



(10) **DE 699 27 020 T3** 2012.04.19

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 084 080 B2**

(51) Int Cl.: **C02F 1/32** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 020.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/09800**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 92 1674.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/058454**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.05.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.11.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.03.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.08.2005**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **15.02.2012**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.04.2012**

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

78116 13.05.1998 US

(84) Benannte Vertragsanstalten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Calgon Carbon Corp., Pittsburgh, Pa., US

(72) Erfinder:

**BOLTON, James, R., Ayr. Ontario N0B 1E0, CA;
STEVENS, R., D., Bolton, CA; DUSSERT, Bertrand,
Pittsburgh, US**

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671, München, DE**

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR VERHINDERUNG DER VERMEHRUNG VON CRYPTOSPORIDIUM PARVUM MIT
ULTRAVIOLETTEM LICHT**

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Prävention der Replikation von *Cryptosporidium parvum* in Wasser und insbesondere ein Verfahren zur Prävention von Infektionen durch *Cryptosporidium*-Oocysten und ähnlichen Organismen in Wasser unter Verwendung von niedrigen Leveln von ultraviolettem Licht.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Es ist im allgemeinen wohl bekannt, daß es notwendig ist, xx Oocysten zu töten oder zu inaktivieren, so daß sie nicht infizieren. Dies ist insbesondere wichtig im Trinkwasser. Eines dieser Verfahren ist die Verwendung von ultraviolettem („UV“) Licht. Der Stand der Technik lehrt, daß eine UV-Dosis von mindestens 3.000 mJ/cm² erforderlich ist, um *Cryptosporidium parvum* (Lorenzo-Lorenzo et al., J. Parasitol. 1993, 79, 67–70) und *Giardia muris* (E. L. Jarol, „Effect of disinfectants an *Giardia* cysts“, CRC Critical Reviews in Environmental Control, 1988, 18, 1–28) zu inaktivieren. Snowball und Mitarbeiter (UK Patentanmeldung Nr. 9416287.2, 08 Nov., 1984; Wat. Res., 1995, 29, 2583–2586) entwickelten eine Vorrichtung, die zuerst *Cryptosporidium*-Oocysten herausfilterte, und dann setzten sie diese UV-Dosen von 350–400 mJ/cm² aus. Das Patent lehrt die Verwendung von Membranfiltern zum Einfangen von *Cryptosporidium*-Oocysten, welche dann mit einer Reihe bzw. Gruppe von Niederdruck-Hg-Lampen mit einer UV-Dosis von 350–400 mJ/cm² bestrahlt werden. Der Filter wird dann auf einen zweiten Filter zurückgespült, und die Bestrahlung wird wiederholt. Das Patent offenbart, daß die Behandlung die Organismen „tötet“.

[0003] M. J. Lorenzo-Lorenzo, M. E. Area-Mazea, I. Villacorta-Martinez de Maturana und D. Duran-Oreiro, „Effect of Ultraviolet Disinfection of Drinking Water an the Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts“, J. Parasitol. 1993, 79(1), 67–70. Das Schriftstück berichtet die Prävention einer Infektion in Mäusen nach der Bestrahlung mit mindestens 150 Minuten von UV aus einer (vermutlich) Niederdruck-Hg-Lampe. Obwohl das Schriftstück nicht klar ist, kann gefolgert werden, daß die angewendete UV-Dosis über 5.000 mJ/cm² war, um eine besser als 2 Log Reduktion der Infektiösität zu erhalten. Die Autoren beanspruchen, daß die Bestrahlung mit UV für 150 Minuten oder mehr die Infektiösität „eliminiert“, aber sie geben keinen anderen Mechanismus an als daß sie sagen „UV-Strahlung spaltet DNA durch das Verursachen der Bildung von Th[y]amindimeren, und hohe Level können zu Zelltod führen. Bei den von ihnen angewendeten UV-Dosen waren die beobachteten Effekte fast sicher durch Zelltod verursacht.“

[0004] In einem Schriftstück von A. Bushnell, W. Clark, J. Dunn and K. Salisbury, „Pulsed Light Sterilization of Products Packaged by Blow-Fill-Seal Techniques“, Pharm. Engin. 1997, Sept./Oct., 74–83, wird eine gepulste UV-Technik zum „Sterilisieren“ von Oberflächen, welche Bakterien, Pilze, Sporen, Viren, Protozoen und Oocysten enthalten, beschrieben. Es wird berichtet, daß die benötigten UV-Dosen über 1.000 mJ/cm² sind. Die Effektivität dieses Verfahrens wurde unter Verwendung von Mäuseinfektiösität getestet. Bei den berichteten UV-Dosen wird angenommen, daß die Effekte auf Zelltod beruhen.

[0005] In einem Schriftstück von R. LaFrenz, „High Intensity Pulsed UV for Drinking Water Treatment“, Proc. AWWA WQT Conference, Denver, CO, Nov., 1997, wird ein ähnliches Impulssystem beschrieben. Obwohl sehr wenige Details beschrieben werden, scheint es, daß ein Mäuseinfektiösitätsassay verwendet wurde und mit einer beanspruchten 100% „Inaktivierung“ von *Cryptosporidium* zu einem Level von 6 Logs bei Energieleveln von ungefähr 200 mJ/cm² und größer. Das Schriftstück beansprucht, daß das gepulste UV die „DNA-Reparaturmechanismen“ überwindet; allerdings sind die angewendeten UV-Dosen wesentlich größer als solche, die bei einer gleichbleibenden („steady state“) Mitteldruck-Hg-Lampe erforderlich sind.

[0006] Folglich liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum effektiven Behandeln von Wasser, so daß *Cryptosporidium*-Oocysten nicht infizieren können, bereitzustellen. Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren unter Verwendung von ultraviolettem Licht bereitzustellen, um zu erreichen, daß *Cryptosporidium*-Oocysten nicht wirksam sind zu infizieren. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren unter Verwendung von ultraviolettem Licht bereitzustellen, das kosteneffektiv in der Behandlung von Trinkwasser ist, um die Möglichkeit einer *Cryptosporidium*-Oocysten-Infektion zu eliminieren.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Es ist allgemein festgestellt worden, daß es nicht notwendig ist, Pathogene wie *Cryptosporidium parvum* oder *Giardia muris* mit ultraviolettem Licht zu „töten“ oder zu „inaktivieren“, um eine Infektion zu verhindern; man muß nur genügend ultraviolettes Licht anwenden, um die Organismen daran zu hindern, zu „replizieren“. Des Verfahren der vorliegenden Erfindung verhindert die Replikation (Zellmitose) durch das Quervernetzen der DNA, um eine Infektion zu verhindern. Die zum Verhindern der Replikation benötigten UV-Dosen sind Größenordnungen geringer als die zum „Töten“ oder „Inaktivieren“ der Oocysten benötigten. Dies bedeutet, daß die Kosten für die UV-Behandlung, um eine Infektion durch *Cryptosporidium*-Oocysten zu verhindern, wesentlich geringer sein werden.

[0008] Es hat sich herausgestellt, daß, wenn biologische Organismen ultraviolettem Licht (UV) im Bereich von 200–300 nm ausgesetzt sind, das UV durch DNA, RNA oder Proteine absorbiert werden kann. Absorption durch Proteine kann zum Auseinanderbrechen von Zellwänden und zum Tod des Organismus führen. Absorption durch DNA oder RNA (spezifisch durch Thyminbasen) ist bekannt, ein Quervernetzen der DNA- oder RNA-Doppelhelixstränge durch die Bildung von Thymindimeren zu verursachen. Wenn genügend dieser Quervernetzungen in der DNA erzeugt werden, kann sie sich nicht in zwei Stränge trennen, und somit kann die Zelle nicht in der Mitose replizieren. Zellen, die nicht replizieren können, können nicht infizieren. Die vorliegende Erfindung verwendet wesentlich geringere UV-Dosen, um den Zustand der verhinderten Replikation zu erreichen, sie sind viel geringer (in Größenordnungen) als die, die zum Verursachen von Oocysten-Zellzerstörung benötigt werden.

[0009] Die vorliegende Erfindung verwendet eine Breitband(200–300 nm)-Mitteldruck-UV-Lampe, um die Verhinderung bzw. Prävention zu erreichen. Mitteldruck-UV-Lampen liefern ein kontinuierliches ultraviolettes Spektrum. Mitteldruck-Quecksilberlampen enthalten einen Quecksilber-Dampfdruck von etwa 1.000 mm Hg, wenn sie unter Spannung stehen (Niedrigdruck-Quecksilberlampen enthalten einen Quecksilber-Dampfdruck von etwa 0,001- etwa 10 mm Hg, wenn sie unter Spannung stehen). A. M. Braun, M. T. Maurette und E. Oliveros; Photochemical Technology; S. 109–114; John Wiley & Sons; 1991. Die benötigte Dosis kann so niedrig wie 10 mJ/cm² sein. Dosen über 30 mJ/cm² stellen mehr als 4,5 Logs durch Mausinfektiösität gemessene Beseitigung bereit. Somit sind die Dosislevel wesentlich geringer als die zuvor verwendeten, dies resultiert in wesentlich geringeren Energieleveln, die benötigt werden, um die Ergebnisse zu erzielen. Folglich stellt das Verfahren einen wesentlichen Anstieg in der Kosteneffektivität der UV-Reduzierung von *Cryptosporidium*-Oocysteninfektion in Trinkwasser bereit. Weitere Vorteile werden nach Durchsicht der folgenden detaillierten Beschreibung einer derzeit bevorzugten Ausführungsform der Erfindung offensichtlich.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0010] [Fig. 1](#) ist eine Tabelle, die den Unterschied zwischen dem Infektiösitätsassay und den in vitro(Exzystation und Lebendfärbungen)-Assays zeigt und

[0011] [Fig. 2](#) ist eine Tabelle, welche die Korrelation zwischen Laborversuchen und Pilotstudien zeigt.

Derzeit bevorzugte Ausführungsformen

[0012] Pilotstudienaufgaben von *Cryptosporidium parvum* und *Giardia muris* wurden in einem 111 l (29,4 gal)-UV-Reaktor, der 6 × 1 kW Rayox-Mitteldruck-UV-Lampen horizontal montiert in einem Turmtypreaktor enthält, ausgeführt. Die Organismen wurden stromaufwärts von einem statischen Mixer vor dem Reaktor eingeführt und auf 1 Mikronfiltern nach dem Reaktor gesammelt. Die Gesamtflußrate während des Tests war etwa 215 gpm (814 l/min). Die Organismen wurden von dem Filter extrahiert und konzentriert. Vier der Cryptoproben wurden an Mäuse verfüttert. Ein Teil des Konzentrats wurde für in vitro Tests zurückbehalten. Die UV-Dosen wurden aus der durchschnittlichen Bestrahlung (bestimmt durch ein hochentwickeltes mathematisches Modell des Reaktors) mal der Verweildauer in dem Reaktor (etwa 8,3 s) errechnet. Diese Dosen wurden durch das Anschalten von einer oder zwei Lampen und bei niedriger oder hoher Energie variiert.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In vitro Assays

[0013] Zwei in vitro assays wurden verwendet: Lebendfärbungen und Exzystation. Die durchschnittlichen Kontrollverfahrens-Lebensfähigkeitswerte wurden durch den Lebendfarbstoff-Assay bestimmt, 71,7% zu sein. Der

Faktor, der für das Normalisieren dieser Lebensfähigkeitswerte auf 100% notwendig ist, wurde durch das Dividieren von 100 durch $71,7 = 1,39$ errechnet. Nach dem Bestrahlen der Oocysten mit verschiedenen UV-Dosen wurden ihre tatsächlichen Lebensfähigkeitswerte bestimmt (Tabelle 1) und dann durch das Multiplizieren jedes Lebensfähigkeitswertes mit dem berechneten Faktor (1,39) normalisiert. Ähnlich wurden *Cryptosporidium*- und *Giardia*-Verfahrenskontroll-Exzystationswerte auf 100% normalisiert, und ihr entsprechender Normalisierungsfaktor wurde verwendet, um die tatsächlichen Exzystationswerte für UV-bestrahlte Organismen anzupassen. Diese Resultate werden als Prozentsatz der Lebensfähigkeit für einen UV-Test, geteilt durch den Prozentsatz der Lebensfähigkeit für die Verfahrenskontrolle, errechnet. Durch das Durchführen des Vorstehenden ändern sich die Lebensfähigkeitsfaktoren (Prozent) für die in vitro Tests zu denen, die in der nachstehenden Tabelle gezeigt werden.

Lebensfähigkeitsfaktoren (Prozent) für In Vitro Tests

	Cryptosporidium parvum		Giardia muris
UV-Dosis (mJ/cm ²)	Lebendfärbungen	Exzystation	Exzystation
20	113 ± 36	145 ± 38	174 ± 14
69	110 ± 34	176 ± 38	103 ± 48
137	37 ± 17	83 ± 21	68 ± 32
152	13 ± 14	29 ± 31	31 ± 13
167	8 ± 7	33 ± 10	33 ± 8

[0014] Beachte, alle Werte über 100% sollten als 100% angesehen werden.

Log-Reduktionen für die *Cryptosporidium parvum*-Mausinfektiösitätstests

UV-Dosis (mJ/cm ²)	Exzystation
20	3,9
69	> 4,5
167	> 4,5

Detaillierte Analyse der Daten

[0015]

Tabelle 1. In Vitro-Tests der UV-Bestrahlung von *Cryptosporidium parvum* und *Giardia muris*-Lebensfähigkeit.

Testparameter	Cryptosporidium Parvum-Lebensfähigkeit (n = 3)			Giardia murdis-Lebensfähigkeit (n = 3)	
	UV-Dosis (mJ/cm ²)	Lebendfärbun- gen	Exzystation	UV-Dosis (m/cm ²)	Exzystation
Test-30/3/98					
Trip-Kontrolle 1		82,0 ± 4,0	81,4 ± 8,1		90 ± 7,1
Prozeß-Kon- trolle Nr. UV		71,7 ± 15,4 61,7 ± 4,9	29,7 ± 1,1 45 ± 7*		532 ± 21,5
Test-31/3/98					
Trip-Kontrolle 2		90,4,6 ± 1,2	79,8 ± 4,3		97,3 ± 2,5
UV-Test	167	4,9 ± 4,5	13,7 ± 3,1	167	19,9 ± 2,7
Test-01/04/98					

Trip-Kontrolle 3		88,7 ± 1,0	56 ± 9,8 89 ± 2,7*		100 ± 0
UV-Test	69	73,6 ± 4,1	72,7 ± 2,3	67	55 ± 13
Test-06/04/98					
Trip-Kontrolle 4		76,6 ± 4,4	80,4 ± 1,7		99 ± 1
UV-Test	152	8,5 ± 1,4	12,1 ± 1,5	152	23 ± 9,6
Test-07/04/98					
Prozeß-Kontrolle Nr. UV		45,3 ± 16,8	49,3 ± 4,0		96,7 ± 1,2
UV-Test	137	25 ± 8,9	34,3 ± 4,0	137	364 ± 9,1
Test-08/04/98					
Trip-Kontrolle 5		79,7 ± 5,1	77,3 ± 4,2		94,7 ± 3,1
UV-Test	20	75,3 ± 6,8	47 ± 7,8 72,7 ± 1*	21	92,7 ± 1,2

Tabelle 2. Effekte der UV-Bestrahlung auf *Cryptosporidium parvum* Oocysteninfektiösität

Testparameter	UV-Dosis (mJ/cm ²)	Cryptosporidium parvum-Infektiösität		
		Inokula 1	Inokula 2	Inokula 3
Trip-Kontrolle 1				
Verabreichte Inokula pro Maus		25	75	150
% infiziert (#/Gesamt)		5,3% (2/28)	35% (14/40)	62,5% (15/23)
Verfahrenskontrolle 1				
Verabreichte Inokula pro Maus		50	500	5.000
% infiziert (#/Gesamt)		44% (11/15)	100% (20/20)	100% (23/23)
UV-Test 31/03/98				
Verabreichte Inokula pro Maus		1.000	10.000	100.000
% infiziert (#/Gesamt)	191	0% (0/24)	0% (0/12)	0% (0/24)
UV-Test 01/04/98				
Verabreichte Inokula pro Maus		1.000	10.000	100.000
% infiziert (#/Gesamt)	79	0% (0/22)	0% (0/26)	0% (0/25)
UV-Test 08/04/98				
Verabreichte Inokula pro Maus		1.000	10.000	100.000
% infiziert (#/Gesamt)	23	0% (0/18)	0% (0/18)	4,5% (1/22)

[0016] Während eine vorliegende Ausführungsform der Erfindung in Einzelheiten beschrieben wurde, kann die Erfindung auch anders, innerhalb des Umfangs der angefügten Ansprüche, ausgeführt werden.

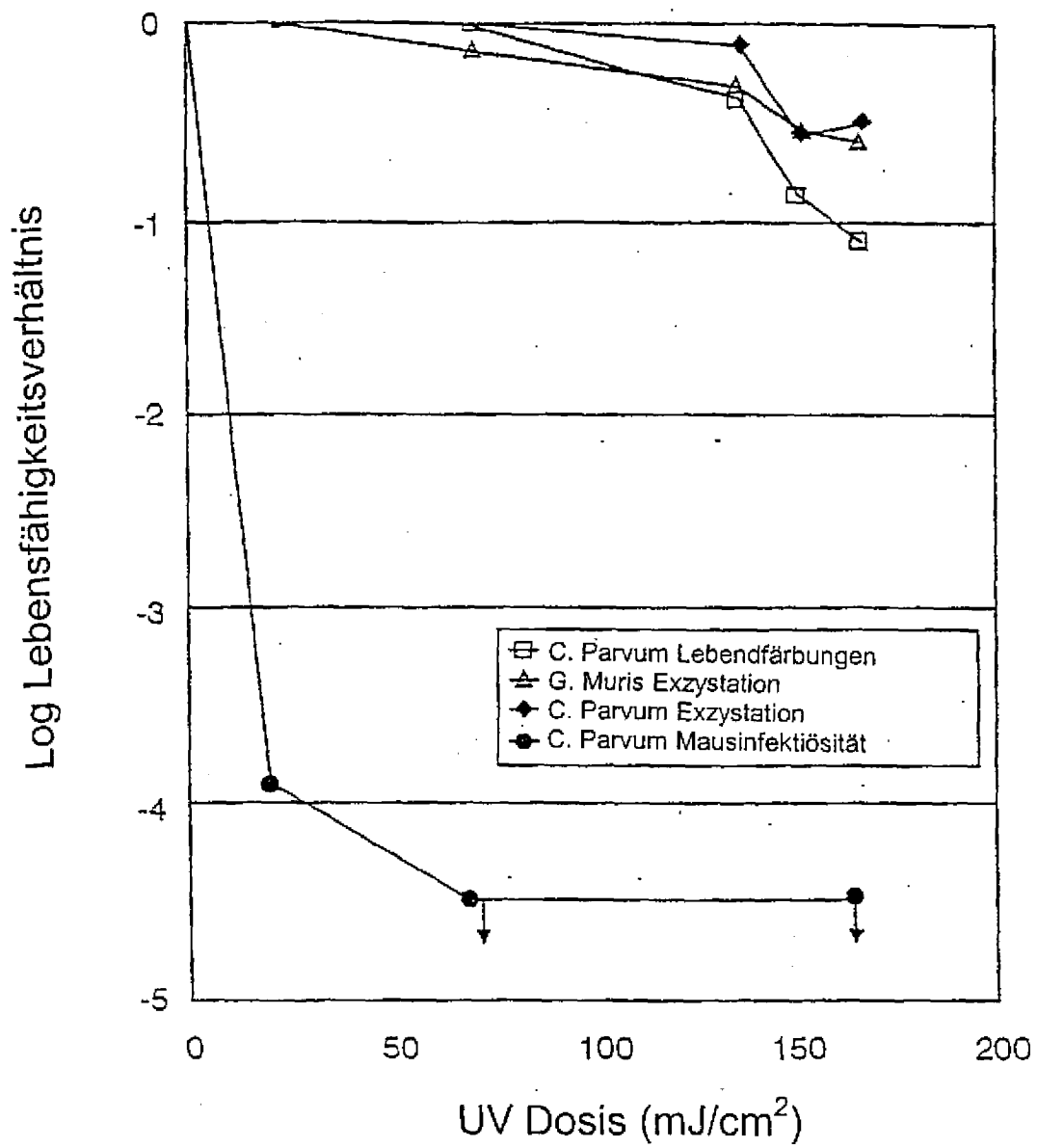
Patentansprüche

1. Verwendung eines zeitlich kontinuierlichen Breitbands von ultraviolettem Licht einer Mitteldruck-UV-Quecksilberlampe in Dosen von 10 mJ/cm^2 bis 175 mJ/cm^2 und mit einem Wellenlängenbereich von 200 bis 300 nm zum Behandeln von Trinkwasser zur Eliminierung des Potentials für Cryptosporidium-Oozysten-Infektion.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Dosis von 20 mJ/cm^2 bis 30 mJ/cm^2 ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

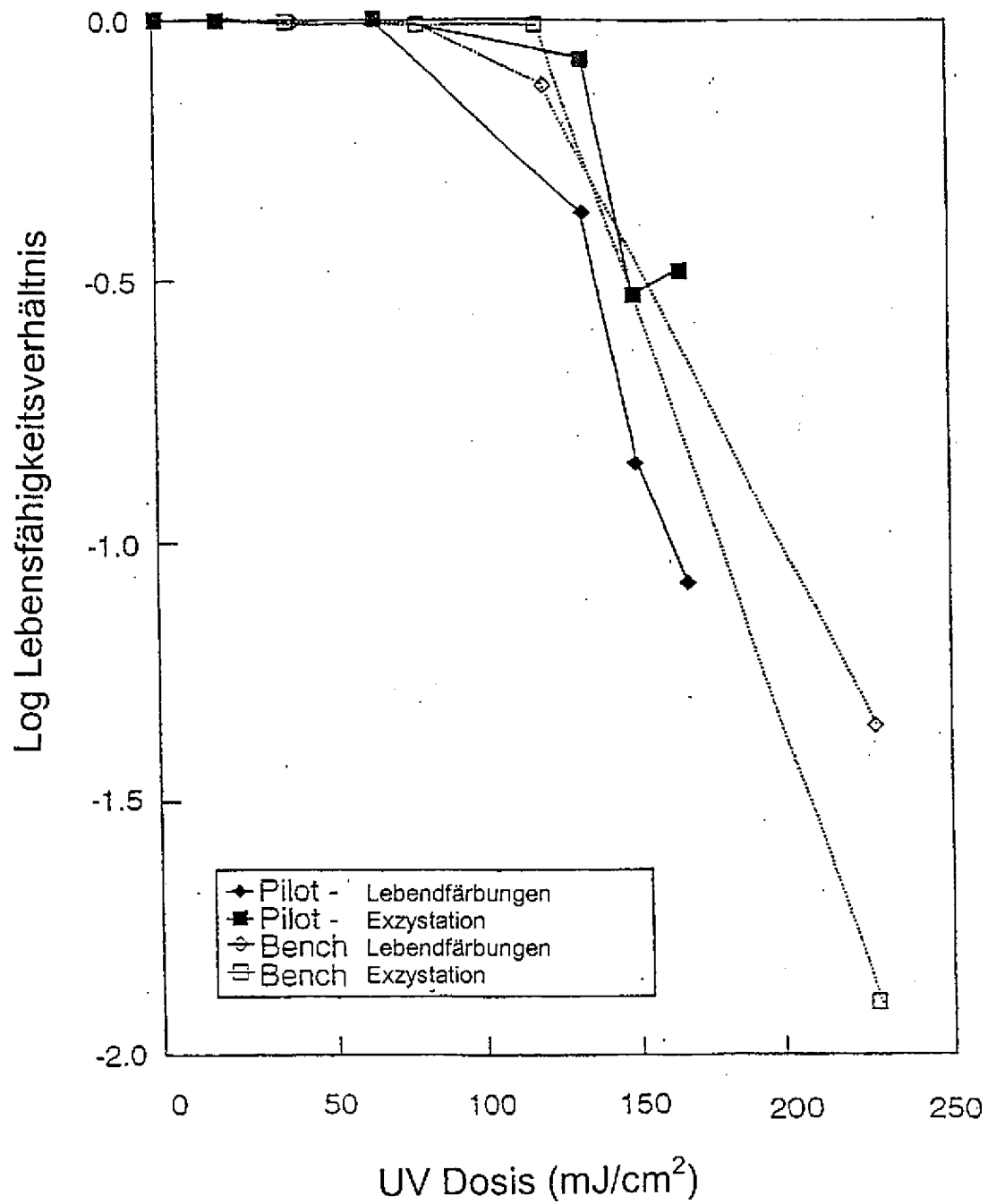
Anhängende Zeichnungen

Log Lebensfähigkeitsverhältnis vs. UV Dosis



Figur 1

Log Lebensfähigkeitsverhältnis vs. UV Dosis



Figur 2