(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 380 759**

(51) Int. CI.:

A61L 2/10 (2006.01)
A61L 2/28 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
G01J 1/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04715307 .7**
(96) Fecha de presentación: **27.02.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1596888**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

(54) Título: **Método para la inactivación certificable de patógenos por irradiación en un fluido biológico**

(30) Prioridad:
27.02.2003 US 449852 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2012

(73) Titular/es:
BAXTER INTERNATIONAL INC.
ONE BAXTER PARKWAY
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US
BAXTER HEALTHCARE S.A.

(72) Inventor/es:
ANDERLE, Heinz;
MATTHIESSEN, Peter;
SCHWARZ, Hans-Peter;
TURECEK, Peter;
KREIL, Thomas y
BOGGS, Daniel, R.

(74) Agente/Representante:
Aznárez Urbieta, Pablo

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la inactivación certificable de patógenos por irradiación en un fluido biológico.

La presente invención se refiere a un método para la inactivación fotoquímica de patógenos mediante irradiación por lotes, la cual, antes de la presente invención, se consideraba demasiado compleja e impracticable. En particular, la invención permite ventajosamente al experto en la técnica determinar una dosis de luz eficaz para la inactivación fotoquímica de patógenos.

El tratamiento de la sangre, de células sanguíneas, plasma, suero, fracciones de plasma y de otros fluidos biológicos y soluciones proteínicas mediante irradiación para inactivar virus patógenos, en particular virus de ADN monocatenario sin envoltura pequeños, se está investigando ampliamente. Ejemplos de tratamientos por irradiación actualmente en estudio incluyen con luz ultravioleta de onda corta, luz ultravioleta de onda larga, luz visible con compuestos fotosensibilizantes y destellos de luz de alta intensidad de alto espectro.

En la década los '30 se expusieron pequeños volúmenes de sangre total autóloga a la radiación UV de una lámpara de vapor de mercurio de presión media para inactivar los organismos infecciosos. Con la reinfusión de la sangre irradiada se observaba un aparente efecto inmunoestimulatorio.

Entre 1946 y 1955 se investigó en Estados Unidos el tratamiento de pooles de plasma con luz UV-C para inactivar agentes infecciosos. Los primeros resultados alentadores condujeron a un tratamiento con UV-C a 253,7 nm como el requisito mínimo para un plasma humano terapéuticamente aplicable (Murray y col., 1955). Con la introducción de la espectrofotometría electrónica se comprobó que el plasma y las soluciones de cultivos virales que contenían plasma o suero eran ópticamente opacos a la luz de 253,7 nm, con una profundidad de penetración inferior a 1 mm (Suhrmann y Kollath, 1928). Por esta razón se construyeron diversos irradiadores de película delgada para esterilizar volúmenes grandes de plasma o para atenuar las vacunas. Ejemplos de ellos son el irradiador de Habel-Sockrider (Habel y Sockrider, 1947), el dispositivo generador de películas centrífugo de Milzer-Oppenheimer-Levison con lámparas refrigeradas por agua (Milzer y col., 1945; Benesi 1956; Taylor y col., 1957a; Taylor y col., 1957b; McLean y Taylor 1958; Oppenheimer y col., 1959) y el irradiador de Dill (Murray y col., 1955) (Dill Instruments Co.), que es el único diseño que sigue estando disponible en el mercado.

A pesar de los avances citados, la hepatitis sérica persistía (Neefe 1949; Barnett y col., 1950; James y col., 1950). Ciertos estudios exhaustivos determinaron que las dosis UV requeridas para inactivar el virus de la hepatitis B reducían seriamente la actividad biológica de las proteínas palsmáticas, abandonándose este método a finales de la década de los '50 (Murray y col., 1955; Kallenbach y col., 1989). En 1958 se introdujo una administración combinada mejorada de beta-propiolactona e irradiación subsiguiente con UV-C. Este proceso permitía inactivar los virus de la hepatitis sérica, pero dejaba intactas al menos las actividades biológicas del complejo de protrombina, las inmunoglobulinas y la albúmina (Smolens y Stokes, 1954; Hartman y col., 1955; Prince y col., 1983). Desde 1968 en adelante, este proceso fue el empleado en los fraccionadores de plasma comerciales para producir concentrados séricos combinados de albúmina-inmunoglobulina y a partir de 1976 para producir concentrados de complejo de protrombina empleando un irradiador UV de película delgada Dill (Stephan y col., 1981, Stephan, 1982a, 1982b). Los estudios con chimpancés y posteriormente en cultivos celulares demostraron una inactivación efectiva de la hepatitis A, B y C (Heinrich y col., 1982, 1987, Frösner y col., 1983, Prince y col., 1983, 1984, Stephan, 1989), mientras que el VIH demostró ser más resistente a la luz UV-C (Dichtelmüller y col., 1987, 1993). La aparente insuficiencia del tratamiento con beta-propiolactona /UV-C para inactivar el virus del SIDA, el VIH, en un concentrado de complejo de protrombina (Kleim y col., 1990, Kupfer y col., 1995) y la disponibilidad de otros métodos de inactivación física y fisicoquímica, como el tratamiento térmico o con detergentes, condujo al abandono del método beta-propiolactona/UV-C en 1990 (Pustoslemsek y col., 1993).

En la década de los '80, Dichtelmüller y col. (1987) y Kallenbach y col. (1989) confirmaron que la irradiación UV-C sola requeriría dosis excesivamente altas para inactivar el VIH en plasma sanguíneo y que la irradiación UV-B era ineficaz para la inactivación de patógenos (Prodouz y col., 1987).

Por otro lado, los virus de ADN sin envoltura pequeños que no son lo suficientemente sensibles a los métodos de inactivación física y fisicoquímica se inactivan de forma eficaz con luz UV-C. Un ejemplo es la familia de los parvovirus, por ejemplo el Virus Kilham de la rata (Proctor y col., 1972), el Virus Minute Murino (MMV) (Harris y col., 1974, Rommelaere y col., 1981) y el Parvovirus Porcino (PPV) (Brown, 1981). Por ejemplo, la Patente US 6.190.608 describe que una fluencia UV-C a 253,7 nm (distancia entre la energía radiante incidente en la muestra dividida entre su área, expresada como erg/mm^2, mJ/cm^2 o J/m^2) de 12 mJ/cm^2 inactivaba el MMV en una solución que contenía 2 mg de inmunoglobulinas/ml.

Además, una fluencia de 9-25 mJ/cm^2 es suficiente para inactivar parvovirus en una solución concentrada de fibrinógeno (WO 96/02571) o en una solución diluida de factores de coagulación purificados (publ. de patente JP 196531/1995). Se ha informado de que una dosis UV más alta, de 100 mJ/cm^2, es la mínima necesario para el plasma (Chin y col., 1995), el fibrinógeno (Marx y col., 1996), la albúmina, las inmunoglobulinas (Hart y col., 1993; Chin y col., 1997) y el suero animal (Kurth y col., 1999), aunque fluencias tan bajas como de 50 mJ/cm^2 inactivan de forma efectiva los parvovirus (Chin y col., 1997).

Otros ejemplos de tratamiento de muestras biológicas, como plasma y glóbulos rojos, incluyen la generación de oxígeno singlete mediante un fotosensibilizador y luz o mediante efectos de fotólisis *flash* de alta intensidad, destellos de luz de amplio espectro en un tubo de xenón. Los avances técnicos en la medida electrónica de la luz y la disponibilidad de radiómetros digitales facilitó la determinación de la irradiancia de una fuente luminosa, de modo que ya los datos de fluencia se determinan y revelan de forma rutinaria.

Las proteínas plasmáticas han demostrado una alta sensibilidad a la irradiación UV o a la irradiación fotosensibilizada. La alteración del plasma y de las proteínas plasmáticas irradiados con UV-C condujo a una prolongación del tiempo de coagulación (Cutler y col., 1950; Cutler y col., 1955), a un cambio de la movilidad electroforética (Hellbrügge y Marx, 1952; Larin, 1958), a una agregación (Engelhard y Eikenberg, 1955), a una alteración de las propiedades de sedimentación en ultracentrifugación (Claesson, 1956) y a una reducción del título de anticuerpos (Battisto y col., 1953; Kleczowski, 1954). Por ejemplo, el fibrinógeno tratado con UV-C sufre una disminución de la elasticidad del coágulo (Di Benedetto y col., 1963a, 1963b, 1963c) y la coagulación se retrasa a > 100 mJ/cm^2 (Marx y col., 1996); la actividad del factor VIII se reduce en plasma tratado con UV-C (Kallenbach y col., 1989; Chin y col., 1995); el tiempo de coagulación del fibrinógeno aumenta notablemente y la actividad del factor von Willenbrand y del factor VIII disminuye ligeramente en plasma recién congelado tratado con azul de metileno/luz (Aznar y col., 1999).

Para reducir al mínimo el efecto nocivo de la ionización y la radiación con UV-C en proteínas, se han utilizado agentes de extinción de las especies radicales de oxígeno, en particular el flavonoide rutina (Erdmann, 1956, WO 948210), ácido ascórbico (Erdmann, 1956) y creatinina (JP 11286453-A), así como un aditivo de absorción de UV-C. Sin embargo, aunque estos aditivos complementan una absorbancia adicional a la longitud de onda utilizada, en realidad a los patógenos llega muy poca energía UV-C. No obstante, aplicar un exceso de energía deteriora fácilmente las proteínas y, por ello, es necesario no superar la dosis UV o de luz visible necesaria para una inactivación suficiente de los patógenos y calcular o determinar esta dosis con la mayor precisión posible.

Otra posibilidad para proteger als proteínas frente al oxígeno singlete, el cual es generado a partir del oxígeno atmosférico disuelto por sustancias fotoexcitadas tales como derivados de triptófano presentes en solución, consiste en retirar el oxígeno disuelto de la solución antes de la radiación y sustituir éste por una atmósfera de gas inerte, por ejemplo mediante por de nitrógeno, durante la irradiación (Henzler y Kaiser, 1998).

En relación con lo indicado, se utilizan radiómetros y espectrorradiómetros electrónicos para medir la energía radiante de una fuente luminosa (J/m^2, mJ/cm^2) y la radiancia (W/m^2, mW/cm^2) o la energía de luz incidente o energía radiante en términos de potencia e irradiancia. Habitualmente, tales sensores radiométricos están hechos de materiales fotovoltaicos o fotoeléctricos, tales como células fotoeléctricas de semiconductores o fotodiodos, opcionalmente revestidos con una capa de fósforo dopada con luminiscencia para convertir la radiación ultravioleta en radiación visible (Latarjet y col., 1953). Una de las principales aplicaciones de los sensores radiométricos es el control de las fuentes luminosas. Los sensores radiométricos se utilizan de forma generalizada en la desinfección de aguas y en la fototerapia. La respuesta espacial de estos sensores es crítica para determinar de forma precisa de la potencia radiante, por ejemplo en cabinas de terapia con UV-A y UV-B (Pye y Martin, 2000, Martin y Pye, 2000). Para aplicar la dosis de luz exacta, estos dispositivos han de ser certificados y calibrados por radiometría (Taylor y col., 2002), pero los problemas derivados de la disminución de la intensidad por el envejecimiento de la lámpara sólo se han logrado resolver recientemente mediante el uso de una dosis suma diana radiométrica que ha de ser alcanzada (Allen y Diffey, 2002). Una propuesta similar para compensar las variaciones de la intensidad de la lámpara en los experimentos de irradiación de proteínas consistió en el uso de un monitor de lámpara radiométrico con un contador de integración (Rideal y Roberts, 1951).

Los sensores electrónicos montados al final de la trayectoria del haz luminoso (Taylor y col., 1941) sólo se pueden utilizar de forma limitada en la irradiación de fluidos biológicos absorbentes y el uso de las medidas o las señales de los sensores radiométricos para determinar o calcular la fluencia (dosis) o la tasa de fluencia (tasa de dosis) en un reactor fotoquímico o de fotoinactivación de patógenos está limitado por las leyes de la óptica. Una fuente puntual, como una bombilla, obedece a una ley inversamente proporcional al cuadrado de la distancia en todas las direcciones, mientras que esto no ocurre en caso de una fuente tubular, tal como un fluorescente. En teoría, sólo sería posible calcular la distribución de energía luminosa en un objetivo irradiado cuando se conocieran ciertas propiedades específicas: propiedades de reflexión y dispersión de las superficies; propiedades refractivas de los materiales; propiedades de absorción de los medios atravesados e irradiados. Sin embargo, sólo se han establecido modelos para sistemas muy simples, tales como células tubulares o el fotorreactor elíptico (Alfano y col., 1986a, 1986b).

La actinometría química mide el efecto de la luz en una mezcla reactiva fotoquímica (Kuhn y col., 1989; Favaro, 1998). En general, los actinómetros fotoquímicos acreditados con límite cuántico conocido y dependientes de la temperatura superan a los dispositivos electrónicos en cuanto a reproducibilidad y estabilidad. Los productos de reacción fotoquímica se deberían medir en línea del modo más conveniente, por ejemplo mediante espectrofotometría o con sensores químicos (Gauglitz, 1983). Por consiguiente, la propuesta fotoquímica ha sido generalmente aceptada para determinar tanto de la tasa de fluencia como la potencia radiante.

Una propuesta preferente se basa en la opacidad total de la solución actinométrica a la longitud de onda medida, de modo que la reacción fotoquímica se produce únicamente de forma muy superficial (Kuhn y col., 1989; Favaro, 1998). Por ello, son preferibles concentraciones de reactivo suficientemente altas.

Los actinómetros clásicos para la medida UV-C son el actinómetro de oxalato de uranilo (Bowen, 1949, Kuhn y col., 1989) y el actinómetro de ferrioxalato, pero el uso del primero está limitado por la radiotoxicidad del uranio y el del segundo por la sensibilidad a la luz UV-B, UV-A y visible (Kirk y Namasivayam, 1983). Los aductos de hidrogenosulfito o de cianuro de hidrógeno de tintes trifenilmetano también son bien conocidos como actinómetros sensibles a la luz UV-C. Por ejemplo, el leucocianuro verde malaquita incoloro disuelto en etanol no tiene sensibilidad alguna a la luz UV de onda larga o luz visible, pero el fotoproducto verde absorbe adicionalmente en el rango de luz UV-C (Calvert y Rechen, 1952, Fisher y col., 1967). El azobenceno (Actinochrome 2R 245/440) en metanol permite reutilizar la solución actinométrica (Gauglitz y Hubing, 1981, 1984, 1985), al igual que el endoperóxido de heterocoerdiantrona (Actinochrome 1R 248/334) (Brauer y Schmidt, 1983). A pesar de la elegancia de estos compuestos orgánicos complejos disueltos en disolventes orgánicos, se ha postulado que las sustancias y soluciones actinométricas no deberían ser tóxicas ni peligrosas.

Inmediatamente después de que aparecieran diversas lámparas ultravioletas a principios del siglo XX, se utilizaron soluciones ácidas de yoduro como actinómetro químico (Bering y Meyer, 1912). El bajo límite cuántico, de 0,05, condujo al uso de óxido nitroso (N_2O) como atrapador de electrones (Daiton y Sills, 1960, Rahn 1993). Una propuesta más reciente de actinometría UV-C opaca es la fotodescomposición de yoduro estabilizada por yodato (Rahn, 1997, Rahn y col., 1999, 2003). El triyoduro formado mediante fotólisis del yoduro a 253,7 nm se determina por espectrofotometría a 352 nm o a longitudes de onda mayores (375 nm, 400 nm). El sistema tiene la ventaja de no ser sensible a longitudes de onda superiores a 300 nm.

También se ha propuesto el uso de soluciones actinométricas para sustituir los sensores UV por sondas de flujo o estáticas que contienen la solución actinométrica y que se insertan en el reactor de irradiación. La solución actinométrica concentrada, por ejemplo el actinómetro de yoduro/yodato arriba mencionado (Patente US 6.596.542) o una solución de uridina (Schultz y col., 2001) se bombea a través de un tubo transparente a UV que recibe la luz UV desde una lámpara o se introduce en una célula con una ventana transparente situada frente a la lámpara UV a la que se ha de exponer durante un tiempo determinado y después se miden los fotoproductos en un espectrofotómetro. Sin embargo, estos sensores sólo miden la fracción de radiación que incide sobre ellos, pero no la fluencia media (dosis de luz) efectiva sobre el fluido a irradiar mientras se encuentra dentro del reactor de irradiación.

En apenas ciertos casos la actinometría química ha sido el método elegido para determinar la cantidad total de fotones absorbidos o la distribución efectiva de la dosis de luz en reactores fotoquímicos y células de fotólisis *flash*. En la fase inicial de la fotoquímica de proteínas en la década de los '50, los lotes de células agitados se utilizaban más frecuentemente en experimentos de desnaturalización de proteínas que en experimentos de inactivación viral (Rideal y Roberts, 1951, Claesson, 1956, Kleczkowski y Gold, 1962) y la actinometría de oxalato de uranilo se empleaba como método estándar para determinar la totalidad de cuantos incidentes. Heidt y Boyles (1951) estudiaron el efecto de la temperatura y la corriente en la intensidad UV-C de una lámpara de vapor de mercurio de baja presión en un fotorreactor por lotes de 12 ml utilizando el actinómetro de oxalato de uranilo. Engelhard y Eikenberg (1955) construyeron una célula de recirculación por lotes de 50 ml para experimentos de desnaturalización de proteínas y determinaron los fotones UV absorbidos por un actinómetro de ácido cloroacético. Taylor y col. (1957) y Oppenheimer y col. (1959) describieron la validación del irradiador Centrifilmer mediante dos ensayos de radiometría fuera de línea para lámparas antes de utilizarlo con una célula fotoeléctrica de tantalio electrónica y actinometría de adaptación de absorbancia, basada en cálculos de límite cuántico y no directamente en la calibración, con oxalato de uranilo. Aparentemente, con esta propuesta de validación no se obtuvieron resultados definitivos referentes a la dosis efectiva, tal como se informó en relación con el tratamiento experimental de clara de huevo líquida en el irradiador Centrifilmer para la inactivación por UV-C de *Salmonella spp*. (Ijichi y col., 1964), mientras que al menos se podía determinar la potencia radiante superficial usando dosimetrías con papel radiocrómico (Launer y Hammerle, 1964). Alfano y col. (1986a, 1986b) intentaron confirmar los cálculos para modelos en reactores fotoquímicos por actinometría química. Yokota y Suzuki (1995) ensayaron un fotorreactor de pozo sumergido configurado con múltiples lámparas mediante actionometría con ferrioxalato estándar. Recientemente, Vincze y col. (1999) han observado que un procedimiento de verificación experimental de este tipo todavía no es una norma común. Von Sonntag (1999) describió experimentos de fotólisis *flash* por láser donde una profundidad de penetración limitada de la luz incidente tenía como resultado una distribución espacial irregular en los productos de reacción. No obstante, se utilizaron cálculos de modelos para una célula de fotólisis rectangular simple y para evitar los procedimientos actinométricos de adaptación de la absorción.

La desinfección del agua potable mediante luz UV-C (Gelzhäuser, 1985) ha requerido la certificación actinométrica de los iluminadores de flujo para asegurar una esterilización completa. En general, el agua potable presenta una absorción UV-C muy baja, siempre que no haya trazas de impurezas tales como Fe(III) o ácidos húmicos. Por ello, se han desarrollado actinómetros químicos basados en la descomposición de peróxido de hidrógeno (Kryschi y col., 1988) o peroxodisulfato de potasio sensibilizado con terc-butanol (Mark y col., 1990). Otro actinómetro sensible a la luz UV-C se basa en la hidroxilación inducida por UV de benzoato en solución alcalina para obtener dihidroxibenzoato fluorescente (Moroson y Gregoriades, 1964).

Se ha descrito el uso de un tinte de trifenilmetano soluble en agua (4,4'4''-tris-di-β-hidroxietilaminotrifenil-acetonitrilo) como sustancia actinométrica a añadir para la "esterilización en frío" de patógenos en zumos de frutas, jugos y savias vegetales mediante irradiación de flujo con UV-C (Koutchma y Adhikari, 2002, Adhikari y col., 2002). Existen equipos comerciales para este proceso, por ejemplo los irradiadores de película delgada "Cidersure" o "Sap Steady" fabricados por FPE Inc. de Macedon, NY, o el irradiador de tubo espiral "Light Processed System" fabricado por Salcor Inc., Fallbrook, CA. Los zumos y jugos de frutas exprimidas muestran una alta turbidez de partículas en suspensión y una alta absorción UV-C para los compuestos fenólicos disueltos y ácido ascórbico y, además, una viscosidad similar a la de las soluciones proteicas. El zumo de manzana clarificado tiene un coeficiente de absorción de 9/cm a 253,7 nm. La sustancia actinométrica se añade al jugo altamente absorbente y se irradia en un aparato de haz colimado, tal como se utiliza para determinar la cinética de inactivación absoluta por UV de microorganismos en suspensión no absorbente (Bolton y Linden, 2003). La absorbancia del fotoproducto actinométrico a 600 nm aumenta, pero en realidad la sustancia actinométrica añadida sólo recibirá la fracción de cuantos luminosos correspondiente a su fracción de absorbancia con respecto a la absorbancia total. La dosis efectiva se calcula después a partir de la destrucción del tinte actinométrico añadido. Como se puede deducir de una "dosis absorbida" de 190 mJ/cm^2 que inactiva no más de $3log_{10}$ unidades formadoras de colonias (ufc) de *E. coli* K12/ml en zumo de manzana en una placa Petri, la propia adición de una sustancia actinométrica a la muestra suministra obviamente resultados falsos con respecto a la dosis efectiva. En una suspensión no absorbente, $5log_{10}$ ufc/ml de *E. coli* se inactivan a -10 mJ/cm_2 (Wright y Sakamoto, 1999). Sin embargo, la dosis efectiva en solución ha de ser igual a la dosis efectiva en el microorganismo. Por consiguiente, la adición propuesta de una sustancia actinométrica a un medio ya absorbente no permite realizar una medida exacta de la dosis efectiva.

Un método actinométrico directo para asegurar la aplicación de la cantidad correcta de luz UV en el tratamiento virucida de flujo con UV-C de las soluciones proteicas se basa en el aumento de absorbancia UV-B inducida por UV-C (WO 03/007998). Se dice que este aumento de la absorbancia está en correlación con la inactivación del bacteriófago Phi-X 174, que se utiliza como indicador de dosis biológica. En base a los datos obtenidos se puede realizar una calibración inversa del aumento de la absorbancia con respecto a la reducción del título de bacteriófago correspondiente, e incluso a la dosis equivalente de reducción (RED), si se ha establecido un gráfico de calibración utilizando la reducción del título dependiente de la dosis del bacteriófago Phi-X 174. Sin embargo, la dosis equivalente de reducción (RED), que es el parámetro estándar determinado en la desinfección de agua por UV-C, no es igual que la dosis media efectiva en el fluido. La dosis equivalente de reducción (RED) expresa en realidad una distribución de dosis que depende de la eficiencia de la mezcla. Debido a la reducción logarítmica decimal del título del bacteriófago, las fracciones volumétricas poco irradiadas contribuyen más al título de bacteriófago residual medio que a la magnitud actinométrica de la dosis efectiva media, que normalmente muestra un cambio dependiente de la concentración idealmente lineal en base a los fotones de luz convertidos.

La dosimetría biológica utilizando un microorganismo fotoinactivable fue el primer método para determinar la dosis aplicada en la irradiación de plasma (Oliphant y Hollaender, 1946), aunque no se dieron detalles sobre la dosimetría con el uso de *Aerobacter aerogenes* (nombre obsoleto de *Klebsiella pneumoniae*). Durante el uso de luz UV-C para inactivar el virus de la hepatitis sérica, se utilizó esta cepa bacteriana para validar los irradiadores de película delgada (McCall y col., 1957). Además, los bacteriófagos de ADN monocatenario de la familia *microviridae*, como S13 (Latarjet y Wahl, 1945) y Phi-X (phi chi) 174 (Setlow y Boyce, 1960) dan como resultado una disminución lineal del título a una dosis creciente de irradiación UV. Se ha desarrollado la biodosimetría basada en la inactivación de bacteriófagos (por ejemplo Phi-X 174 (Battigelli y col., 1993) o del bacteriófago de ARN monocatenario MS2 (Havelaar y col., 1991)) o en la inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* para testar los desinfectadores de flujo de agua por ultravioleta (Sommer y col., 2001). El coeficiente de absorción del agua se puede ajustar con tiosulfato de sodio disuelto de forma que éste reduzca las transmisiones UV (Cabaj y col., 1996). No obstante, para este método sigue siendo necesario un radiómetro electrónico al final de la trayectoria del haz luminoso y una mezcla de flujo eficiente para una distribución estrecha de dosis (Cabaj y Sommer, 2000) y el tiempo de incubación para el cultivo de esporas no permite una certificación rápida.

En la certificación de irradiadores de flujo para la irradiación ultravioleta en la "esterilización en frío" combinada con beta-propiolactona y ultravioleta de proteínas plasmáticas también se han empleado bacteriófagos (Dichtelmüller y Stephan, 1988). Sin embargo, estos procesos están limitados por fracciones de flujo rápido con dosis menores y potencialmente insuficientes (Qualls y Johnson, 1983).

Sólo aquellas capas de líquido muy delgadas en cuanto a la absorción de luz no requieren una corrección de la tasa de fluencia para la autoabsorción. En otras circunstancias es necesario calcular la disminución de la fluencia con la distancia (Morowitz 1950). Los efectos de la absorción de luz en las suspensiones virales referidos a la cinética de inactivación UV-C se investigaron en experimentos pioneros en células de cuarzo de 1,5 cm de diámetro con iluminación lateral (Taylor y col., 1941). La célula se agitaba lentamente y se observaba una desviación de la cinética de inactivación (lineal a una concentración de 10 µg virus/ml) para concentraciones de 20 µg/ml y 200 µg/ml. Utilizando placas Petri agitadas con iluminación superior se demostró que se vitaba la protección de los virus en las capas estáticas más profundas, donde la luz no penetraba con su intensidad inicial, si la suspensión viral se agitaba, de modo que la cinética de inactivación viral se mantenía lineal (Budowsky y col., 1981).

Los parámetros de los últimos diseños de irradiadores de sangre total han sido certificados por Temovoy y col. (1988). Para comparar la eficiencia de las células de película delgada y de los dispositivos capilares se eligió la

actinometría con sales de diazonio solubles en agua. El diámetro interior del aparato descrito no era superior a 3 mm y estaba construido para exponer la máxima superficie interior a la luz UV. Tanto las altas concentraciones de proteína como los componentes celulares absorben la luz incidente en superficie y los perfiles de flujo laminar en las células o cilindros hacen que la distribución de la dosis sea más irregular, exponiendo las capas exteriores de flujo lento a una radiación UV más alta en comparación con los volúmenes interiores de flujo más rápido. Por ello, estos dispositivos son inadecuados en el contexto de la inactivación de patógenos en sustancias biológicas.

La mayor parte de los dispositivos de irradiación de plasma sanguíneo se basan en los principios de película delgada, lo que limita la capacidad de procesamiento de las muestras. No obstante, se han desarrollado irradiadores de alto rendimiento con espesores de capa líquida superiores a las profundidades de penetración UV-C del pasado. Por ejemplo, el irradiador de película delgada fabricado por Dill Instruments Co. es un instrumento muy utilizado para irradiar fluidos biológicos. En particular, la Patente US 5.567.616 describe un cilindro giratorio inclinado translúcido a la luz UV con iluminación externa que permite que el fluido biológico fluya hacia abajo por gravedad a lo largo de una pared interior. Dos sensores de luz montados en el extremo superior de la superficie interior y en una cavidad interior miden la intensidad de la luz transmitida por la película de fluido y el espesor de la misma. El irradiador Dill ha sido utilizado para el proceso de beta-propiolactona/UV y para irradiar preparaciones de fibrinógeno estabilizadas con cistina (McCall y col., 1957) o rutina (Marx y col., 1997).

La Patente US 5.133.932 describe un método de irradiación UV-C para la inactivación de patógenos en un recipiente con deflectores que gira horizontalmente alrededor de su eje, estando contenido el líquido biológico en un depósito inferior y dispersándose con la rotación para formar una película delgada sobre la pared interior, que después se mezcla de nuevo en el depósito. Este principio de irradiador por lotes mezclados de película delgada ya ha sido empleado por Oliphant y Hollaender (1946). En la invención descrita, las lámparas UV-C se insertan en el cuello del recipiente y se montan paralelas al eje de rotación. Únicamente una pequeña fracción del volumen del recipiente se puede llenar con el fluido, lo que reduce la capacidad y la escalabilidad del método.

La Patente US 6.190.608 describe un método de flujo para tratar productos sanguíneos con radiación UV-C con el fin de inactivar el erythrovirus B19, ya que, como se ha descrito más arriba, los parvovirus son susceptibles a dosis bajas de radiación UV. En un tubo de cuarzo de flujo recto o de plástico transparente a la luz UV-C se puede generar un flujo turbulento mediante obstáculos o burbujas de nitrógeno. La intensidad UV se ajusta mediante un filtro dispuesto entre una lámpara y el tubo de cuarzo midiéndose la irradiancia UV mediante un radiómetro electrónico. La dosis UV se ajusta regulando el caudal para un tiempo de exposición apropiado.

La Patente US 6.540.967 da a conocer un cilindro giratorio inclinado, translúcido a la luz UV y con iluminación interna sobre cuya superficie exterior fluye el líquido hacia abajo por gravedad. El espesor de película de la capa líquida se controla con un interferómetro. Se propone este aparato para la inactivación viral y micoplasmática en fluidos biológicos.

La Patente US 6.586.172 da a conocer una célula de flujo transparente a la luz UV-C en la que una mezcladora axial estática proporciona una mezcla suficiente para asegurar la irradiación uniforme de la muestra. También se da a conocer un método de certificación que utiliza soluciones acuosas de yoduro no sensibles a la luz del sol para controlar la irradiancia del aparato de lámparas UV mediante espectrofotometría de triyoduro a 352 nm (Hackradt, 1920, 1922, Rahn, 1993). En los ejemplos dados en el documento correspondiente WO 00/20045 se utiliza una solución de NaI al 1% para todos los productos, independientemente de su coeficiente de absorción UV-C, tal como una solución de albúmina al 4,5%, plasma o una solución de inmunoglobulina concentrada. No se adapta la absorbancia ni la viscosidad de las soluciones proteicas y, por consiguiente, el fallo del control actinométrico de las lámparas en la determinación de la dosis UV aplicada o de la dosis equivalente efectiva en la solución proteica se evidencia por el uso de constantes empíricas para la ecuación dosis/inactivación. En este contexto, para asegurar una inactivación efectiva de los patógenos con un aparato de mezcla estático es necesario optimizar experimentalmente los parámetros de cálculo modelo, tales como el caudal, la longitud del dispositivo y el tiempo de permanencia.

En general, una desventaja conocida del uso de las soluciones de yoduro es el bajo límite cuántico de la reacción fotoquímica y la respuesta no lineal a la dosis (Rahn, 1997). En caso de los procesos en línea, los radiómetros permitirían una medida de la intensidad UV en resolución temporal como indicador de un envejecimiento de las lámparas y de cambios de radiancia de corta duración.

El documento WO 01/74407 da a conocer un dispositivo de flujo portátil para la inactivación de patógenos, aplicable especialmente a donaciones individuales de sangre o plasma sanguíneo, por irradiación con UV-C. Este dispositivo se puede certificar utilizando un actinómetro de NaI al 1% en tampón Tris 20 mM, pero la alta absorbancia de este actinómetro se utiliza para determinar una “dosis absoluta” expresada como energía aplicada por volumen (J/m^3). Sin embargo, esto no se ajusta al concepto fotoquímico de fluencia como energía incidente sobre un área y absorbida sólo parcialmente por ésta (Bolton, 1999). Históricamente, todos estos experimentos de inactivación viral se han llevado a cabo en suspensiones tampón distribuidas en películas delgadas sobre un área para expresar la fluencia en erg/mm^2, mJ/cm^2 o J/m^2, de modo que, para comparar diferentes metodologías, serían necesarios los datos de fluencia.

La solicitud de patente US 2003/0049809 A1 da a conocer un método para la inactivación por UV-C de flujo de microorganismos en un fluido, donde un flujo secundario se sobrepone en un tubo espiral enrollado alrededor de la lámpara UV-C. Se cita el ejemplo de la inactivación de parvovirus en una solución de inhibidor de α_1-proteinasa a diferentes concentraciones de proteína y también se evalúa el reactor mediante una solución actinométrica de yoduro/yodato (Rahn, 1993, 1997). Tanto la reducción del título a una fluencia UV predefinida, que disminuye con concentraciones mayores de proteína, como la calificación de "rendimiento leve" dada para el resultado del ensayo actinométrico demuestran que la dosis exacta efectiva para las soluciones proteicas no se puede determinar mediante el uso de una solución actinométrica concentrada.

La Patente US 6.329.136 da a conocer un método para la inactivación de patógenos en fluidos biológicos que utiliza impulsos láser de 20 ns a 248 nm. La instalación experimental consiste en un láser excímero de KrF con su haz dirigido a una célula de cuarzo cilíndrica de 1 cm que contiene la solución de muestra agitada. La energía aplicada se mide mediante un sensor electrónico y se expresa como fluencia (mJ/cm^2). Las fluencias necesarias para la inactivación viral en soluciones tampón y con contenido en proteínas son sumamente diferentes. Tal como se expone en la descripción: "La dosis UV pulsada a (248 nm) necesaria para eliminar el BTV [virus de la lengua azul] de suero bovino fetal es 15 veces mayor que en el caso del PBS [solución tampón de fosfatos]. Es posible que esta diferencia se deba a las propiedades ópticas de los medios huéspedes (es decir, la transparencia óptica). En PBS, el medio salino tamponado es una solución acuosa ópticamente transparente, mientras que el suero bovino fetal es una solución menos transparente, de colores complejos, que contiene sustancias químicas que absorben luz UV, tales como proteínas, que absorben parte de la energía luminosa UV a 248 nm", está claro que una alta absorción de UV-C de las proteínas de matriz reduce los volúmenes de muestra iluminados efectivamente por la luz láser UV incidente.

La Patente US 6.576.201 da a conocer una célula de flujo transparente de UV-C cilíndrica con una pared transparente exterior estática y un cilindro interior giratorio. En una capa de líquido intermedia, el líquido bombeado a través de la célula se mezcla mediante vórtices de Taylor en contracorriente. Para la iluminación se propone una onda continua o una fuente de UV por láser pulsado.

También se han investigado dispositivos generadores de vórtices de Taylor como reactores fotoquímicos para procesos fotoquímicos heterogéneos y homogéneos (Sczechowski y col.. 1995, Forney y Pierson, 2003). Para el examen actinométrico del reactor se utilizó el actinómetro de ferroixalato (Kirk y Mamasivayam, 1983) o el actinómetro de yoduro/yodato (Rahn, 1997). El actinómetro de yoduro-yodato también se diluyó hasta en un factor 100 con el fin de reducir la concentración de yoduro con el fon de examinar la relación entre la concentración de triyoduro de salida y la concentración de yoduro de entrada (Forney y Pierson, 2003). La relación entre la concentración de triyoduro de salida y la dosis de fotones a 254 nm dependiente del caudal se determinó utilizando una absorbancia fija de la solución actinométrica y el cálculo teórico basado en la geometría de la lámpara, el caudal, el límite cuántico y la energía fotónica. Sin embargo, no se propuso ni se realizó una calibración de adaptación de absorbancia para determinar la dosis efectiva en la solución de yoduro (Forney y Pierson, 2003).

El documento WO 97/33629 describe un proceso para la esterilización y purificación de fluidos biológicos mediante exposición a una radiación UV entre 200 nm y 250 nm. El documento US 5.744.094 describe la esterilización de superficies sólidas con láser UV, opcionalmente junto con irradiación IR. En 1960, uno de los principales expertos en la tecnología de vacunas irradiadas por UV-C en película delgada afirmó: "Para calcular la cantidad absoluta de energía implicada en la propia inactivación del virus, debe existir algún modo de cuantificar las cantidades relativas de energía ultravioleta absorbidas por el virus y el medio de cultivo. Esto no ha sido posible todavía; además, la exposición absoluta depende de una serie de factores variables: viscosidad, temperatura, tensión superficial y resistencia friccional o flujo" (Taylor, 1960). Antes de la presente invención, la literatura científica o de patentes seguía sin dar a conocer una determinación de la dosis fotoquímicamente efectiva sobre patógenos de una muestra de fluido. Por consiguiente, es deseable disponer de un método para la inactivación de patógenos en un fluido biológico. También es particularmente deseable un método para determinar una dosis fotoquímicamente efectiva de radiación electromagnética, por ejemplo de luz, suficiente para inactivar patógenos en una muestra biológica y que al mismo tiempo deje inalteradas las sustancias biológicamente activas de interés.

La presente invención proporciona un método según la reivindicación 1. La presente invención también proporciona un método para determinar una dosis fotoquímicamente efectiva de luz monocromática o policromática para inactivar patógenos en un fluido.

En una realización, la presente invención también proporciona métodos para determinar la dosis mediante titulación de los microorganismos viables antes, durante y después de la irradiación de dicho fluido biológico. La muestra también se puede sembrar con organismos viables antes de la irradiación o durante la misma.

La intensidad de la o las fuentes luminosas se puede controlar durante la irradiación para determinar la dosis de irradiación. La luz puede estar en el rango UV.

En particular, en una realización la invención se proporcionan métodos para determinar las dosis efectivas de luz monocromática o policromática de una o más fuentes luminosas para inactivar patógenos presentes en un fluido biológico así como el tiempo necesario de aplicación de dichas dosis y la dosis de la lámpara diana equivalente a la

dosis de luz efectiva en el fluido, determinándose la dosis efectiva de la siguiente manera: se irradia una solución dosimétrica química adaptada a la absorbancia o a la absorbancia y la viscosidad del fluido biológico para determinar la dosis de luz monocromática o policromática efectiva en el fluido biológico; y se controla y registra la intensidad de la fuente o las fuentes luminosas mediante radiometría en los experimentos de dosimetría para comprobar y corregir cambiando, en caso necesario, la intensidad de la fuente luminosa, y para sumar las señales de intensidad de lámpara durante el tiempo de irradiación con el fin de obtener la dosis de la lámpara diana. La luz puede estar en el rango UV.

La biodosimetría se puede llevar a cabo en virus de ácido nucleico monocaternario lineal o circular, tales como virus monocatenarios sin envoltura lipídica que comprenden la familia de virus de ADN Parvoviridae (por ejemplo el Virus Mniute Murino MMV), el parvovirus canino (CPV), el parvovirus bovino (BPV), el parvovirus porcino (PPV), el parvovirus felino (FPV)), las familias de virus de ADN Circoviridae y Circinoviridae (por ejemplo Virus Transmitidos por Transfusiones, TTV), la familia de virus de ARN Picornaviridae (por ejemplo el Virus de la Hepatitis A (HAV), el Virus de la Encefalomiocarditis (EMV)), la familia de virus de ARN Enteroviridae (por ejemplo el virus de la polio), la familia de bacteriófagos de ADN Microviridae (por ejemplo S13, alfa 3 y Phi-X 174) y la familia de bacteriófagos de ARN Leviviridae (por ejemplo MS2).

El fluido biológico puede estar contenido, por ejemplo, en reactores de fotoinactivación por lotes con agitación. El fluido biológico puede comprender al menos un aditivo para reducir los daños y la pérdida de actividad biológica de dicho fluido.

El método se puede llevar a cabo junto con al menos otro método de esterilización o de inactivación de microorganismos. El método también se puede llevar a cabo con un tratamiento con un disolvente detergente.

Las figuras adjuntas ilustran una realización de la invención y, junto con la descripción general dada más arriba y la descripción detallada de esta realización dada más abajo, sirven para explicar los principios de la invención. Por ello, para una comprensión más completa de la presente invención y de los objetos y ventajas de la misma, a continuación se hace referencia a las siguientes descripciones en relación con las figuras adjuntas, en las cuales:

Fig. 1: muestra la relación lineal entre el coeficiente de absorción y la concentración.

Fig. 2: muestra la relación no lineal entre el aumento de viscosidad y la concentración de polivinilpirrolidona.

Fig. 3: muestra el aumento de la absorbancia con la dosis superficial aplicada y el aumento de la sensibilidad con la concentración de KI/KIO_3.

Fig. 4: muestra el aumento de la sensibilidad con PVP.

Fig. 5: muestra los cambios de intensidad de la lámpara.

Fig. 6: muestra el aumento de la dosis con su error expresado como una constante en el eje Y.

Fig. 7: muestra una sección longitudinal de un ejemplo de reactor de la presente invención.

Fig. 8: muestra la sección transversal de un ejemplo de reactor utilizado en la presente invención.

Fig. 9: muestra una vista lateral de un ejemplo de reactor utilizado en la presente invención.

Fig. 10: muestra un ejemplo de un dispositivo de calibración de la presente invención.

El término “microorganismo” se refiere a cualquier organismo eucariota unicelular, como levaduras, protozoos, y a cualquier organismo procariota, como bacterias, o a cualquier virus que infecte a humanos, animales, hongos, plantas u organismos unicelulares procariotas como huéspedes del mismo.

Los conceptos “luz”, “luz monocromática” o “luz policromática” se refieren a energía en el espectro electromagnético, preferentemente a las longitudes de onda y frecuencias dentro del rango UV y de luz visible.

Los fluidos biológicos pueden contener sustancias naturales o añadidas artificialmente que no afectan al fotodeterioro del ácido nucleico de los patógenos, pero que pueden ejercer un efecto protector beneficioso para preservar los componentes de interés frente a la radiación luminosa, más particularmente frente a la irradiación con luz UV, actuando como agentes de extinción de los radicales de oxígeno, por ejemplo flavonoides como rutina (Erdmann, 1956, WO 94/28210), vitaminas como ácido ascórbico (Erdmann, 1956) y creatinina (JP 11286453-A). Sin embargo, si estos aditivos complementan una absorbancia adicional a la longitud de onda utilizada, realmente podrá llegar muy poca energía luminosa patogenicida a los patógenos si la absorbancia adicional no se compensa en la dosis de luz aplicada. Un exceso de energía aplicada deteriora fácilmente las proteínas, por ello es necesario no superar la dosis de luz UV o visible requerida para lograr una inactivación suficiente de los patógenos, calculándose o determinándose esta dosis con la mayor exactitud posible.

La dosis efectiva se mide utilizando dosimetría química por el efecto de una luz monocromática o policromática en la solución dosimétrica. Una solución dosimétrica es una solución preparada con reactivos que experimentan una reacción fotoquímica esencial a las longitudes de onda a medir, generando así un fotoproducto mensurable. El fotoproducto se puede medir con suficiente sensibilidad en capas delgadas en relación con el neperiano del coeficiente de absorción de la solución, de modo que sólo una pequeña fracción de la radiación incidente es absorbida en esta capa. Esto permite determinar la fluencia, ya que la energía luminosa irradiada sobre el área de una capa atraviesa la capa prácticamente sin ser absorbida. Algunos actinómetros de yoduro de potasio - yodato de potasio diluidos (que contienen, por ejemplo, de forma no exclusiva, KI $\geq$ 6,96 mM y KIO_3 1,16 mM) tienen una alta absorbancia correspondiente a la absorbancia de uno de dichos fluidos biológicos (por ejemplo, de forma no exclusiva, $a_{253,7} \geq 2$/cm), un alto límite cuántico y un alto coeficiente de extinción específica de triyoduro. Esta solución dosimétrica se puede preparar con las concentraciones correspondientes de yoduro de potasio y yodato de potasio para adaptarla a los coeficientes de absorción de los fluidos biológicos, preferentemente, de forma no exclusiva, con un coeficiente de absorción $a_{253,7} \geq 2$/cm, y se puede utilizar en cubeta de capa delgada, preferentemente, de forma no exclusiva, siendo la longitud del camino óptico de 0,1 a 1 mm. Con la adición de polivinilpirrolidona (PVP) (cuyo efecto estabilizador de triyoduro es conocido) se aumenta la sensibilidad de la solución de yoduro/yodato y la viscosidad de la solución de proteína se adapta con gran precisión.

El coeficiente de absorción decimal de una solución de la muestra biológica se puede medir con un espectrofotómetro en una cubeta lo suficientemente delgada como para mantener la absorbancia dentro del rango de medida del espectrofotómetro. El coeficiente de absorción se calcula dividiendo el resultado entre la longitud del camino (típicamente en centímetros), calculándose el neperiano del coeficiente de absorción multiplicando el coeficiente de absorción decimal por el logaritmo natural en base 10.

La viscosidad se puede determinar midiendo el tiempo de flujo en un viscosímetro capilar y multiplicando el resultado por la constante del viscosímetro capilar.

La longitud del paso de luz de la cubeta de capa delgada utilizada con las soluciones actinométricas diluidas adaptadas a la absorción se puede mantener en valores bajos, de modo que únicamente una pequeña fracción de la luz incidente es absorbida por la cubeta.

Mediante la calibración con el uso de soluciones actinométricas diluidas parcialmente absorbentes en estas capas delgadas, la fluencia se puede aplicar con la mayor exactitud posible. La absorción puede ser, por ejemplo, del 27,3% en caso de una solución con el coeficiente de absorción decimal a 253,7 nm $a_{253,7}$ = 15/cm en una cubeta de 0,02 cm, o del 19,9% en caso de una solución con $a_{253,7}$ = 2/cm en una cubeta de 0,1 cm, lo que significa que la dosis efectiva a lo largo del paso de luz es del 72,7% en el primer ejemplo dado y del 80,1% en el segundo. De este modo, el error de autoabsorción se puede calcular y corregir fácilmente. Para una calibración exacta, generalmente es recomendable no utilizar factores de corrección de Morowitz por debajo del 50%, lo que significa que la longitud del camino de la cubeta no ha de ser mayor que la distancia a la que la intensidad luminosa se reduce al 25% de su valor inicial.

Para establecer un gráfico de calibración dosimétrica se puede medir una fuente luminosa de irradiancia conocida, por ejemplo por radiometría electrónica, espectrorradiometría o actinometría química con una solución actinométrica concentrada y completamente absorbente. Una vez determinada la irradiancia incidente desde la fuente luminosa, se irradia una cubeta que contiene la solución dosimétrica diluida adaptada a la absorbancia o a la absorbancia y viscosidad de geometría e irradiancia determinadas, durante un tiempo determinado, para aplicar una dosis superficial determinada, y la señal actinométrica obtenida se mide y se representa en un gráfico en función de la dosis de luz.

Esta calibración se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, una lámpara, un obturador en el camino de luz para exponer la cubeta durante un tiempo de exposición determinado, y una cubeta montada paralela a la lámpara al final del camino de luz. Los obturadores de este tipo se utilizan, por ejemplo, como obturadores planos de película en cámaras fotográficas y el mecanismo de obturación se controla con precisión mediante un mecanismo de control mecánico o preferentemente mediante un oscilador electrónico. El obturador accionado por oscilador y la posición fija de la cubeta aseguran una exposición reproducible y exacta de la misma. Para producir este sistema, un cuerpo de cámara réflex o telemétrica de película de 35 mm o formato medio comercial se puede modificar fijando un dispositivo de sujeción para la lámpara en el portaobjetivos y fijando la cubeta a una abertura realizada en la parte posterior de la cámara. Preferentemente, la propia abertura de la parte posterior de la cámara tiene las dimensiones adecuadas para que se ilumine toda la superficie de la cubeta, mientras que los bordes de la abertura actúan como colimador parcial. Para mejorar la estabilidad de la intensidad de la lámpara y el límite cuántico actinométrico, la temperatura de la lámpara y la inserción de cubeta se pueden regular con dispositivos tales como ventiladores, líquidos circulantes o elementos de Peltier.

También se puede utilizar un dispositivo de calibración de este tipo para comprobar y recalibrar sensores radiométricos, fijando una montura para un sensor radiométrico en el dispositivo de sujeción de lámpara, de modo que la luz emitida por la lámpara se puede medir simultáneamente en la cubeta actinométrica y el sensor radiométrico.

Para medir la dosis de luz efectiva, se irradia un volumen de la solución dosimétrica igual al volumen del producto en el dispositivo de irradiación, es decir, en el reactor, y en un momento determinado se extrae un pequeño volumen de muestra y se introduce en la cubeta de capa delgada, midiéndose el producto de reacción generado por la luz. La señal obtenida de la solución dosimétrica irradiada se registra y se compara con el gráfico de calibración correspondiente. La dosis se calcula como el aumento de la dosis dividido entre la unidad de tiempo de irradiación. En caso de un reactor de geometría fija, el tiempo de irradiación es una función lineal de la absorbancia.

La calibración de un dispositivo de irradiación con UV-C mediante dosimetría química de adaptación de absorción y viscosidad se puede realizar experimentalmente con un irradiador de película delgada UV-C muy simple que cuenta con un depósito de lote mezclado, tal como una botella o un tubo de ensayo de cuarzo vertical agitado cargado con una solución proteica que absorbe la luz UV-C e iluminado lateralmente con una lámpara de vapor de Hg de baja presión.

El método químico de dosimetría con soluciones actinométricas puede medir una dosis de luz media (fluencia) aplicada al volumen de muestra introducido en una cubeta de capa delgada. A este respecto, los reactivos fotoquímicos normalmente están presentes en exceso, cualquier excedente del producto de reacción fotoquímica se mezcla y diluye fácilmente, aumentando la concentración del producto de reacción en una relación idealmente lineal con respecto a la cantidad de fotones aplicada.

En otra realización, la dosis de luz biológicamente efectiva (fluencia) se determina adicionalmente mediante biodosimetría, que se refiere a una determinación por la fotoinactivación de microorganismos. La biodosimetría se puede llevar a cabo con dispositivos de irradiación de flujo y se ha utilizado convencionalmente como método adecuado para medir la distribución del tiempo de permanencia (Qualls y Johnson, 1983) y la distribución de la dosis de luz (Cabaj y Sommer, 2000).

En general, el mismo número de fotones inactivará la misma fracción de microorganismos viables por volumen o título, siendo cualquier reducción en el logaritmo del título lineal. Además, un exceso local de intensidad luminosa no puede reducir la cantidad de microorganismos viables a menos de cero, mientras que una dosis de luz local insuficiente dejará una cantidad residual de microorganismos viables presentes en la muestra. En un líquido ópticamente opaco irradiado en un fotorreactor por lotes o de flujo, los microorganismos sólo pasarán por las capas someras del volumen exterior iluminado durante un tiempo muy corto, permaneciendo protegidos durante la mayor parte del tiempo de tratamiento.

En una realización preferente, la biodosimetría se puede utilizar en combinación con la dosimetría química para determinar la eficiencia de mezcla. A este respecto, un método más eficiente, con un mayor grado de mezcla, reducirá la distribución del tiempo de permanencia y aumentará la tasa de inactivación. Este mayor grado de mezcla se puede lograr utilizando un agitador con más de una rueda de paletas montadas a lo largo del eje del agitador, de forma especialmente preferente en caso de líquidos de mayor viscosidad con rasquetas exteriores adicionales que se extienden a todo lo largo del agitador paralelas al eje del agitador y que dejan un hueco entre su borde exterior y la pared interior del recipiente lo suficientemente estrecho como para generar una turbulencia adicional cerca de la zona de irradiación.

En otra realización, la invención prevé el control de una o más fuentes luminosas. El control radiométrico de una fuente luminosa es una práctica convencional para los dispositivos de flujo. La potencia de la lámpara se puede controlar de forma continua y la señal se puede visualizar o registrar.

En otra realización preferente, todo el volumen a tratar se encierra dentro del reactor de irradiación y las señales radiométricas se pueden sumar durante el proceso hasta una dosis de lámpara diana radiométrica final, que puede depender del coeficiente de absorción y aumentar con el tiempo de irradiación.

En general, una lámpara de vapor de mercurio de baja presión común pierde de al menos un 15% y hasta más de un 50% de la intensidad UV-C inicial (253,7 nm) durante su vida útil. Preferentemente se determina la tasa de dosis con una potencia de lámpara conocida y se mide la potencia de la lámpara. De este modo, la tasa de dosis se puede normalizar con respecto a la potencia de la lámpara. La potencia de la lámpara se puede multiplicar por el tiempo de irradiación, lo que dará como resultado una dosis de lámpara diana.

Empleando la dosimetría química, la biodosimetría y la radiometría en combinación, se determinan los siguientes parámetros para optimizar el proceso de irradiación por lotes: con una radiancia de lámpara constante, la dosimetría química proporciona la información básica sobre la dosis media (fluencia) efectiva en el fluido, la tasa de dosis (aumento de fluencia/intervalo de tiempo) y el tiempo de irradiación en función de la absorbancia del fluido. La biodosimetría determina la eficiencia de mezcla mediante la tasa de inactivación de microorganismos (reducción del título por unidad de dosis determinada químicamente) y permite determinar que la dosis efectiva ha inactivado el microorganismo en la medida deseada. La radiometría corrige la variabilidad de la radiancia de lámpara y proporciona la dosis de lámpara diana radiométrica total como una suma de la irradiancia con el tiempo de irradiación, que se determina simultáneamente mediante dosimetría química. De este modo se puede diseñar y evaluar un proceso optimizado para asegurar una fotodesnaturalización mínima de las sustancias de interés y una inactivación máxima de los patógenos.

Se utilizan las siguientes variables en las relaciones lineales abajo descritas:

Coeficiente de absorción: “a” (1/cm) = medida de la reducción de la intensidad luminosa a lo largo del camino de luz a una longitud de onda determinada.

Tiempo de irradiación: “t” (s).

Potencia de la lámpara: “P” (mW/cm^2) = potencia radiante emitida por la lámpara.

Dosis de luz efectiva: “H_0” (mJ/cm^2) = fluencia efectiva en una sección transversal de un volumen en el fluido irradiado con el tiempo de irradiación.

Dosis de la lámpara: “Q” (mJ/cm^2) = energía radiante emitida por la lámpara durante el tiempo de irradiación.

Dosis de lámpara diana radiométrica: “Q'” (mJ/cm^2) = energía irradiante emitida por la lámpara e incidente en un sensor radiométrico durante el tiempo de irradiación.

Estas variables fotoquímicas están relacionadas mediante las siguientes ecuaciones:

$$t = k_1 \times a$$

$$Q = P \times t$$

$$Q' = Q_1 + Q_2 + Q_3 + \ldots + Q_n = \Sigma_i Q_i = \Sigma_i P_i \times t$$

$$Q' = k_2 \times a$$

k_1 y k_2 son constantes empíricas específicas de la geometría del reactor y la eficiencia de mezcla que se pueden obtener mediante experimentación, tal como se ilustra en el ejemplo 2 para k_1 y en el ejemplo 6 para k_2, respectivamente. Para la operación rutinaria de un fotorreactor por lotes sólo es necesario conocer la relación entre el coeficiente de absorción y el tiempo de irradiación o la dosis de lámpara radiométrica para determinar una dosis de luz diana efectiva.

En una realización preferente, las soluciones dosimétricas químicas, yoduro/yodato en tampón de borato, se ajustan i) a la misma absorbancia a 254 nm, en particular a 253,7 nm, por dilución, y ii) a la misma viscosidad, mediante la adición de polivinilpirrolidona, que la solución de proteína diana deseada. De este modo, las soluciones dosimétricas químicas determinarán el porcentaje de luz irradiante utilizada de forma efectiva para generar triyoduro, que se puede medir complejado con polivinilpirrolidona a 367 nm. El porcentaje de luz se puede calcular teóricamente para los dispositivos de irradiación muy simples, por ejemplo una cubeta de 1 cm, mediante integración de la intensidad (I) determinada mediante la ley de absorción de Lambert-Beer (Morowitz, 1950):

$$I(d) = I_0 \times \exp(-\alpha \times d) = I_0 \times \exp(-a \times \ln 10 \times d)$$

donde

I es la intensidad dependiente de la longitud d (en cm); y

a es el coeficiente de absorción decimal (unidades: 1/cm), siendo $a = -\log_{10} T = -\log_{10}$ transimisión. Así, una absorción de 1,0 significa que se transmite una parte correspondiente a 10^1 o un 10% de la luz, mientras el 90% es absorbido. Cuando α es el coeficiente de absorción neperiano, $\alpha = a \times \ln 10 = a \times 2{,}303$.

Integrando la ley de Lambert-Beer en un líquido (una cubeta de 1 cm) con un coeficiente neperiano de al menos $\alpha_{253,7} = 10/cm$, $-1/\alpha$ partes de la intensidad de la luz incidente son efectivas para inactivar los microorganismos diana.

En caso de una dosis UV-C efectiva como virucida de 20 mJ/cm^2 y una intensidad UV-C incidente de 1 mW/cm^2, se da la relación 1 (mJ/cm^2). Por consiguiente, cuando $\alpha = 10/cm$, 1s x 20 x 10 = 200 s; cuando $\alpha = 25/cm$, 1s x 20 x 25 = 500 s; cuando $\alpha = 40/cm$, 1s x 20 x 40 = 800 s.

Para establecer el gráfico de calibración dosimétrica, la solución dosimétrica química se esparce en una película delgada de espesor determinado que absorbe únicamente una pequeña parte de la luz incidente. La película se expone a una dosis de luz y experimenta un cambio sustancial y cuantificable mediante conversión de una especie química para obtener la absorción de luz o la emisión de fluorescencia a una longitud de onda determinada o un aumento del pH. La señal actinométrica se mide y se representa en un gráfico en función de la dosis de luz.

La solución correspondiente se puede irradiar después en un volumen de lote mezclado y, a continuación, se extrae un volumen y se mide el producto de reacción generado por la luz. La señal obtenida de la solución dosimétrica irradiada se registra y se compara con el gráfico de calibración correspondiente. Esto proporcionará la dosis efectiva correspondiente al aumento de la señal en el gráfico de calibración dosimétrica. La tasa de dosis es t n calculada

como el aumento de la dosis dividido entre la unidad de tiempo de irradiación. Preferentemente, la dosis efectiva es la dosis que inactiva esencialmente todos los microorganismos diana en dicho fluido biológico.

La solución dosimétrica simula una solución proteica diana, ya que la solución dosimétrica tiene la misma absorbancia que la solución proteica a determinadas longitudes de onda. La medida de la conversión de las especies químicas formadas por la luz, como el triyoduro, se puede correlacionar con la dosis UV efectiva. La dosimetría química asegura que soluciones proteicas con absorbancias diferentes reciben la misma dosis UV efectiva.

Las soluciones de proteína o los otros fluidos biológicos se pueden sembrar con hongos patógenos o no patógenos, protozoos unicelulares, bacterias, preferentemente con virus o bacteriófagos para asegurar la destrucción o la reducción de la actividad de estos patógenos u otros similares. Para asegurar la conservación de los componentes de interés, tales como las proteínas y otras moléculas biológicas importantes, se puede medir la actividad biológica de las proteínas o por ejemplo de las vitaminas.

Los reactivos dosimétricos son pequeñas moléculas disueltas presentes en gran exceso que se difunden fácilmente en la zona irradiada. Por consiguiente, los fotones de luz incidentes convertirán los reactivos dosimétricos en el producto de reacción fotoquímica. En caso de lámparas que funcionan con una intensidad constante, la misma cantidad de fotones de luz irradiará el volumen del reactor y aplicará la misma dosis efectiva (mJ/cm^2) en un intervalo de tiempo dado para producir una tasa de dosis química ((mJ/cm^2)/min). La intensidad de las lámparas se puede tener en cuenta si se controla la dosis de lámpara irradiante total. En caso de una solución de proteína con bacteriófagos o virus, la tasa de dosis será igual para una absorbancia y una viscosidad dadas.

Microorganismos tales como bacteriófagos, virus y bacterias muestran idealmente un deterioro exponencial de su viabilidad. Esto significa que una dosis dada inactivará la misma fracción de microorganismos viables. Por ejemplo, si 1 mJ/cm^2 reduce el título inicial a 1/10, 2 mJ/cm^2 lo reducen a 1/100, 3 mJ/cm^2 a 1/1000, etc. Si todos los microorganismos se expusieran por igual al ser transportados todos los microorganismos una única vez a la zona de irradiación, todos los microorganismos recibirían un golpe de inactivación. Sin embargo, incluso los microorganismos más pequeños, tales como los bacteriófagos de ADN monocatenario, son partículas grandes (- 25 nm) en comparación con las proteínas y se mueven por convección y flujo en la solución proteica. En el reactor, ciertos microorganismos son transportados varias veces a la zona de irradiación durante un intervalo de tiempo determinado, mientras que otros sólo son transportados una vez y otros ninguna. Por consiguiente, la tasa de inactivación, basada en la tasa de dosis determinada químicamente, aumenta con la mezcla. Cuanto más rápida es la inactivación del microorganismo, más corto es el tiempo de irradiación necesario y más pequeña ha de ser la dosis efectiva requerida. Por ello, la proteína u otra actividad biológica se conservarán con una mayor eficiencia de mezcla.

La inactivación biodosimétrica se mide mediante un título de microorganismo antes y después de la irradiación UV. Por ejemplo, esto se puede llevar a cabo contando la cantidad de colonias residuales de bacterias viables o de placas de bacterias lisadas que corresponden a la cantidad de bacteriófagos todavía vivos. El título de microorganismos viables como unidades formadoras de colonias o de placas (ufc y ufp, respectivamente) se calcula como $\log_{10}((\text{ufc o ufp}) \times 10^{\text{factor de dilución}})$ por ml de volumen de muestra diluida titulado en una placa Petri.

La biodosimetría demuestra que diferentes soluciones de proteína han sido irradiadas con la misma dosis efectiva y con la misma eficiencia de mezcla cuando la tasa de inactivación de fagos (log [número de fagos inactivados]/dosis UV efectiva) es similar. La biodosimetría es adecuada para calibrar diferentes muestras si éstas no contienen ninguna sustancia tóxica o inhibidora para los microorganismos o sus huéspedes. Por consiguiente, la biodosimetría se puede utilizar prácticamente con todos los fluidos biológicos.

Preferentemente se llevan a cabo medidas de intensidad de forma continua y cualquier fuente de UV se puede apagar después de haber alcanzado una dosis de irradiación conforme a la predeterminada mediante dosimetría química. La dosis de lámpara radiométrica aumenta en una relación lineal con la absorción de la solución de proteína. Las lámparas que funcionan con una intensidad menor necesitarán más tiempo de irradiación para alcanzar la dosis de lámpara diana radiométrica.

Cualquier dosis UV dada se puede medir en mJ/cm^2. La dosis de irradiación es la potencia total de la lámpara en el tiempo. Sin embargo, sólo parte de esta dosis de irradiación será efectiva de acuerdo con la medición por dosimetría química y la inactivación de bacteriófagos. Por ejemplo, un reactor por lotes de 30 l puede requerir una dosis de lámpara de irradiación aproximadamente 1000 veces mayor que la dosis efectiva. Como se muestra más arriba, la determinación de la dosis efectiva mediante dosimetría química también proporciona el tiempo de irradiación. En caso de una potencia de lámpara ligeramente variable, el tiempo de irradiación se puede sustituir por la dosis de irradiación. Ésta se determina registrando la intensidad de la lámpara durante las etapas de irradiación en soluciones dosimétricas patrón. Mientras se determina la dosis diana efectiva como virucida, los recuentos de intensidad se suman durante el tiempo de irradiación para obtener la dosis de lámpara diana radiométrica correspondiente a la dosis efectiva. El control del proceso mediante la dosis de la lámpara de irradiación puede compensar los cambios de potencia de la lámpara y puede aumentar la exactitud del presente método.

Además del tratamiento con luz también se pueden utilizar aditivos protectores para reducir daños y pérdidas de actividad biológica. En la técnica se conocen diversos aditivos protectores, como la vitamina E, para proteger las células del deterioro, ascorbato contra la pérdida de actividad funcional de constituyentes en plasma y agentes de extinción de radicales libres y formas activas de oxígeno como histidina, rutina, quercetina y otros flavonoides, y otros estabilizadores tales como azúcares como manitol y aminoácidos para reducir la pérdida de actividad funcional de los componentes sanguíneos. En el estado actual de la técnica también se sabe que la eliminación del oxígeno disuelto en la solución, por ejemplo mediante evacuación, antes de la irradiación y la sustitución del aire durante la irradiación por un gas inerte, por ejemplo nitrógeno, puede ejercer un efecto beneficioso en las sustancias de interés, ya que la generación de oxígeno singlete necesita de oxigeno disuelto.

En una realización, los presentes métodos para la inactivación y la determinación de la dosis se utilizan en combinación con otros métodos diversos conocidos para la esterilización de fluidos y la inactivación viral. En la técnica se conocen bien diversos métodos, incluyendo tratamiento térmico en húmedo o pasteurización, que comprenden la incubación del fluido a una temperatura elevada durante un período de tiempo dado con o sin estabilizadores, tal como se utiliza generalmente para la albúmina. Alternativamente, otro método consiste en el tratamiento térmico en seco, que comprende la incubación de componentes fluidos liofilizados a una temperatura elevada durante un período de tiempo dado tal como se utiliza para componentes como el Factor VIII. Otro método incluye la ultrafiltración y el tratamiento con disolventes detergentes, donde el fluido se mezcla íntimamente con un sistema de disolvente detergente, tal como tri(n-butil)fosfato al 1% (TNBP) y Triton X-100 al 1% o Tween 80, y se incuba junto con éstos durante un período de tiempo dado, seguido de eliminación del sistema detergente-disolvente, convenientemente mediante cromatografía hidrófoba. En el documento WO 94/28120 y las Patentes US 4.946.648, 4.481.189 y 4.540.573 se describen detalles de tratamientos con detergente/disolvente.

En otra realización, la irradiación con UV de la presente invención se utiliza en combinación con un tratamiento con disolvente detergente. Una característica del tratamiento con disolvente detergente es que puede dar lugar a un aumento significativo de la absorbancia en los fluidos así tratados, en este contexto resulta particularmente ventajosa la capacidad del método de la presente invención para lograr una inactivación viral efectiva en fluidos de absorbancia relativamente alta.

En otra realización se lleva a cabo un método para inactivar por UV microorganismos de acuerdo con la presente invención junto con al menos otro procedimiento de inactivación de microorganismos. A este respecto, diferentes tipos de virus pueden tener diferentes sensibilidades a diversos tratamientos, con frecuencia siendo necesario utilizar una combinación de diferentes tratamientos para asegurar la inactivación de todos los diferentes virus presentes. Una ventaja particular del tratamiento por irradiación de la presente invención es que determinados tipos de virus que son resistentes a otros tratamientos fácilmente disponibles son susceptibles al tratamiento por irradiación.

En otra realización, el método de validación basado en dosimetría química y biodosimetría se puede utilizar para optimizar los parámetros de mezcla en un reactor de irradiación UV, alcanzando una reducción máxima del título logarítmico de microorganismos añadidos a una dosis definida, tal como se determina mediante dosimetría química.

En otra realización, la invención proporciona el uso de un reactor de irradiación por lotes que comprende un recipiente de irradiación vertical con una pared transparente a una longitud de onda de fotoinactivación, un agitador dentro del recipiente capaz de mezclar un volumen de material dispuesto en su interior moviendo fracciones de volumen hasta una zona de irradiación y en sentido opuesto, una o más fuentes luminosas de temperatura regulada para emitir una radiancia constante a las longitudes de onda de fotoinactivación en el interior del recipiente de irradiación y un dispositivo de control electrónico con un sensor sensible a las longitudes de onda de inactivación. Preferentemente, las fuentes luminosas están equipadas con reflectores para reflejar la luz sobre la pared transparente del recipiente de irradiación y estas fuentes luminosas se pueden conmutar individualmente. Las señales del radiómetro de control emitidas por el sensor se suman hasta un valor diana mediante un contador mecánico, electrónico o controlado por un *software* de ordenador. Se pueden apagar una o más fuentes luminosas automáticamente cuando la energía a las longitudes de onda de inactivación ha alcanzado el valor diana. Las fuentes luminosas se pueden montar externamente y su temperatura se puede regular mediante un líquido refrigerante. El agitador puede consistir en un agitador con ruedas de paletas superpuestas y rasquetas cercanas a la pared.

Dado que la desnaturalización enzimática depende de la temperatura y se inhibe a bajas temperaturas y que las reacciones fotoquímicas como la inactivación de ácido nucleico y la fotodesnaturalización de proteínas son independientes de la temperatura entre 0 y ~ 50ºC (Engelhard y Eikenberg, 1955), un diseño de reactor por lotes con lámparas independientes exteriores permite irradiar en poco tiempo el fluido previamente enfriado sin aumento relevante de temperatura en las lámparas que funcionan a una temperatura óptima para una radiancia UV-C máxima.

Las Figuras 7-9 muestran reactores preferentes utilizados en la presente invención, que comprenden un tubo cilíndrico vertical (A) de un material suficientemente transparente a las longitudes de onda de fotoinactivación aplicadas. El tubo (A) está rodeado por fuentes luminosas (B) que emiten luz a las longitudes de onda de fotoinactivación. Las fuentes luminosas son preferentemente fuentes luminosas tubulares, de forma especialmente

preferente tubos de descarga de gas llenos de vapor de mercurio o gas xenón, que pueden estar revestidos con una capa interior fluorescente para convertir la emisión primaria a longitudes de onda mayores.

El tubo (A) está cerrado herméticamente por su extremo inferior con un fondo curvado hacia afuera (C), para asegurar un flujo suave del fluido contenido sin ningún volumen muerto, y, por su extremo superior, con una tapa superior (D). Barras separadoras (E) entre el fondo (C) y la tapa superior (D) mantienen el cierre hermético del tubo. El fluido se agita con un agitador (F) montado sobre la tapa superior, que produce una mezcla suficiente con ruedas de paletas superpuestas (G) y opcionalmente rasquetas longitudinales adicionales (H). El agitador gira mediante un motor de agitación (I).

Cada lámpara es controlada por su propio sensor de lámpara (J) conectado a un monitor de intensidad, un registrador y, de forma especialmente preferente, el contador de dosis de luz. El rendimiento luminoso de la lámpara se puede aumentar mediante un reflector (K) consistente en un material con suficiente reflectancia que enfoca la luz sobre el cilindro. Preferentemente, el rendimiento luminoso de la lámpara se controla según su temperatura de funcionamiento, preferiblemente mediante una corriente de líquido regulador de temperatura transparente a la luz contenido en el espacio entre la lámpara y un tubo envolvente (L) transparente a la luz. Los soportes de lámpara (M) obturan el recorrido del flujo del líquido regulador de temperatura, que fluye entre la entrada (N)/salida (N) con respecto a los conectores de alimentación de la lámpara.

El producto se inyecta en el reactor utilizando un tubo flexible insertable o una lanceta tubular rígida a través de la entrada (O) de la tapa superior y se drena después de la irradiación a través de la salida (P) equipada con una válvula (Q) para evitar la contaminación cruzada del fluido tratado con el no tratado.

Un acceso de toma de muestras adicional (R) permite extraer las muestras durante el proceso, preferentemente con una aguja hipodérmica o una jeringuilla para inyecciones a través de un septo de goma. Un sensor de temperatura (S) controla la temperatura del fluido. Un acoplador (T) conecta el motor de agitación (I) con un controlador de revoluciones para asegurar una mezcla efectiva. Un cabezal de bola de pulverización insertable (U) posibilita la limpieza del reactor *in situ*.

En otra realización, la invención utiliza un dispositivo de calibración que comprende: una fuente luminosa, una abertura de salida de luz que permite que la luz irradie el interior de una abertura de colimador, un obturador y una ranura de cubeta montada en un alojamiento de temperatura regulada con una abertura de entrada de luz que permite que la luz irradie la cubeta o la célula óptica que contiene la solución dosimétrica. Se puede prever una montura, preferentemente de temperatura regulada, para fijar sensores radiométricos, irradiándose la luz de la fuente luminosa simultáneamente tanto a través del obturador sobre la cubeta como a través de la abertura en la ventana de entrada del sensor, para controlar la fuente luminosa a través del proceso de calibración o para comprobar las propiedades de mantenimiento con el tiempo de dicho sensor por comparación con una solución actinométrica de acuerdo con el estado actual de la técnica contenida en dicha cubeta o célula óptica expuesta simultáneamente. De forma especialmente preferente, el obturador se acciona mediante un temporizador preciso para lograr un tiempo de exposición exacto y reproducible de la cubeta o la célula óptica. La Figura 10 muestra un dispositivo de calibración preferente. Una lámpara preferentemente tubular (T) montada en un alojamiento (U) tiene preferiblemente la temperatura regulada o la corriente estabilizada, de forma especialmente preferente ambas cosas, para lograr una radiancia de luz constante durante el proceso de calibración. Tal como se indica en la Figura 10, la regulación de la temperatura se logra mediante un líquido transparente a la luz que fluye por delante de la lámpara. La luz, indicada mediante las flechas que apuntan en sentido contrario a la lámpara, se irradia a través de una abertura (V), más allá del obturador (W) abierto controlado por tiempo, sobre la cubeta insertada junto con su adaptador de distancia, si la cubeta es más delgada que el espacio máximo del soporte, en dicho soporte de cubeta (X), que preferentemente tiene la temperatura regulada. La cubeta que contiene la solución actinométrica o la solución patrón dosimétrica se expone de forma exacta y precisa durante la apertura del obturador. Una abertura opcional (Y) situada en un lugar diferente al de la abertura (V), pero preferentemente de modo que la luz se irradie espacialmente de modo similar desde la lámpara a las dos aberturas (V e Y), puede alojar un sensor electrónico (Z), por ejemplo, preferentemente, aunque no de forma exclusiva, uno de los sensores utilizados para la radiometría del reactor, lo que proporciona un método preciso para recalibrar el sensor en base a la relación de las intensidades, preferentemente medidas de forma simultánea por actinometría, en el soporte de cubeta (X) y por radiometría con el sensor (Z). El sensor (Z) también se puede utilizar para controlar y registrar la intensidad de la lámpara durante la exposición de calibración y para su posterior corrección si la intensidad de la lámpara ha cambiado durante esta exposición de calibración.

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la invención.

Experimento 1: Coeficientes de absorción de la solución actinométrica de yoduro/yodato en alta dilución, respuesta dosimétrica de las soluciones actinométricas de yoduro/yodato y estabilización del triyoduro generado por UV-C con polivinilpirrolidona

Una solución que contenía KI 0,24M y 0,04M en un tampón borato 0,01M, pH = 9,25, se diluyó en factores 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 con tampón borato 0,01M y se midió la absorción en una cubeta de 0,1 mm. La Fig. 1 muestra que el coeficiente de absorción depende de la concentración según una relación lineal ($a_{253,7}$ = 69/cm x factor de dilución).

Una solución que contenía 10 g de polivinilpirrolidona K90 (PVP K90; masa molar media 360.000 Da) en 1 l de tampón borato 0,01M se diluyó en factores 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 y la viscosidad de las diluciones y el tampón se midió en un viscosímetro capilar Schott 0,40 mm Ubbelohde regulado a una temperatura de 22,8ºC. En la Fig. 2 se puede observar que la viscosidad aumenta con la concentración según una relación no lineal.

Se prepararon diluciones de solución madre que contenían KI 0,24M y 0,04M en tampón borato 0,01M, pH = 9,25, para una absorción definida a 253,7 nm de 6,1/cm (KI 0,0212M + KIO_3 0,0035M + 0,95 g PVP K90/L; para eluato de complejo de protrombina de gel de intercambio aniónico DEAE sephadex (Brummelhuis 1980)) y 16/cm (KI 0,06M + KIO_3 0,01M + 6,25 g PVP K90/L; para una solución de fibrinógeno al 2,5% (p/v)) y se dispusieron en cubetas de 0,2 mm. La calibración de capa delgada se realizó colocando la cubeta que contenía la solución dosimétrica durante un tiempo determinado bajo una lámpara CAMAG TLC de irradiancia conocida (medida con el actinómetro Rahn) en la posición de la cubeta. La absorbancia se midió a 367 nm. En la Fig. 3 se puede observar que la absorbancia aumenta con la dosis superficial aplicada y que la sensibilidad aumenta con la concentración de KI/KIO_3.

Se preparó una solución dosimétrica que contenía KI 0,06M y KIO_3 0,01M en tampón borato 0,01M, pH = 9,25, con un coeficiente de absorción $a_{253,7}$ = 16/cm y una solución con la misma concentración de KI y KIO_3 y 6,25 g de polivinilpirrolidona (PVP) K 90/L. La calibración de capa delgada se realizó colocando una cubeta de 0,2 mm que contenía la solución dosimétrica durante un tiempo determinado bajo la lámpara CAMAG TLC tal como se ha descrito más arriba. La absorbancia se midió a 352 nm (KI + KIO_3 solo) o 367 nm (KI + KIO_3 + PVP). En la Fig. 4 se puede observar que la PVP aumenta la sensibilidad del método.

Experimento (Ejemplo de la invención) 2: Determinación del tiempo de irradiación en un fotorreactor por lotes de geometría fija con soluciones de dosimetría actinométricas

Se prepararon soluciones dosimétricas con coeficientes de absorción decimales $a_{253,7}$ de 2,1/cm (KI 0,0072M + KIO_3 0,0012M + 0,5 g PVP K90/L, para concentrado de FVIII), 6,1/cm (véase el Ejemplo 1), 10/cm (KI 0,0346M + KIO_3 0,0058M + 1,21 g PVP K90/L; para una solución de inmunoglobulina G al 2% (p/v)) y 16/cm (véase el experimento 1) y se registraron los gráficos de calibración tal como se describe en el experimento 1. Un tubo de ensayo de cuarzo de 4 cm se llenó con 100 ml de la solución dosimétrica, se agitó con una barra agitadora magnética en un agitador magnético y se irradió entre 2 lámparas de vapor de mercurio de baja presión equipadas con reflectores de acero inoxidable pulido. A intervalos predeterminados se extrajeron muestras y se dispusieron en las cubetas de 0,2 mm para su medida espectrofotométrica, leyéndose la dosis en el gráfico de calibración. Después se calculó la tasa de dosis como (mJ/cm^2)/min y la tasa de dosis inversa, es decir el tiempo de irradiación específico por dosis unitaria, como min/(mJ/cm^2). La constante k_1 para la relación entre el coeficiente de absorción y el tiempo de irradiación (específico) se puede calcular de la siguiente manera:

$$t = k_1 \times a$$

solución $a_{253,7}$ =	2,1/cm	6,1/cm	10/cm	16/cm
tasa de dosis ($(mJ/cm^2/mm$)	14,40	3,68	2,71	1,56
tiempo irradiación específico (min/(mJ/cm^2))	0,0694	0,2714	0,3688	0,6410
constante k_1 (promedio = 0,0386)	0,0330	0,0445	0,0369	0,0401

Mediante cálculo de regresión lineal del tiempo de irradiación específico dependiente del coeficiente de absorción se obtiene una correlación lineal R^2 = 0,989. Este resultado demuestra que la dosimetría basada en soluciones patrón de adaptación de absorción y viscosidad con calibración de capa delgada es adecuada para la calibración de fotorreactores por lotes con agitación.

Experimento 3: Inactivación de MMV y Phi-X 174 en irradiación de capa delgada y por lotes

Una solución madre de MMV de sobrenadante de cultivo celular (- 10^8 dosis infecciosas de cultivo de tejidos ($TCID_{50}$)/ml) y lisado de bacteriófago Phi-X 174 (~ 1 X 10^9 unidades formadoras de placa (UFP)/ml) de propagación en *Escherichia coli* se diluyó en NaCl 0,15M tamponado con fosfato 20 mM (solución tampón de fosfatos, PBS) y 2,5 ml se irradiaron con diferentes dosis UV-C en placas Petri de poliestireno de 32 mm agitadas horizontalmente bajo una lámpara CAMAG TLC. La irradiancia a la distancia de la superficie de la muestra se determinó con un radiómetro RM21 Dr. Groebel con un sensor UV-C ciego a la luz natural y se midió la autoabsorbancia de la solución en un espectrofotómetro para corregir la fluencia efectiva (dosis de UV) (Morowitz, 1950). Los títulos de MMV y Phi-X 174 se determinaron mediante titulación en cultivo de células huésped y en bacterias huésped, respectivamente.

Dosis UV (mJ/cm^2)	**log_1 ufp Phi-X 174/ml**	**Dosis UV (mJ/cm^2)**	**$log_{10}TCID_{50}$ MMV/ml**
0,00	6,41	0	6,54
2,25	5,79	2	5,31
4,50	4,37	4	4,42
6,75	3,46	6	3,52
9,00	2,36	8	2,93
11,25	1,35	10	2,37
		12	1,44
tasa inactivación	-0,468 (log_{10}(UFP/ml))/(mJ/cm^2)		-0,405 log_{10}(TCID$_{50}$/ml)) (mJ/cm^2)

En una botella de cuarzo de 100 ml con una barra agitadora de 4 cm se introdujeron 80 ml de solución de proteína sembrada con MMV o Phi-X 174 (eluato de complejo de protrombina DEAE sephadex, $\alpha_{253,7}$ = 6,9/cm), la botella se colocó sobre un agitador magnético y la solución se agitó a ~ 250 rpm y se irradió lateralmente con una lámpara CAMAG TLC. La calibración se realizó con una solución patrón ($\alpha_{253,7}$ = 6,9/cm) tal como se describe en el experimento 2. Se extrajeron muestras para titulación de virus o bacteriófagos a intervalos de tiempo calculados después de la tasa de dosis medida y se titularon para determinar el título de virus infecciosos o bacteriófagos vivos.

Dosis UV (mJ/cm^2)	**log_{10}(ufp Phi-X 174/ml)**	**Dosis UV (mJ/cm^2)**	**log_{10}(TCID$_{50}$ MMV/ml)**
0,00	7,27	0,00	6,77
1,69	5,96	6,86	3,46
3,37	5,52	13,70	0,61
5,06	4,78		
6,74	3,95		
8,42	3,11		
10,10	2,39		
11,79	1,28		
tasa inactivación	(log_{10}(ufp/ml))/(mJ/cm^2) -0,480	**tasa de inactivación**	(log_{10}(TCID$_{50}$/ml))/ (mJ/cm^2) -0,425

A partir de las tasas de inactivación de Phi-X 174 y MMV se puede deducir que su sensibilidad a la luz UV-C a 253,7 nm es similar. Por ello, el Phi-X 174 se utilizó como biodosímetro. También se puede observar que las tasas de inactivación del líquido absorbedor UV-C en el dispositivo por lotes con agitación son prácticamente iguales debido al método eficiente de mezcla, que asegura el transporte de los microorganismos a la zona de irradiación.

Experimento (ejemplo de la invención) 4: Uso de dosimetría y biodosimetría para la optimización de un reactor por lotes con agitación

Un recipiente de cuarzo cilíndrico (7 cm de diámetro interior, 3 mm de espesor de pared, 13 cm de altura) equipado con un agitador con ruedas de paletas superpuestas (3 ruedas de paletas, velocidad de agitación ajustable) se iluminó lateralmente con dos lámparas de mercurio de baja presión, cada una de ellas montada en una envoltura de dos tubos de cuarzo concéntricos y equipada con un reflector de acero inoxidable posterior. A través de la envoltura

de lámpara se bombeó agua de refrigeración a un termostato para mantener la temperatura de la lámpara y el rendimiento de UV-C en valores constantes.

La velocidad de agitación se ajustó a 60 revoluciones por minuto (rpm) (agitación lenta), 150 rpm (agitación media-rápida) y 240 rpm (agitación rápida). Se determinó la tasa de dosis de UV para la irradiación de la solución patrón de adaptación de absorción y viscosidad de 450 ml para el eluato de protrombina complejada sembrado con bacteriófagos ($a_{253,7}$ = 8,0/cm, η = 1,15 cp, KI 27,83 mM, KIO_3 4,64 mM, 1 3 g PVP K90/L en tampón de borato 0,1 M, pH = 9,25) tal como se describe en el experimento 2. Se descubrió que concentraciones de borato superiores ($\geq$ 0,1M) a las dadas en la literatura (0,01M) producen una mayor sensibilidad y una mejor estabilidad de la solución dosimétrica. El eluato de protrombina comlejada sembrado con bacteriófagos se irradió y la inactivación de bacteriófagos se determinó tal como se describe en el experimento 3. Como parámetro adicional se midió la actividad del factor de coagulación X (FX) utilizando un ensayo amidolítico a dosis de 0, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y 100 mJ/cm^2.

velocidad de agitación	60 rpm	150 rpm	240 rpm
tasa de dosis de UV-C (dosimetría ((mJ/cm^2)/min)	1,770	1,794	1,799
Tasa de inactivación de Phi-X 174 (biodosimetría) (log_{10}(ufp/ml))/(mJ/cm^2)	-0,277	-0,399	-0,460
Dosis UV-C requerida para inactivar 5 log_{10}(ufp/ml)	18,05	12,53	10,87
Tasa de inactivación de FX (U FX/ml)/(mJ/cm^2)	-0,0054	-0,0048	-0,0051
Inactivación de FX a 20 mJ/cm^2 (% no irradiado)	88	88	89

En este experimento se puede ver que la optimización de un fotorreactor por lotes para la inactivación viral se puede realizar mediante modelos de solución de dosimetría y biodosimetría, ya que ambos métodos de validación proporcionan información sobre la eficacia de mezcla. También es evidente que la inactivación más rápida de patógenos se logra con la mayor velocidad de agitación posible para una solución de proteína (evitando la generación de espuma). La ventaja de una optimización de este tipo consiste en que, con el mezclado más eficaz, se logra el margen de seguridad más alto para la inactivación viral a una dosis diana de, por ejemplo, 20 mJ/cm^2, o se puede reducir la dosis diana para conservar la actividad biológica adicional de la proteína.

Experimento (ejemplo de la invención) 5: Validación de un control de proceso para la irradiación por lotes de eluato de protrombina complejada utilizando dosimetría química, biodosimetría y radiometría

Un fotorreactor para la inactivación viral con un tubo de cuarzo cilíndrico (25 cm de diámetro interior, 5 mm de espesor de pared, 75 cm de longitud), una tapa superior plana y un fondo curvado con acceso pata la toma de muestras y un agitador de ruedas de paletas superpuestas, con tres ruedas de tres paletas y una rasqueta en cada borde exterior de paleta, se rodeó con 10 lámparas UV-C de temperatura regulada por agua (Philips TUV 55W HO), cada una de ellas controlada con un sensor radiométrico UVC-SE DR Groebel. La capacidad máxima de este reactor es de 30 l. La potencia de la lámpara se registró utilizando un sensor radiométrico para cada lámpara en un registrador gráfico, normalizándose la potencia relativa de la lámpara tomando la primera pasada como el 100%.

29,5 l de eluato de complejo de protrombina se sembraron con 0,5 l de lisado de Phi X-174 ($\sim 4 \times 10^9$ ufp/ml) de *E. coli*. La solución resultante tenía un coeficiente de absorción $a_{253,7}$ = 6,0/cm. La tasa de dosis del reactor se determinó antes de los experimentos de inactivación viral con una solución patrón de adaptación de absorción y viscosidad tal como se describe en el ejemplo 2, que contenía KI 20,87 mM, KIO_3 3,48 mM y 1,304 g de PVP K90/L en borato 0,1M, pH = 9,25, con una tasa de dosis de 1,3435 (mJ/cm^2)/min y una tasa de dosis de lámpara relativa a la primera pasada de irradiación de bacteriófagos del 98,5%. Se determinó un tiempo de irradiación de 14 minutos para una dosis diana de 20 mJ/cm^2, dándose por supuesta una tasa de dosis constante. Con el fin de demostrar el efecto de la potencia de la lámpara como fuente de error, la temperatura de la lámpara se bajó en la tercera pasada de 28ºC a 24,5ºC, para reducir la potencia de la lámpara a aproximadamente un 90% del máximo. La tasa de inactivación de Phi-X 174 (basada en la tasa de dosis constante supuesta) se determinó tal como se describe en el ejemplo 3 y se expresó como (log (ufp/ml))/(mJ/cm^2).

	Pasada nº 1 (= 100%)	Pasada nº 2	Pasada nº 3
Potencia de la lámpara	100%	101,4%	89,3%
Tasa k de inactivación de Phi-X 174 (no corregida)	-0,4272	-0,4331	-0,3742
Tasa k de inactivación de Phi-X 174, corregida para la potencia de lámpara	-0,4272	-0,4275	-0,4190

El experimento 5 demuestra que la potencia de la lámpara es un parámetro del proceso de irradiación por lotes y que tanto las tasas de dosis dosimétrica como las tasas de inactivación biodosimétrica han de ser normalizadas con respecto a la potencia de la lámpara.

Experimento 6: Diseño de proceso para la irradiación por lotes de soluciones proteicas basadas en una dosis diana radiométrica determinada por dosimetría y radiometría

El fotorreactor descrito en el ejemplo 4 se calibró para tasas de dosis y tiempos de irradiación de soluciones patrón con coeficientes de absorción de 6,0/cm, 7,0/cm, 8,0/cm, 9,0/cm y 10,0/cm. Un volumen de muestra de 450 ml se agitó a 200 rpm. Se encendieron las lámparas y la tasa de dosis se determinó mediante la medida de muestras de la solución patrón extraídas a los 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 minutos. La intensidad de la lámpara se controló y se registró mediante un radiómetro de cabeza doble conectado a un ordenador.

La Figura 5 muestra que la intensidad de la lámpara alcanza su valor máximo 3 minutos después de encender ésta y que la dosis aplicada durante los primeros 3 minutos es menor que el aumento de dosis constante aplicado en los siguientes intervalos de 3 minutos. La Figura 6 muestra el aumento de dosis correspondiente con el error expresado como constante del eje Y por debajo de cero. Por consiguiente, la constante del eje Y de la ecuación de tasa de dosis se añadió a la dosis diana (20 mJ/cm^2) para obtener la dosis diana aumentada corregida, el tiempo de irradiación se calculó dividiendo la dosis diana aumentada entre la tasa de dosis, y las intensidades de la lámpara medidas a intervalos de 1 segundo (mW/cm^2) se sumaron durante el tiempo de irradiación para obtener una dosis de lámpara radiométrica diana (mJ/cm^2) dependiente del coeficiente de absorción. La constante k_2 se puede calcular de la siguiente manera:

$$Q = k_2 \times a$$

coeficiente de absorción $a_{253,7}$	6,0/cm	7,0/cm	8,0/cm	9,0/cm	10,0/cm
dosis de lámpara radiométrica diana Q (mJ/cm^2)	11879	13674	16038	18660	21102
constante k_2 (promedio = 2024)	1980	1953	2004	2073	2110

En la tabla del experimento 6 se puede observar que la dosis de lámpara diana radiométrica aumenta con el coeficiente de absorción según una relación lineal (R^2 = 0,996).

Experimento (ejemplo de la invención) 7: Compensación dosimétrica para el efecto de absorción UV-C de ascorbato ensayado como protector frente a la fotodesnaturalización

A un eluato FEIBA DEAE sephadex G50 (18,2 mg de proteína/ml) se añadió ascorbato sódico en una concentración de 1 mmol/l. El coeficiente de absorción $a_{253,7}$ del eluato FEIBA con ascorbato era de 16/cm, en comparación con 7,3/cm en el caso del eluato nativo. Para la dosimetría química se prepararon soluciones patrón que contenían KI 0,0254M, KIO_3 0,0042M y 1,61 g de PVP K90/L en tampón borato 0,1M, pH = 9,25 (para $a_{253,7}$ = 7,3 cm) y KI 0,06M, KIO_3 0,01M y 1,61 g de PVP K90/L en tampón borato 0,1M, pH = 9,25 (para $a_{253,7}$ = 16/cm), se registraron los gráficos de calibración con cubetas de capa delgada de 0,2 mm y se irradiaron 110 ml en el fotorreactor por lotes descrito en el ejemplo 2 con 1 lámpara (para $a_{253,7}$ = 7,3/cm con una tasa de dosis de 1,41 (mJ/cm^2)/min) y 2 lámparas (para $a_{253,7}$ = 16/cm con una tasa de dosis de 1,33 (mJ/cm^2)/min).

110 ml tanto del eluato FEIBA nativo como del eluato FEIBA con ascorbato se irradiaron con la tasa de dosis respectiva y se extrajeron muestras a 5; 10; 15; 20; 25; 30; y 35 mJ/cm^2. La actividad del factor X (FX) se determinó tal como se describe en el Ejemplo 4.

Dosis de UV (mJ/cm^2)	Actividad de FX (% no irradiado)	Actividad de FX (% no irradiado)
	FEIBA nativo	FEIBA + ascorbato Na 1mM
0 (no irradiado)	100	100
5	94	101
10	95	93
15	86	98
20	89	91
25	84	85
30	85	89
35	84	88
Tasa de inactivación FX ($U/(mJ/cm^2)$)	-0,0045 (R^2 = 0,7886)	-0,0043 (R^2 = 0,7727)

La tabla del experimento 7 muestra que no existe ninguna diferencia relevante en la tasa de inactivación de FX (U FX/(mJ/cm^2)) entre el eluato FEIBA nativo y el eluato FEIBA con ascorbato. Por consiguiente, el ácido ascórbico, que muestra por sí mismo un alto nivel de absorción UV-C, no ejerce ningún efecto fotoprotector en la proteína FX. Como se ha demostrado, este incremento de la absorbancia UV-C por un aditivo se puede compensar fácilmente mediante la dosimetría química de adaptación de absorbancia arriba descrita.

Experimento 8: Optimización del tipo de agitador para soluciones altamente absorbentes

Mediante la disolución de concentrado de fibrinógeno liofilizado (Fibrinogen TIM 3, Baxter BioScience) se obtuvo una solución de fibrinógeno altamente absorbente y viscosa ($a_{253,7}$ ~ 13 - 14/cm, η ~ 2 cp). Tanto en el caso de la solución patrón correspondiente como en el caso del lisado de Phi-X 174 sembrado con bacteriófago (1 ml de lisado para 60 ml de solución de fibrinógeno), 450 ml de la solución de fibrinógeno se irradiaron en el reactor descrito en el Ejemplo 4 a 120 rpm, bien con un agitador con ruedas de paletas superpuestas (tres ruedas de 3 paletas totalmente sumergidas, con un hueco de - 6 mm entre el borde exterior y el cilindro de vidrio de cuarzo), bien con una rasqueta (dos ruedas de 2 paletas en el fondo y en el centro y 2 rasquetas axialmente paralelas en el borde exterior, con un hueco de - 4 mm entre la rasqueta y el cilindro de vidrio de cuarzo). Se utilizaron 2 lámparas. El título de bacteriófago se determinó tal como se describe en el experimento 3.

Tipo de agitador (120 rpm)	Ruedas de paletas	Rasqueta
$a_{253,7}$ (1/cm)	13,45	14,1
Viscosidad (cp)	2,0	2,1
Tasa de dosis química (mJ/cm^2)/min	0,8398	0,8493
Tasa de inactivación de Phi-X 174 k	-0,3121	-0,3873

La tabla del experimento 8 demuestra claramente que el agitador con rasqueta logra una mezcla mejor a la velocidad moderada de 120 rpm. Por consiguiente, la combinación de dosimetría química y biodosimetría se puede utilizar para determinar una distribución de la dosis.

Experimento 9: Calibración de una solución dosimétrica con un dispositivo de calibración con intensidad de lámpara y límite cuántico estabilizados y de tiempo de exposición controlado

Para lograr una exposición reproducible y precisa de una solución dosimétrica en la cubeta de capa delgada, sobre la parte trasera de bisagra de una cámara réflex de un objetivo se montó una ranura de cubeta con una camisa de temperatura regulada por agua, practicándose en dicha parte trasera una abertura para exponer la cubeta a través del obturador de la cámara. La bayoneta del objetivo de la cámara se montó sobre la brida de un alojamiento de

lámpara que contenía una lámpara de valor de mercurio de baja presión en una camisa de vidrio de cuarzo de temperatura regulada por agua.

La temperatura regulada de la lámpara se controló con un termostato de agua circulante por el exterior para hacer funcionar la lámpara a su rendimiento máximo UV-C. La temperatura de la ranura de cubeta se ajustó dentro del rango del límite cuántico definido del actinómetro de yoduro/yodato dado por Rahn (1997) y se controló con un criostato de agua circulante por el exterior. El obturador de la cámara se ajustó a un tiempo de exposición de 1 s y la precisión del obturador se determinó utilizando un fotodiodo conectado al enchufe del micrófono de una tarjeta de sonido de un ordenador. Se comprobó que el obturador mantenía un tiempo de exposición constante de 1,000 $\pm$ 0,002 s.

Para la determinación de la irradiancia efectiva en la ventana de entrada a la cubeta, la solución actinométrica de yoduro 0,6 M/yodato 0,1 M (Rahn 1997), que absorbe por completo todos los fotones incidentes, se dispuso en la cubeta de 0,2 mm y se expuso de forma gradual durante 1, 2 y 3 s en la ranura de cubeta de temperatura regulada, asegurando un límite cuántico constante. Antes de la exposición, la absorbancia del espectrofotómetro a 352 nm se puso a cero y, después de cada etapa de exposición, se midió el aumento de la absorbancia en el espectrofotómetro a 352 nm. Se calculó la concentración de triyoduro a partir del aumento de la absorbancia, la cantidad de fotones incidentes a partir del límite cuántico dependiente de la temperatura y la irradiancia E a partir de la energía fotónica y el área de sección transversal de la cubeta. Así, E (en mW/cm^2) se puede calcular a partir del aumento de absorbancia Δabs en el tiempo de exposición t (en s), la superficie de la cubeta A (en cm^2) y el volumen de la cubeta V (en l), el coeficiente de extinción ε en la longitud del recorrido d (264,5 para 0,01 cm), la energía W/einstein a 253,7 nm = 471528 J y el límite cuántico Φ = 0,7545 a 21ºC (Rahn 1997), de acuerdo con la fórmula $E = (\Delta abs \times V \times W \times 1000)/(\varepsilon \times A \times \Phi \times t)$. Por consiguiente, después de un tiempo de exposición de 1 s, un aumento de la absorbancia de 0,0392 corresponde a una irradiancia de 0,9262 mW/cm^2, después de 2 s acumulativos, el aumento de absorbancia acumulativo de 0,0781 corresponde a 0,9227 mW/cm^2 y, después de 3 s, un aumento de absorbancia acumulativo de 0,1170 corresponde a 0,9215 mW/cm^2. La irradiancia media fue de 0,9235 mW/cm^2 con una desviación estándar de 0,0020 mW/cm^2, demostrando una exposición muy precisa para calibración mediante el obturador de control electrónico.

Una solución dosimétrica correspondiente a una absorbancia UV-C de $a_{253,7}$ = 6,5/cm y una viscosidad de 1,16 cp se dispuso en una cubeta de 0,2 mm y se expuso en incrementos de 3 s hasta 75 s. Después de cada incremento de la exposición, se leyó el aumento de absorbancia a 367 nm con la solución no irradiada como valor blanco. El gráfico de calibración obtenido estaba en correlación con una ecuación de segundo orden donde la absorbancia a 367 nm depende de la fluencia de exposición H. abs (367 nm, 0,2 mm) = $A \times H^2 + B \times H + C$.

coeficiente	
A	-0,0000257179
B	0,0074523297
C	0,0006009852
correlación	
R^2	0,999986

Como se puede ver en el experimento 9, una correlación R^2 cercana a la unidad indica la precisión del gráfico de calibración registrado mediante un obturador de control electrónico. La ecuación de segundo orden tiene la ventaja adicional de que, para un valor de absorción determinado, por ejemplo en la medición de la tasa de dosis tal como se describe en el experimento 2, se puede calcular fácilmente una solución plausible de esta ecuación. Los gráficos de calibración también se pueden segmentar y esta ecuación de segundo orden se puede calcular para cada segmento con el fin de obtener una correlación R^2 lo más cercana posible a la unidad.

Experimento (ejemplo de la invención) 10: Determinación de una dosis suma de lámpara diana radiométrica dependiente de la absorción del reactor de 30 l mediante el uso combinado de dosimetría química y radiometría para asegurar un proceso sólido a prueba de fallos de la lámpara

El reactor de 30 l descrito en el experimento 5 y equipado con 9 lámparas conmutables de forma individual se calibró con 10 soluciones dosimétricas patrón diferentes y 4 lámparas ($a_{253,7}$ = 3/cm a 12/cm en incrementos de 1/cm, η = 1,15 cp) para determinar la tasa de dosis (en (mJ/cm^2)/min), la tasa de dosis de lámpara (en (mJ/cm^2)/min) y el tiempo de irradiación necesario para una dosis efectiva de 20 mJ/cm^2. La intensidad de la lámpara se controló con radiómetros electrónicos y se registró con un registrador gráfico, instalándose un contador de suma para sumar las señales de todos los radiómetros durante la irradiación. La tasa de dosis de lámpara se determinó como el aumento de la señal suma radiométrica con el tiempo de irradiación. Las magnitudes de la tasa de dosis de lámpara son mayores que las de la tasa de dosis química porque los sensores radiométricos reciben la luz UV prácticamente sin

que ésta sea atenuada por ningún medio que la absorba. El tiempo de irradiación para una dosis diana dada efectiva en la solución, por ejemplo 20 mJ/cm^2, se multiplica por la tasa de dosis de lámpara para calcular la dosis suma de lámparas como el parámetro de irradiación.

Coef. absorción $\alpha_{253,7}$ (1/cm)	Dosis suma de lámparas $H_{lámp}$ 20 mJ/cm^2
3	13393
4	18204
5	25230
6	29942
7	33770
8	38310
9	43704
10	48085
11	54620
12	60027

En la tabla se puede ver que la dosis suma de lámparas está en correlación según una relación lineal con la absorbancia, expresada mediante la fórmula $H_{lámp} = 5058,9 \times a_{253,7} - 1413$ con una correlación $R^2 = 0,9972$ cercana a la unidad. Por consiguiente, la dosis suma de lámpara dependiente de la absorbancia, que es en sí independiente de cualquier cambio de intensidad, es el parámetro ideal para lograr un proceso de irradiación sólido que asegure la aplicación de la dosis diana apropiada. El proceso de irradiación se controla mediante la dosis suma de lámparas radiométrica de tal modo que, cuando se llega a dicha dosis suma de lámparas predeterminada dependiente de la absorbancia, que se interpola para cada absorbancia en el rango de validación, las lámparas se apagan para finalizar la irradiación.

Experimento 11: Simulación de fallo de lámpara durante el proceso de irradiación controlado por la dosis suma de lámparas y demostración de la dosis diana aplicada correcta efectiva en la solución

Una solución modelo ($a_{253,7}$ = 8/cm, η = 1,15 cp) se irradió en el reactor de 30 l tal como se describe en el experimento 10. Se realizaron dos experimentos en los que, después de 10 minutos, se apagó una de las cuatro lámparas, que se sustituyó encendiendo una lámpara diferente o no se sustituyó, y la irradiación se continuó y finalizó únicamente con 3 lámparas. Las tasas de dosis se determinaron mediante dosimetría química y, cuando se alcanzó la dosis suma de lámparas $H_{lámp}$ = 39085 mJ/cm^2 calculada mediante la fórmula de calibración descrita en el ejemplo 11, las lámparas se apagaron y se tomó una muestra para determinar la dosis efectiva en la solución.

En el primer experimento, en el que después de 10 minutos la lámpara se sustituyó por otra lámpara, la dosis suma de lámparas se alcanzó después de 16 min 43 s y en la solución patrón se midió una dosis de 19,7 mJ/cm^2. En el segundo experimento, en el que no se sustituyó la lámpara, la dosis suma de lámparas se alcanzó después de 19 min 55 s y en la solución patrón se midió una dosis de 19,9 mJ/cm^2.

Las dosis efectivas medidas después del tiempo de irradiación necesario para alcanzar la dosis suma de lámparas predeterminada muestran que el proceso controlado por la dosis suma de lámparas es inalterable y sólido incluso en caso de fallo de una lámpara durante el proceso de irradiación, ya que la dosis suma de lámparas asegura la aplicación de la dosis efectiva correcta.

Referencias

Adhikari C, Nurakami EG, Koutchma T, Beecham T: Chemical actinometry in UV treated juices, http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/papter_11210.htm acceso 16 de diciembre de 2003

Alfano OM, Romero RL, Cassano AE: Modeling of radiation transport and energy absorption in photoreactors. Advances in Transport Processes 4 (1986), 201-273.

Alfano OM, Romero RL, Cassano AE: Radiation field modeling in photoreactors-I. homogeneous media. Chemical Engineering Science 41 (1986), 3:421-444.

Allan W, Diffey BL: A device for minimizing the risk of overexposure of patients undergoing phototherapy. Photodermatology, Photophysiology and Photomedicine 18 (2002), 199-201

Aznar JA, Molina R, Montoro JM: Factor VIII/von Willebrand factor complex in methylene blue-treated fresh plasma. Transfusion 39 (1999), 7:748-750.

Barnett RN, Fox RA, Snavely JG: Hepatitis following the use of irradiated human plasma. Journal of the American Medical Association 144 (1950), 226-228

Battigelli DA, Sobsey MD, Lobe DC: The inactivation of hepatitis A virus and other model viruses by UV irradiation. Water Science and Technology 27 (1993), 3/4:339-342.

Battisto JR, Pringle RB, Nungester WJ: The effect of UV irradiation on immune serum. Journal of Infectious Diseases 92 (1953), 85-88

Benesi E: Design of a centrifugal filmer for the ultraviolet irradiation of liquids. General Motors Engineering Journal 3 (1956), 2-8

Bering E, Meyer H: Methoden zur Messung der Wirksamkeit violetter und UV-Strahlenquellen (Methods for the measurement of the effectiveness of violet and ultraviolet radiation sources). Strahlentherapie 1 (1912), 189-207.

Bolton JR, Linden KG: Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. Journal of Environmental Engineering 129 (2003), 3: 209-215

Bolton JR: Ultraviolet principles and applications. EPA Newsletter 66 (1999), 9-36.

Bowen EJ: The chemical aspects of light, 2ª edición revisada, Oxford: Clarendon Press 1949

Braslavsky SE, Houk KN, Verhoeven JW: Glossary of terms used in photochemistry. Pure and Applied Chemistry 68 (1996), 2223-2286.

Brauer H-D, Schmidt R: A new reusable chemical actinometer for UV irradiation in the 248 - 334 nm range. Photochemistry and Photobiology 37 (1983), 5:587-591.

Brown TT. Laboratory evaluation of selected disinfectants as virucidal agents against porcine parvovirus, pseudorabies virus, and transmissible gastroenteritis virus. American Journal of Veterinary Research 42 (1981), 6:1033-1036.

Budowsky EI, Kostyuk GV, Kost AA, Savin FA: Principles of selective inactivation of viral genome. II. Influence of stirring and optical density of the layer to be irradiated upon UV-induced inactivation of viruses. Archives of Virology 68 (1981), 3-4:249-256.

Cabaj A, Sommer R, Schoenen D: Biodosimetry: model calculations for UV water disinfection devices with regard to dose distribution. Water Research 30 (1996), 4:1003-1009.

Cabaj A, Sommer R: Measurement of ultraviolet radiation with biological dosemeters. Radiation Protection and Dosimetry 91 (2000) 1-3:139-142.

Calvert JG, Rechen HJL: Precision actinometry at low light intensities with malachite green leucocyanide. Journal of the American Chemical Society 74 (20 de abril de 1952), 2101-2103.

Chin S, Jin R, Wang X-L, Hamman J, Marx G, Mou X, Andersson I, Lindquist L-O, Horowitz B: Virucidal treatment of blood protein products with UVC radiation. Photochemistry and Photobiology 65 (1997), 3:432-435.

Chin S, Williams B, Gottlieb P, Margolis-Nunno H, Ben-Hur E, Hamman J, Jin R, Dubovi E, Horowitz B: Virucidal short wavelength ultraviolet light treatment of plasma and factor VIII concentrate: protection of proteins by antioxidants. Blood 86 (1995), 11:4331-4336.

Claesson IM: The effect of ultraviolet light (I = 2537 A) on Helix pomatia hemocyanin and bovine serum albumin as studied by the changes in the ultraviolet spectrum and sedimentation behaviour. Arkiv för Kemi 10 (1956), 1:1-102

Cutler SS, Burbank B, y Marzullo ER: Hypocoagulability of certain irradiated plasmas. Journal of the American Medical Association 143 (1950), 1057-1059

Cutler SS, Burbank B, Farber E, Stem KG: Action of ultraviolet rays on fibrinogen. Plasma (Milano) 2 (1955), 285-295

Dainton FS, Sills SA : Use of nitrous oxide to discriminate between various forms of hydrogen atoms existing in aqueous solutions of potassium iodide irradiated with ultraviolet light. Nature 186 (11 de junio de 1960):879

Di Benedetto C, Farhat N, Cioffi LA: Effetti delle radiazioni sul fibrinogeno. III. Elettroforesi su carta e tromboelastografia di fibrinogeno irradiato con U. V. (Radiation effects on fibrinogen. III. Paper electrophoresis and thromboelastography of UV-irradiated fibrinogen). Bolletino della Societa Italiana Biologica Sper 39 (1963), 2058-2061.

Di Benedetto C, Santamaria R, Cioffi LA: Effetti delle radiazioni sul fibrinogeno. V. Elettroforesi in fase libera e tromboelastografia di fibrinogeno irradiato con U. V. (Radiation effects on fibrinogen. V. Free-phase electrophoresis and thromboelastography of UV-irradiated fibrinogen). Bolletino della Societa Italiana Biologica Sper 39 (1963), 2064-2067.

Di Benedetto C, Santamaria R, Cioffi LA :. Effetti delle radiazioni sul fibrinogeno. IV. Elettroforesi su gel di amido e tromboelastografia di fibrinogeno irradiato con U. V. (Radiation effects on fibrinogen. IV. Amide gel electrophoresis and thromboelastography of UV-irradiated fibrinogen). Bolletino della Societa Italiana Biologica Sper 39 (1963), 2061-2064.

Dichtelmüller H, Rudnick D, Breuer B, Gänshirt KH: Validation of virus inactivation and removal for the manufacturing procedure of two immunoglobulins and a 5 % serum protein solution treated with beta-propiolactone. Biologicals 21 (1993), 3:259-268.

Dichtelmüller H, Stephan W, Prince AM, Gürtler L, Deinhardt F: Inactivation of HIV in plasma derivatives by betapropiolactone and UV-irradiation. Infection 15 (1987), 5:367-369.

Dichtelmüller H, Stephan W: Kontrolle von Sterilisationsverfahren for Plasmaderivate mit Bakteriophagen. (Check of sterilization procedures for plasma derivatives by the use of bacteriophages). Immunität und Infektion 16 (1988), 1:18-20.

Engelhard H, Eikenberg K-R: Über die Einwirkung von ultraviolettem Licht auf Serum-Albumin. Zeitschrift für Naturforschung 10b (1955), 622-631

Erdmann K: Versuche zur Aufhebung der koagulierenden Wirkungen von ultraviolettem Licht und von Röntgenstrahlen auf Euglobulin mit Strahlen-Schutzstoffen (Experiments on the inhibition of the coagulating action of ultraviolet light and of x-rays on euglobulin by radiation-protecting substances). Protoplasma 45 (1956), 3:293-314.

Favaro G. Actinometry: concepts and experiments. In: Drugs: Photochemistry and Photostability, Special Publications of the Royal Society of Chemistry 225 (1998), 295-304.

Fisher GJ, LeBlanc JC, Johns HE: A calorimetric determination of the quantum yield for the ionization of malachite green cyanide by ultraviolet radiation. Photochemistry and Photobiology 6 (1967), 757-767.

Forney LJ y Pierson JA. Optimum photolysis in Taylor-Couette flow. American Institute of Chemical Engineers Journal 49 (2003) 3: 727-733

Frösner GG, Stephan W, Dichtelmüller H: Inactivation of hepatitis A virus added to pooled human plasma by betapropiolactone treatment and ultraviolet irradiation. European Journal of Clinical Microbiology 2 (1983), 4:355-357

Gauglitz G, Hubig S: Azobenzene as a convenient actinometer: evaluation values for UV mercury lines and for the N2 laser lines. Journal of Photochemistry 15 (1981), 255-257.

Gauglitz G, Hubig S: Chemical actinometry in the UV by azobenzene in concentrated solution: a convenient method. Journal of Photochemistry 30 (1985), 121-125.

Gauglitz G, Hubig S: Photokinetische Grundlagen moderner chemischer Aktinometer (Photokinetic bases of modern chemical actinometers). Zeitschrift für Physikalische Chemie, Neue Folge 139 (1984), 237-246.

Gauglitz G. Modem chemical actinometry. EPA Newsletter (noviembre de 1983), 49-53.

Gelzhäuser P: Desinfektion von Trinkwasser durch UV-Bestrahlung (Disinfection of drinking water by UV-irradiation). Sindelfingen: Editorial Expert, 1985.

Habel K, Sockrider BT: A continuous flow method of exposing antigens to ultraviolet radiation. Journal of Immunology 56 (1947), 273-279.

Hackradt A: Kolorimetrische Dosierung künstlicher Lichtquellen (Kromayersche Quarzlampe und Höhensonne) mittels des Autenried-Königsbergerschen Kolorimeters (Colorimetric dosimetry of artificial light sources (Kromayer's quartz lamp and sun tan lamp) by use of the Autenried-Königsberg colorimeter). Strahlentherapie 10 (1920), 1137-1144.

Hackradt A: Über die kolorimetrische Ausdosierung kunstlicher Lichtquellen auf Grund der Zersetzung einer Jodwasserstofflösung (About the colorimetric dosimetry of artificial light sources based on the decomposition of aqueous hydrogen iodide). Strahlentherapie 12 (1922), 843-845.

Harris RE, Coleman PH, Morahan PS: Stability of Minute Virus of Mice to chemical and physical agents. Applied Microbiology 28 (1974), 3:351-354.

Hart H, Reid K, Hart W: Inactivation of viruses during ultraviolet light treatment of human intravenous immunoglobulin and albumin. Vox Sanguinis 64 (1993), 2:82-88.

Hartman FW, Kelly AR, LoGrippo GA: Four year study concerning the inactivation of viruses in blood and plasma. Gastroenterology 28 (1955), 244-256.

Havelaar AH, Nieuwstad TJ, Meulemans CCE, van Olphen M; F-specific RNA bacteriophages as model viruses in UV disinfection of wastewater. Water Science and Technology 24 (1991), 2:347-352.

Heidt LJ, Boyles HB: Influence of several variables encountered in photochemical work upon the intensity of wavelength 254 mP produced by a quartz mercury vapor lamp of the low pressure type operating in water at 0 - 95 °C. Journal of the American Chemical Society 73 (1951):5728-5731

Heinrich D, Kotitschke R, Berthold H: Clinical evaluation of the hepatitis safety of a beta-propiolactone/ultraviolet treated factor IX concentrate (PPSB). Thrombosis Research 28 (1982), 1:75-83.

Heinrich D, Sugg U, Brackmann HH, Stephan W, Lissner R: Virus safety of beta-propiolactone treated plasma preparations: clinical experiences. Development in Biological Standardization 67 (1987), 311-317.

Hellbrügge TF, Marx R: Elektrophoretische und gerinnungsphysiologische Untersuchungen an UV-bestrahltem Plasma und Plasmafraktionen (electrophoretic and coagulation physiological investigations on UV irradiated plasma and plasma fractions). Medizinische Monatsschrift 6 (1952), 1: 30-36

Henzler H-J, Raiser K. Avoiding viral contamination in biotechnological and pharmaceutical processes. Nature Biotechnology 16 (1998), 11: 1077-1.079

Ijichi K, Hammerle OA, Lineweaver H, Kline L: Effect of ultraviolet irradiation of egg liquids on Salmonella destruction and performance quality with emphasis on egg white, Food Technol. 18 (1964), 124 (1628)-128 (1632)

James G, Korns RF, Wright AW: Homologous serum jaundice associated with the use of irradiated human plasma. Journal of the American Medical Association 144 (1950), 228-230

Kallenbach NR, Cornelius PA, Negus D, Montgomerie D, Englander S: Inactivation of viruses by ultraviolet light. In: Morgenthaler J-J. (ed.): Virus inactivation in plasma products, Current Studies in Hematology and Blood Transfusion 56 (1989), 70-82.

Kirk AD, Namasivayam C: Errors in ferrioxalate actinometry. Analytical Chemistry 55 (1983), 2428-2429.

Kleczkowski A, Gold AH: Effects of ultraviolet radiation on antigenicity of horse serum albumin: formation of new determinants. Photochemistry and Photobiology 1 (1962), 299-304

Kleczkowski A: Inactivation of antibodies by ultraviolet radiation. British Journal of Experimental Pathology 35 (1954), 402-413

Kleim J-P, Bailly E, Schneweis KE, Brackmann HH, Hammerstein U, van Loo B, Oldenburg J: Acute HIV-1 infection in patients with hemophilia B treated with beta-propiolactone-UV-inactivated clotting factor. Thrombosis and Haemostasis 64 (1990), 2:336-337.

Koutchma T, Adhikari C: Effectiveness of the UV disinfection of juice. IUVA News 4 (2002), 5: 21-23.

Kryschi R, Gürtler KR, Perkampus H-H: Photochemische Bestimmung der Strahlungsleistung von UV-Strahlern für die Wasserdesinfektion (Photochemical determination of the UV-sources' radiant power for water disinfection). Vom Wasser 70 (1988), 197-207.

Kuhn HJ, Braslavsky SE, Schmidt R: Chemical actinometry. Pure & Applied Chemistry 61 (1989) 2:187-210.

Kupfer B, Oldenburg J, Brackmann HH, Matz B, Schneweis KE, y Kaiser R: Beta-propiolactone UV inactivated clotting factor concentrate is the source of HIV-infection of 8 hemophilia B patients: confirmed. Thrombosis and Haemostasis 74 (1995), 5:1386-1387.

Kurth J, Waldmann R, Heith J, Mausbach K, Burian R: Efficient inactivation of viruses and mycoplasma in animal sera using UVC irradiation. In: Brown F, Cartwright T, Horaud F, Spieser JM (eds.): Animal sera, animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of pharmaceuticals: viral safety and regulatory aspects, Development in Biological Standardization (Karger, Basel) 99 (1999), 111-118.

Lankford KV, Mosunjac M, Hillyer CD: Effects of UVB irradiation on cytokine generation, cell adhesion molecules, and cell activation markers in T-lymphocytes and peripheral blood HPCs. Transfusion 40 (2000), 3:361-367.

Larin NM: Effect of ultraviolet irradiation on electrophoretic properties of serum protein. Nature 181 (4601 (4 de enero de 1958)): 65

Latarjet R, Wahl R : Precisions sur l'inactivation des Bacteriophages par les rayons ultraviolets (Details about the inactivation of bactériophages by ultraviolet rays). Annales de l'Institut Pasteur 71 (1945), 336-339.

Latarjet R., Morenne P, Berger R: Un appareil simple pour le dosage des rayonnements ultraviolets émis par les lampes germicides (A simple apparatus for the dosage of ultraviolet radiation emitted by germicidal lamps). Annales de l'Institut Pasteur 85 (1953), 174 - 184

Launer HF, Hammerle OA: UV dosage measurement in a geometrically complex system with light-sensitive paper. Quantum yield for Salmonella kill in egg white. Photochemistry and Photobiology 4 (1965), 2: 265-267

Mark G, Schuchmann MN, Schuchmann HP, von Sonntag C: The photolysis of potassium peroxodisulphate in aqueous solution in the presence of tert-butanol: a simple actinometer for 254 nm radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 55 (1990), 157-168.

Martin CJ, Pye SD: A study of the directional response of ultraviolet radiometers: II. Implications for ultraviolet phototherapy derived from computer simulations. Physics in Medicine and Biology 45 (2000), 9:2713-2729

Marx G, Miou X, Freed R, Ben-Hur E, Yang C, Horowitz B: Protecting fibrinogen with rutin during UVC irradiation for viral inactivation. Photochemistry and Photobiology 63 (1996), 4:541-546.

McCall KB, Gordon FH, Bloom FC, Hyndman LA, Taylor HL, Anderson HD: Methods for the preparation and ultraviolet irradiation of human fibrinogen for intravenous use. Journal of the American Pharmaceutical Association, Scientific Edition 46 (1957), 5:295-298.

McLean IW Jr., Taylor AR: Experiences in the production of poliovirus vaccines. Progress in Medical Virology 1 (1958), 122-164

Milzer A, Oppenheimer F, Levinson SO: A new method for the production of potent inactivated vaccines with ultraviolet irradiation. Journal of Immunology 50 (1945), 331-340.

Moroson H, Gregoriades A: A sensitive chemical actinometer for ultraviolet radiation. Nature 204 (14 de noviembre de 1964) 676-678.

Morowitz HJ: Absorption effects in volume irradiation of microorganisms. Science 111 (1950), 229-230.

Murray R, Oliphant JW, Tripp JT, Hampil B, Ratner F, Diefenbach WCL, Geller H: Effect of ultraviolet radiation on the infectivity of icterogenic plasma. Journal of the American Medical Association 157 (1955), 1:8-14

Neefe JR: Viral hepatitis: problems and progress. Annals of Internal Medicine 31 (1949), 857-870

Oliphant JW, Hollaender A: Homologous serum jaundice: experimental inactivation of etiologic agent in serum by ultraviolet irradiation. Public Health Reports 61 (1946), 17:598-602.

Oppenheimer F, Benesi E, Taylor AR: The ultraviolet irradiation of biological fluids in thin-flowing films. American Journal of Public Health 49 (1959), 7:903-923.

Pamphilon DH: The treatment of blood components with ultraviolet-B irradiation. Vox Sanguinis 74 (Suppl. 2) (1998), 15-19.

Prince AM, Stephan W, Brotman B. Inactivation of non-A, non B virus infectivity by a beta-propiolactone/ultraviolet irradiation treatment and aerosil adsorption procedure used for preparation of a stabilized human serum. Vox Sanguinis 46 (1984): 2:80-85.

Prince AM, Stephan W, Brotman B: Beta-propiolactone/ultraviolet irradiation: a review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivatives. Reviews of infectious diseases 5 (1983), 1:92-106.

Proctor WR, Cook JS, Tennant RW: Ultraviolet photobiology of Kilham rat virus and the absolute ultraviolet photosensitivities of other animal viruses: influence of DNA strandedness, molecular weight, and host cell repair. Virology 49 (1972) 368-378.

Prodouz KN, Fratatoni JC, Boone EJ, Bonner JF: Use of laser-UV for inactivation of virus in blood products. Blood 70 (1987), 2:589-592.

Pustoslemsek P, Kloft M, Kotitschke R: Biotest-Stellungnahme zur HIV-1-Serokonversion von 1990 an elf Patienten, die mit beta-Propiolacton/UV virusinaktiviertem PPSB behandelt wurden (Biotest statement to the HIV-1 seroconversion of 11 patients in 1990, who were treated with beta-propiolactone/UV-inactivated PPSB). Infusionstherapie und Transfusionsmedizin 20 (1993), 6:344-346.

Pye SD, Martin CJ: A study of the directional response of ultraviolet radiometers: I. Practical evaluation and implication for ultraviolet measurement standards. Physics in Medicine and Biology 45 (2000), 9:2701-2712

Qualls RG, Johnson JD: Bioassay and dose measurement in UV disinfection. Applied and Environmental Microbiology 45 (1983), 3:872-877.

Rahn RO, Stefan MI, Bolton JR, Goren E, Shaw P-S, Lykke KR: Quantum yield of the iodide/iodate chemical actinometer: dependence on wavelength and concentration. Photochemistry and Photobiology 78 (2003), 2:146-152

Rahn RO, Xu P, Miller SL: Dosimetry of room-air germicidal (254 nm) radiation using spherical actinometry. Photochemistry and Photobiology 70 (1999), 3:314-318

Rahn RO: Potassium iodide as a chemical actinometer for 254 nm radiation: use of iodate as an electron scavenger. Photochemistry and Photobiology 66 (1997), 4:450-455

Rahn RO: Use of potassium iodide as a chemical actinometer. Photochemistry and Photobiology 58 (1993), 6: 874-880

Rideal EK, Roberts R: The photochemistry of native proteins. Proceedings of the Royal Society A 205 (1951), 391-408

Rommelaere J, Vos JM, Cornelis JJ, Ward DC: UV-enhanced reactivation of minute-virus-of-mice: stimulation of a late step in the viral life cycle. Photochemistry and Photobiology 33 (1981), 6:845-854.

Schenck HJ, Simak P, Haedicke E: Structure of polyvinylpyrrolidone-iodine (povidone-iodine). Journal of Pharmaceutical Science 68 (1979), 12:1505-1509.

Schulz CR, Cervantes P, y Laplace C: Development of a flow-through actinometry monitor for dose measurements in UV disinfection reactors. Conference Prooceedings (on CD-ROM) of the International Ultraviolet Association's 1st International Congress on Ultraviolet Technologies, Washigton DC, 15 - 16 de junio de 2001.

Sczechowskii JG, Koval CA, Noble RD: A Taylor vortex reactor for heterogeneous photocatalysis. Chemical Engineering Science 50 (1995), 20: 3163-3173

Setlow R y Boyce R. The ultraviolet light inactivation of Phi-X 174 bacteriophage at different wave lengths and pHs. Biophysical Journal 1 (septiembre de 1960), 29-41.

Smolens J, Stokes J. Combined use of ultraviolet irradiation and beta-propiolactone sterilization of serums infected with a virus. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 86 (1954), 538-539.

Sommer R, Pribil W, Appelt S, Gehringer P, Eschweiler H, Leth H, Cabaj A, Haider T: Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation: a comparative approach. Water Research 35 (2001), 13:3109-3116.

Stephan W, Kotitschke R, Prince AM, Brotman B: Long-term tolerance and recovery of beta-propiolactone/ultraviolet (ß-PL/UV) treated PPSB in chimpanzees. Thrombosis und Haemostasis (Stuttgart) 46 (1981), 2:511-514.

Stephan W. Fractionation of cold-sterilized plasma. A new concept in production of non-infectious plasma proteins. Arzneimittel-Forschung/Drug Research 32 (II) (1982), 8:799-801.

Stephan W: Activity and storage stability of proteins in a hepatitis-free human serum preparation. Arzneimiftel-Forschung/Drug Research 32 (II) (1982), 8:802-806.

Stephan W: Inactivation of hepatitis viruses and HIV in plasma and plasma derivatives by treatment with betapropiolactone/UV irradiation, in: Morgenthaler J-J. (ed.): Virus inactivation in plasma products, Current Studies in Hematology and Blood Transfusion 56 (1989), 122-127.

Suhrmann R, Kollath W: Quantitative Messungen im sichtbaren und ultravioletten Absorptionsspektrum des Blutes und seiner Bestandteile. Zweiter Teil: Plasma und Serum (Quantitative measurements in the visible and ultraviolet absorption spectrum of blood and ist components. Part two: plasma and serum). Strahlentherapie 27 (1928), 572-586.

Taylor AR, Kay WW, McLean IW Jr., Oppenheimer F, Stimpert FD: Effect of ultraviolet light on poliomyelitis virus. Journal of Immunology 78 (1957), 45-55

Taylor AR, Kay WW, Timm EA, Hook AE, y McLean IW Jr. Inactivation of poliomyelitis virus for the preparation of vaccines. I. Formalin and ultraviolet irradiation. Journal of Immunology 79 (1957), 265-275

Taylor AR, Sharp DG, Beard D, Finkelstein H, Beard JW. Influence of ultraviolet light on equine encephalomyelitis virus proten (eastern strain). Journal of Infectious Diseases 69 (1941), 224-231

Taylor AR: Effects of nonionizing radiations on animal viruses. Annals of the New York Academy of Sciences 83 (13 de enero de 1960), 670-683

Taylor DK, Anstey AV, Coleman AJ, Diffey BL, Farr PM, Ferguson J, Ibbotson S, Langmack K, Lloyd JJ, McCann P, Martin CJ, Menagé HDP, Moseley H, Murphy G, Pye SD, Rhodes LE, Rogers S: Guidelines for dosimetry and calibration in ultraviolet radiation therapy: a report of a British Photodermatology Group workshop. British Journal of Dermatology 146 (2002) 5:755-763

Ternovoi KS, Bondar W, Butylin YP, Kondratenko PA, Kurik MV, Sakun YM: (An actinometric method for comparing the parameters of equipment for the ultraviolet irradiation of the blood). Meditsinkaia Tekhnika 4 (1988), 16-19.

Vincze L, Kemp TJ, Unwin PR: Flow actinometry in a thin-film reactor: modeling and measurements. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 123 (1999), 7-13.

von Sonntag J: The influence of solute absorbance in laser flash photolysis-actinometry in experiment and theory at non-vanishing absorbance. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 126 (1999), 1-5.

Wright HB y Sakamoto G: UV Dose required to achieve incremental log inactivation of bacteria, viruses, and protozoa. Trojan Technologies, London ON/Canada, 2001. Document accessible at the IUVA members' internet website: http://www.iuva.org/MemberZone/Downloads/UV%20Dose%20Table%20Rev%20Se pt[1]. %2012%202001.doc

Yokota T, Suzuki S: Estimation of light absorption rate in a tank type photoreactor with multiple lamps inside, Journal of Chemical Engineering of Japan, 28 (1995), 3: 300-305

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar una dosis efectiva de luz monocromática o policromática de una o más fuentes luminosas en un reactor de irradiación luminosa para inactivar microorganismos en un fluido biológico, que comprende medir el efecto de la luz monocromática o policromática en una solución dosimétrica que adapta la absorbancia y la viscosidad del fluido biológico a las longitudes de onda de fotoinactivación utilizadas en base a una calibración de la dosis de luz, mediante i) irradiación de dicha solución dosimétrica en una capa de longitud de camino óptico lo suficientemente delgada para absorber sólo una fracción de la luz incidente con una irradiancia definida predeterminada durante un tiempo determinado para aplicar una dosis de luz determinada, conduciendo a un cambio mensurable en un fotoproducto, y ii) lectura de la dosis correspondiente al cambio en dicho fotoproducto durante o después de la irradiación luminosa de dicha solución dosimétrica en dicho reactor de irradiación luminosa, ejecutándose el paso i) antes del paso ii) y seleccionándose el fluido biológico de entre el grupo consistente en fluidos que comprenden sobrenadante de cultivo celular procariota, sobrenadante de cultivo celular eucariota, lisado celular procariota, lisado celular eucariota, sangre, plasma, fracciones de plasma, suero y fluidos derivados de sangre, plasma y suero, comprendiendo la solución dosimétrica un actinómetro de yoduro de potasio-yodato de potasio/polivinilpirrolidona diluido.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque adicionalmente incluye la inactivación de microorganismos en dicho fluido biológico mediante irradiación del fluido biológico con la dosis efectiva determinada de luz monocromática o policromática procedente de una o varias fuentes luminosas.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque a lo largo de la longitud del camino óptico se absorbe el 100% o menos de la irradiancia incidente.

4. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque a lo largo de la longitud del camino óptico se absorbe un 50% o menos de la irradiancia incidente.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque adicionalmente incluye la determinación de la distribución de dosis mediante titulación de la cantidad de microorganismos viables antes y después o antes, durante y después de irradiar dicho fluido biológico sembrado antes o durante o antes y durante la irradiación con los microorganismos viables.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque adicionalmente incluye el control de la intensidad de una o más fuentes luminosas durante dicha irradiación para determinar una osis de irradiación.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la luz está en el rango UV.

8. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque dichos microorganismos consisten en virus de ácido nucleico monocatenario lineal o circular seleccionados de entre el grupo consistente en virus Parvoviridae, Parvovirus Canino (CPV), Parvovirus Bovino (BPV), Parvovirus Porcino (PPV), Parvovirus Felino (FPV), virus Circoviridae, virus Circinoviridae, virus Picornaviridae, Virus de la Encefalomiocarditis (EMV), virus de ARN Enteroviridae, bacteriófagos de ADN Microviridae y bacteriófagos de ARN Leviviridae.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el reactor es un reactor de fotoinactivación por lotes con agitación.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, cuando dependen de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho fluido biológico comprende al menos un aditivo para reducir daños y pérdida de actividad biológica de dicho fluido.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, cuando dependen de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho método se lleva a cabo junto con al menos otro método de esterilización o de inactivación de microorganismos.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, cuando dependen de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho método se lleva a cabo con un tratamiento con disolvente detergente.

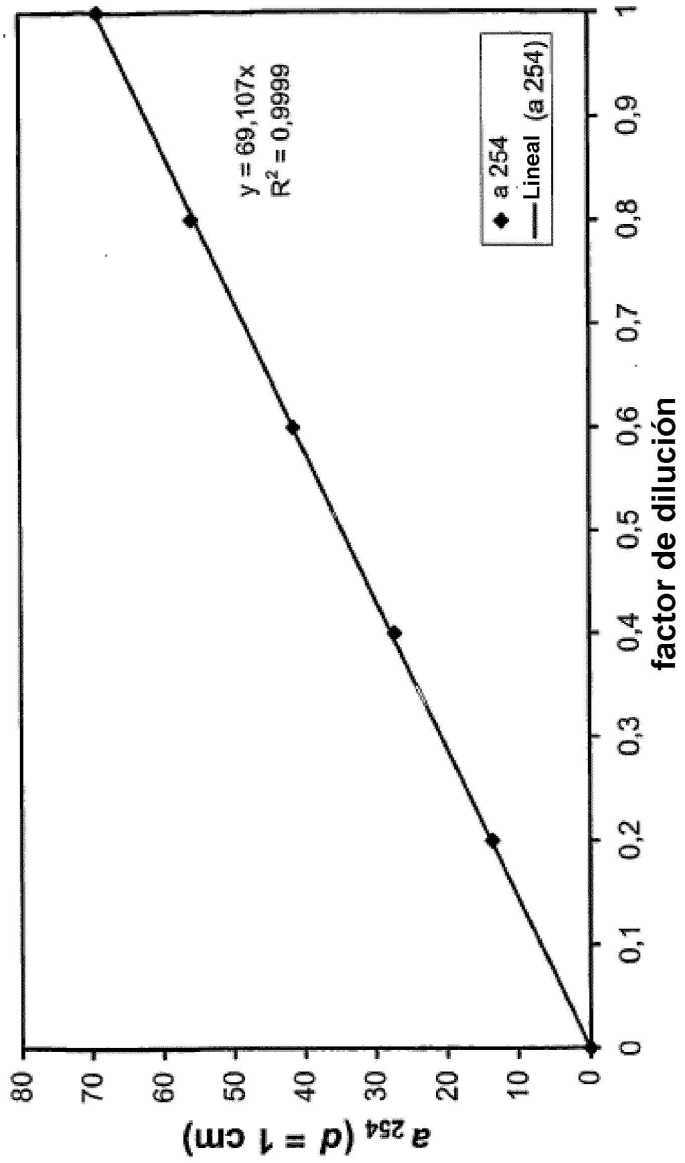

y = 69,107x
R² = 0,9999
a 254
Lineal (a 254)
a254 (d = 1 cm)
factor de dilución
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1

Fig. 1

Fig. 2

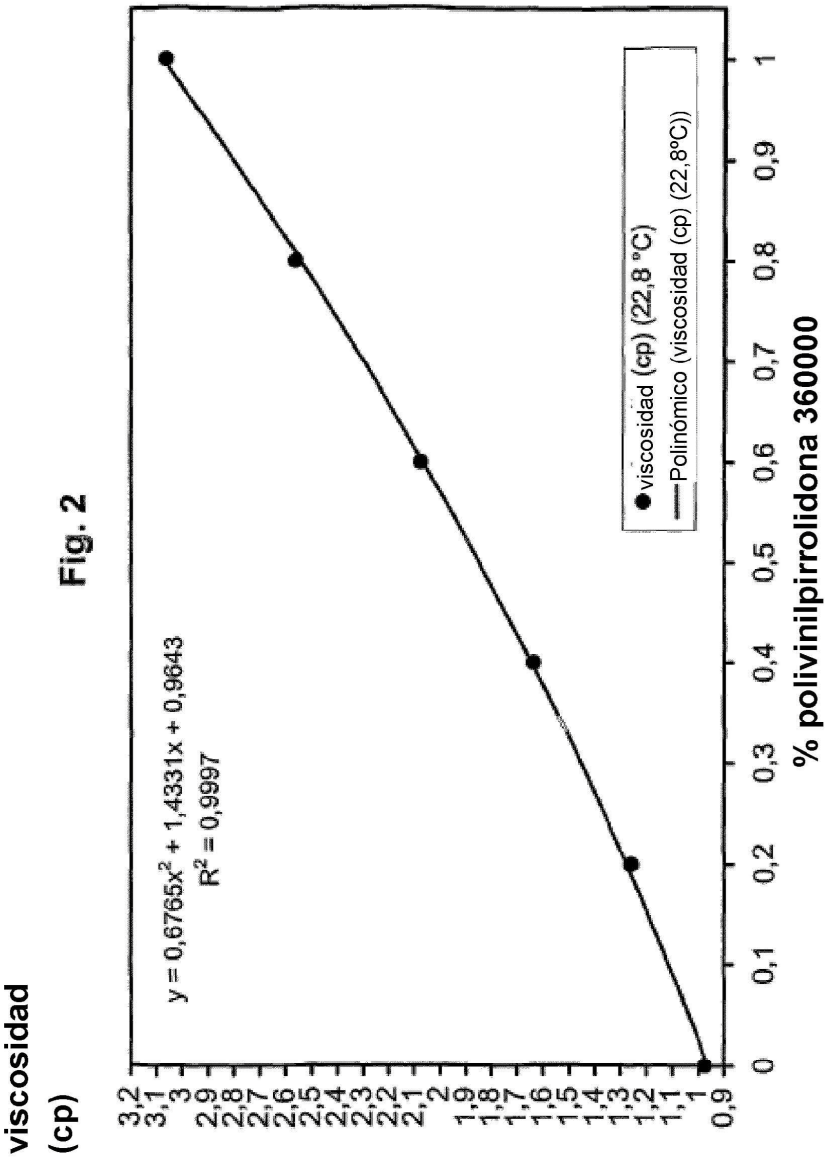

viscosidad (cp)
y = 0,6765x² + 1,4331x + 0,9643
R² = 0,9997
viscosidad (cp) (22,8 °C)
Polinómico (viscosidad (cp) (22,8°C))
% polivinilpirrolidona 360000

Fig. 3

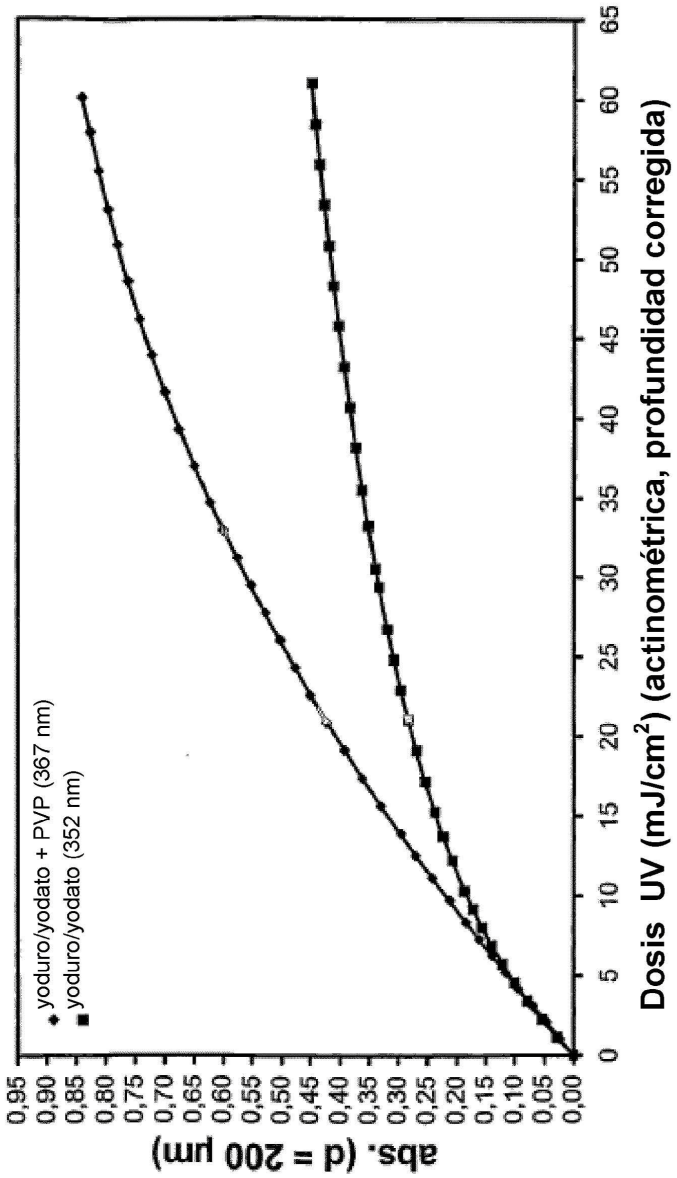

abs. (d = 200 µm)
0,95
0,90
0,85
0,80
0,75
0,70
0,65
0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
Dosis UV (mJ/cm2) (actinométrica, profundidad corregida)
yoduro/yodato + PVP (367 nm)
yoduro/yodato (352 nm)

Fig. 4

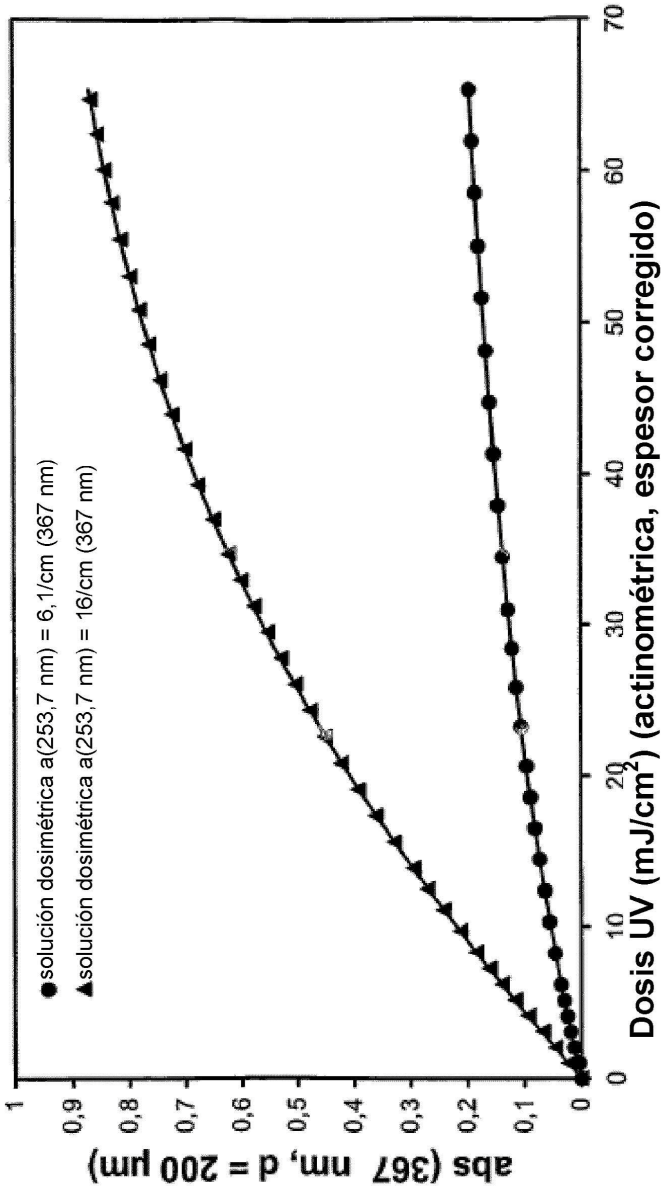

abs (367 nm, d = 200 µm)
Dosis UV (mJ/cm²) (actinométrica, espesor corregido)
solución dosimétrica a(253,7 nm) = 6,1/cm (367 nm)
solución dosimétrica a(253,7 nm) = 16/cm (367 nm)
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1
0
10
20
30
40
50
60
70

Fig. 5

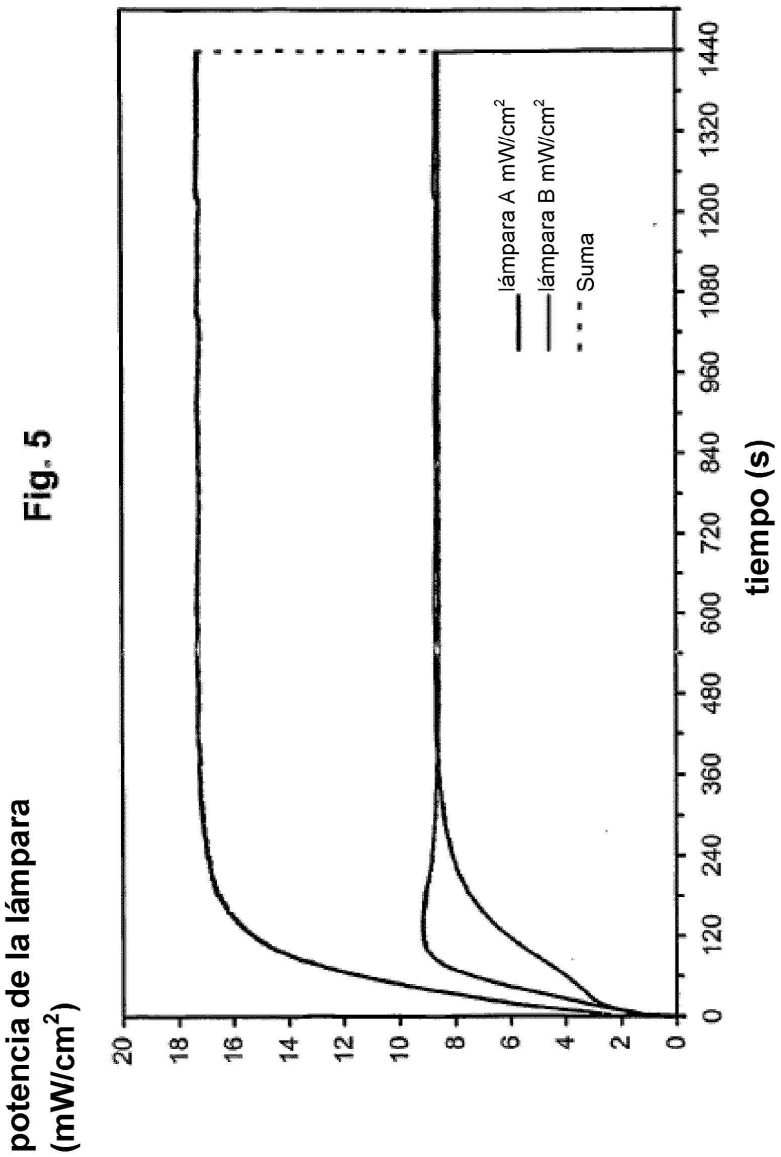

potencia de la lámpara (mW/cm²)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
120
240
360
480
600
720
840
960
1080
1200
1320
1440
tiempo (s)
lámpara A mW/cm²
lámpara B mW/cm²
Suma

Fig. 6

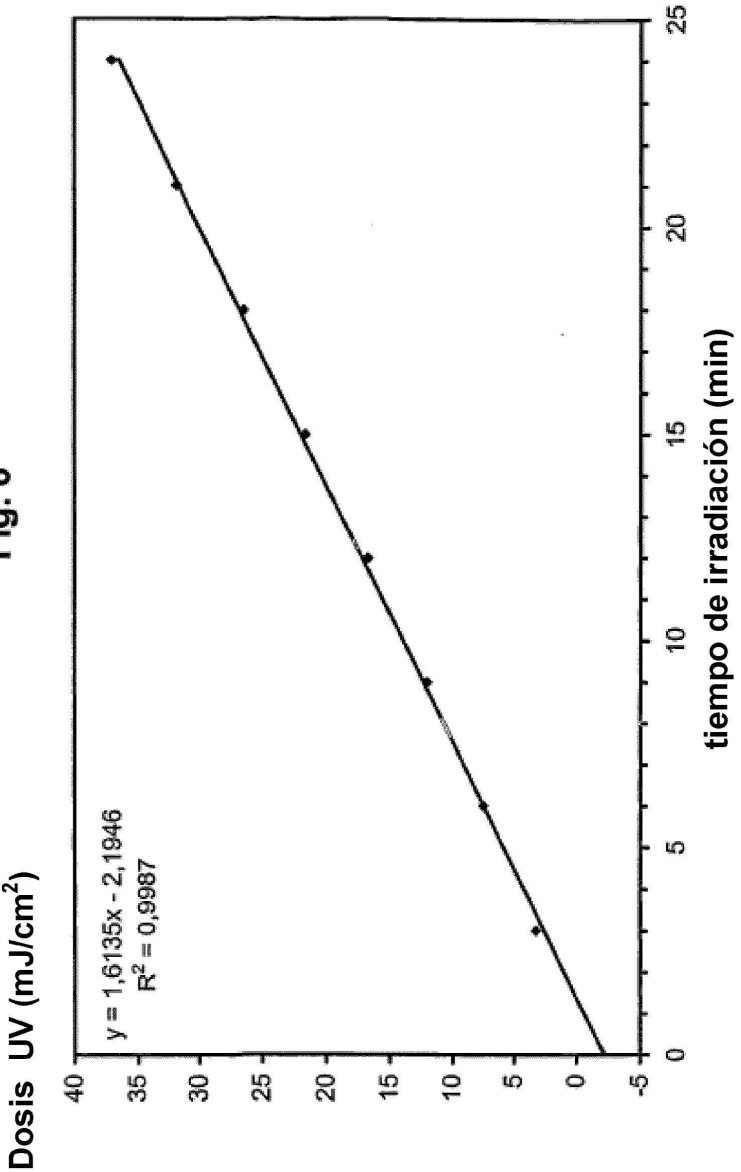
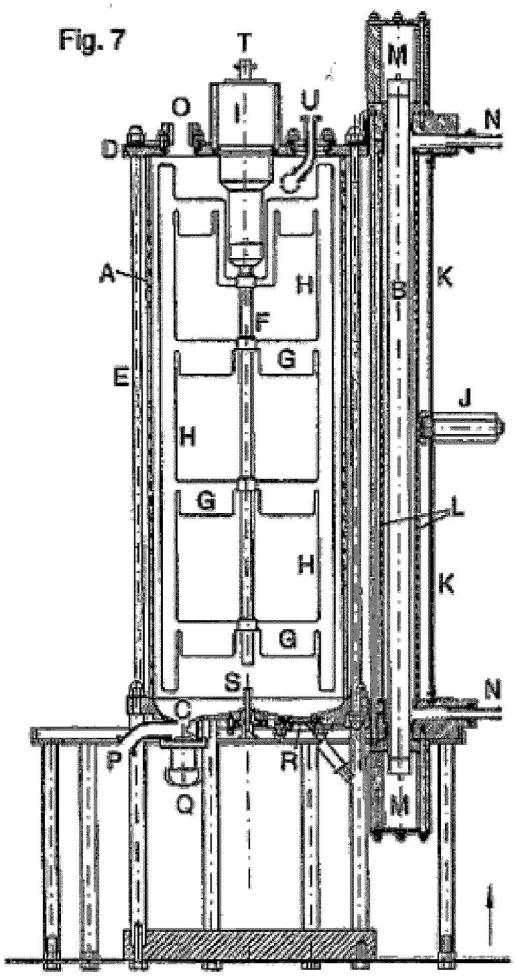

Dosis UV (mJ/cm²)
tiempo de irradiación (min)
y = 1,6135x - 2,1946
R² = 0,9987
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
0
5
10
15
20
25

Fig. 7



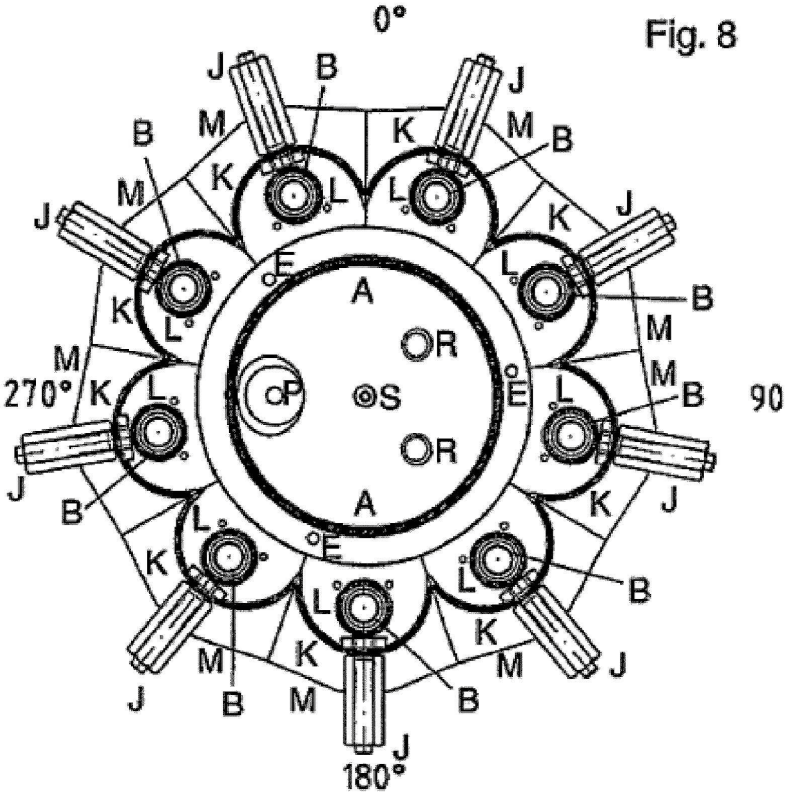


Fig. 8

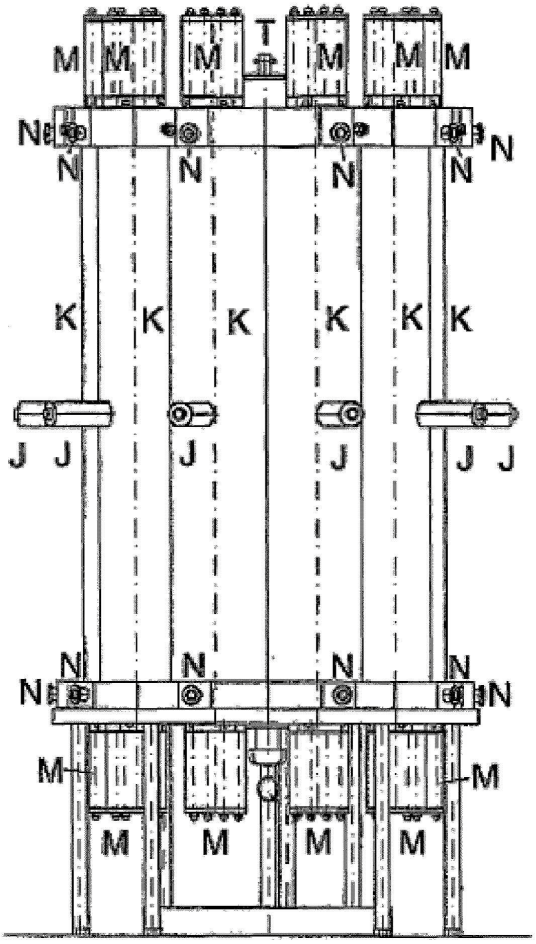


Fig. 9

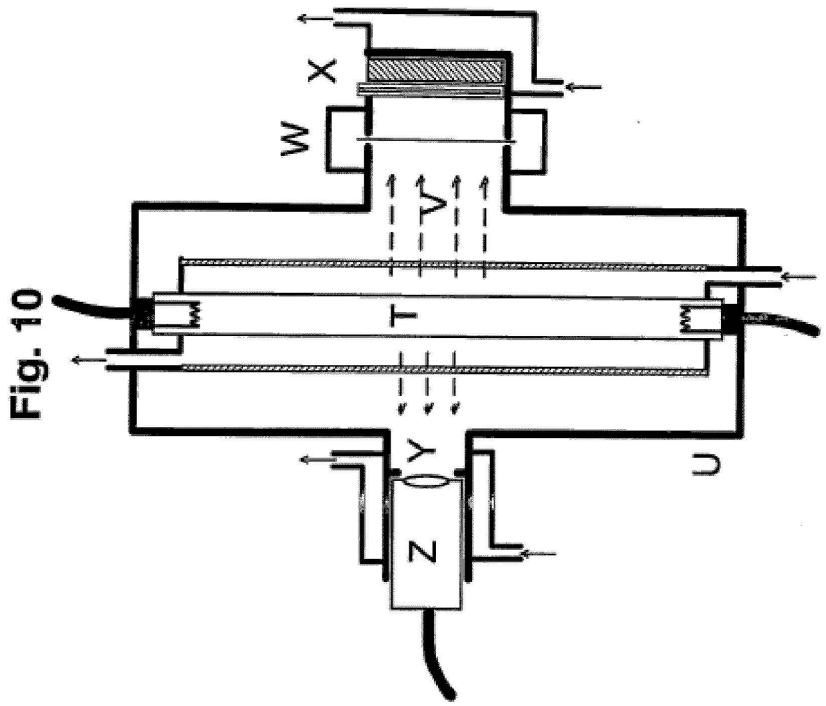


Fig. 10