den Port mit Peressigsäure sättigen.

Einwirkzeit 40min.



Pflegehinweise

Damit man den Isolator und alles was dazugehört lange benutzen kann, sollte man folgende Pflegehinweise beachten:

1. Isolator:

- Den Isolator regelmäßig überprüfen (innen und außen) und mit mildem Seifenwasser reinigen
- Im Betrieb die Vorfilter der Zuluft (außen an der Lüfter-Einheit) und den Vorfilter der Abluft im Isolator selbst regelmäßig reinigen
- Nach dem Arbeiten im Isolator immer mit dem Besen kehren und auch mit einem Tuch durchwischen. Je sauberer der Isolator generell gehalten wird, umso eher können Fehlerquellen entdeckt werden.
- Die Handschuhe und Ärmel nach dem Arbeiten mit möglichst faltenfrei zurück in den Isolator stecken
- Reste von Peressigsäure versuchen immer zeitnah zu entfernen
- Abluftschläuche etc. regelmäßig reinigen soweit möglich
- Vor jeder neuen Sterilisation alle ersetzbaren Teile gut überprüfen und eventuell austauschen

2. Versorgungszyylinder – Tonne

- Filter auf Schwachstellen überprüfen / regelmäßig wechseln
- Nach jedem Benutzen gut säubern / auskehren
- Klebeband-Reste wenn möglich entfernen

3. Verbindungs-Schleusen / Bags (aus PVC)

- In regelmäßigen Abständen mit mildem Seifenwasser reinigen und gut trockenwischen
- Nach jedem Benutzen von Peressigsäure befreien / trocknen
- Handschuhe und Schweißnähte regelmäßig überprüfen

4. Andere Materialien

- Jegliches Material das verwendet werden soll, sollte möglichst wenig in Kontakt mit schmutzigem Material kommen
- Eventuell Vor-sterilisieren

Gesundheitszeugnisse / Überprüfen des Hygienezustandes

Nachdem die Tiere nun hoffentlich gut versorgt im Isolator untergebracht sind bleibt noch die Frage wie man sicher gehen kann, das die Tiere im Isolator auch den Hygienezustand haben, den man möchte.

Die Tiere sollten wie in jeder Haltung periodisch von einem unabhängigen Institut nach FELASA protokollen untersucht werden (Hygienemonitoring). Die Häufigkeit ist davon abhängig, wie oft ein Ein- und Ausschleusen bei dem fraglichen Isolator notwendig ist. Je seltener der Isolator geöffnet wird, je geringer das Risiko einer Kontamination.

Wenn man es schafft einen Zuchtisolator nur zwei mal im Monat öffnen zu müssen, reicht eine halbjährliche Untersuchung aus. Andernfalls ist eine vierteljährliche Untersuchung zu empfehlen.

Jeder Isolator steht bei dem Health Monitoring für sich und sollte auch als solche Einheit behandelt werden. Wird ein Isolator aus irgendeinem Grund aufgegeben und die Mäuse in einen anderen Isolator eingebracht, gilt das alte Gesundheitszeugnis nur noch bedingt. Jede neue Sterilisation eines Isolators setzt diesen wieder auf 0 zurück und die „Historie“ der Gesundheitszeugnisse beginnt von neuem. Darum versucht man auch eine Zucht in einem Isolator so viele Jahre wie möglich aufrecht zu erhalten.

Die Tiere die für das Hygiene Monitoring bestimmt sind sollten entweder speziell dafür gehaltene Sentinels sein, oder kommen direkt aus der Haltung / Zucht. Bei der Isolatorenhaltung sind Zuchttiere eher zu empfehlen, da erstens das Risiko zu hoch ist zusätzliche Tiere aus eventuell bekannter aber dennoch anderer Herkunft in den Isolator einzubringen und zweitens ist dies allein schon aus Platzgründen schwierig.

Hält man Keimfreie Mäuse möchte man sich nicht nur auf ein Gesundheitszeugnis verlassen das nur auf bestimmte (pathogene) Keime testet. Natürlich kann man bei den Firmen anfragen ein Zeugnis speziell für Keimfreie Tiere auszustellen. Dabei sollte eine generelle Mikrobiologie (Bakterien allgemein) und eine große Serologie (Viren) gemacht werden.

Aus eigener Erfahrung ist es zu empfehlen die Mäuse selbst bei jedem Schleusvorgang zu kontrollieren. Dazu empfiehlt es sich sich mit einem Mikrobiologen in Verbindung zu setzen um ein geeignetes Protokoll für die individuelle Haltung zu erarbeiten. Eine einfache Gramfärbung des Feces aus mehreren Käfigen hat sich mit der Zeit als sehr zuverlässigen Indikator herausgestellt. Dabei kann man Bakterien schon sehr frühzeitig entdecken, noch bevor man diese in einer Kultur hätte anreichern können. Dazu ist dies eine einfache und kostengünstige Kontrolle. Man sollte sich aber genug Zeit nehmen die Gramfärbungen auch ordnungsgemäß beurteilen zu können.

Peressigsäure Verdünnungstabelle

(Ecolab, oxonia active)

Total Volume	3%	
	H2O in ml	Peracetic acid - 17%) oxonia active in ml
20	17	3
40	33	7
60	50	10
80	66	14
100	83	17
120	99	21
140	116	24
160	133	27
180	149	31
200	166	34
220	182	38
240	199	41
260	215	45
280	232	48
300	249	51
320	265	55
340	282	58
360	298	62
380	315	65
400	331	69
420	348	72
440	365	75
460	381	79
480	398	82
500	414	86
1000	829	171

Materialliste

Um eine Isolatorhaltung aufzubauen hier eine Liste an Material, welches dazu nötig ist. Die Liste kann natürlich je nach Bedarf beliebig erweitert / gekürzt werden.

Die „Großen“ Dinge:

- Isolatoren, Größe und Form je nach Bedarf
- Gestell und Käfige mit Flaschen etc.
- Verbindung-schleusen (Isolator – Versorgungszylinder, Isolator – Isolator)
- Schleusen „Bag“ mit und ohne Spiralschlauch
- Schlauchklemmen und Gummis zum Anbringen der Schleusen
- Sprühpistole
- Kompressor
- Versorgungszylinder (Tonnen)
- Chargenkontrolle für den Autoklaviervorgang für jede Tonne (z.B. MelaPro)
- Hubwagen
- Zusätzlicher, autoklavierbarer Wagen der das Einschleusen und Transport der Tonnen ermöglicht
- Steighilfe, Hocker o.Ä. um am Isolator arbeiten zu können. Es kommt darauf an ob man einen Doppelstock Isolator hat oder nur einfache.
- Klemmen!! (siehe *Handschuhwechsel S.49*)
- HEPA Filter als Ersatz
- Filtermaterial für Tonnen
- Mylar-Folie zum Verschließen der Tonnen
- Gnotokäfige zum Ein- und Ausschleusen von Mäusen

Kleinere Dinge / Verbrauchsmaterial:

- Vollmaske geeignet für Peressigsäure
- PVC Klebeband 150mm breit und 500mm breit (autoklavierbar)
- Peressigsäure
- Glasflaschen (1l) für Wasser
- Handschuhe als Ersatz für den Isolator
- Baumwollhandschuhe / autoklavierbar
- Gummis als Ersatz für die Schleusen
- Baumwollbeutel für Einstreu
- Papiertüten groß und klein für Müll und Probennahmen
- Lange Pinzette (zum Mäusefangen)
- Unlackierte Bleistifte
- Lochzange für Ohrmarkierungen / Biopsie entnahme
- Nistmaterial (möglichst Staubfrei. Z.B. Sizzlenest)
- Feste Tücher (z.B. Wipall X60)
- Buntes festes Papier für Käfigkarten, Clips zum Befestigen
- Autoklavierbarer Besen
- Autoklavierbarer Teigschaber (zum Käfig auskratzen)