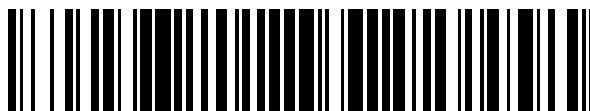


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 975**

51 Int. Cl.:

A61L 2/20 (2006.01)

A61L 2/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2011** **E 11776585 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2629806**

54 Título: **Proceso para tratamiento de ácidos nucleicos residuales presentes en la superficie de materiales consumibles de laboratorio**

30 Prioridad:

19.10.2010 FR 1058516

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.12.2015

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US

72 Inventor/es:

PRESSEL, MARIE y
METZ, DIDIER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 553 975 T3

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

Proceso para tratamiento de ácidos nucleicos residuales presentes en la superficie de materiales consumibles de laboratorio

5 La presente invención se refiere a un proceso para tratamiento de los ácidos nucleicos residuales presentes en la superficie de materiales consumibles, más particularmente materiales consumibles de laboratorio, en particular tubos y filtros utilizados en los experimentos para amplificación de muestras de DNA o RNA.

Esta invención tiene como objetivo abordar, más particularmente, el problema planteado por la amplificación específica o inespecífica de los ácidos nucleicos residuales presentes en la superficie de dichos materiales consumibles, en las técnicas de implementación que utilizan reacciones en cadena de polimerasa (PCR) o reacciones de amplificación mediada por transcripción (TMA).

Estos ácidos nucleicos residuales provienen generalmente de los entornos, pueden estar presentes en forma libre, o bien estar contenidos en células vivas tales como microorganismos, virus o protozoos.

Preámbulo

15 Las reacciones de amplificación de ácido nucleico consisten en una sucesión de reacciones enzimáticas que implican la acción de una polimerasa que hace posible la síntesis de nuevas moléculas de ácido nucleico a partir de una secuencia de ácido nucleico presente inicialmente en el medio de reacción.

La finalidad de estas reacciones enzimáticas es generalmente generar copias de la misma secuencia de ácido nucleico presente inicialmente en pequeña cantidad en una muestra. Las amplificaciones utilizadas más frecuentemente son las que implican reacciones sucesivas de polimerización o transcripción, tales como PCR y TMA. Tales métodos están ampliamente descritos y son bien conocidos por las personas expertas en la técnica. Utilizando cebadores específicos, dichos métodos hacen posible la copia de la misma secuencia de ácido nucleico un número muy elevado de veces sobre la base de un solo molde de DNA o RNA.

En tales reacciones, es la secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados para iniciar la reacción de polimerización lo que determina qué secuencia de ácido nucleico va a ser amplificada.

25 Las secuencias de ácido nucleico obtenidas por las reacciones de amplificación son útiles en numerosas aplicaciones en el campo de la biología molecular, tales como la clonación de genes, la diagnosis de enfermedades genéticas, o la detección de virus o microorganismos ([Vosberg, H.P., (1989) The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids, *Hum Genet.* 83(1): 1-15].

30 Según las condiciones en las que se llevan a cabo las reacciones enzimáticas, en particular el grado de severidad utilizado (concentración de sales y temperatura de hibridación), es posible amplificar secuencias de DNA o RNA cuya secuencia es más o menos idéntica a la que se desea amplificar.

Para obtener una amplificación muy específica de una secuencia dada, es decir para direccionar exclusivamente ácidos nucleicos que tengan una secuencia idéntica a la de los cebadores introducidos en el medio de reacción, deben adoptarse condiciones de severidad alta. Inversamente, cuando se desea amplificar secuencias que tengan una cierta variabilidad con relación a los cebadores utilizados, las condiciones de reacción deberían ser de menor severidad.

En el contexto de tests universales para detección de microorganismos, investigaciones genéticas, o diagnosis de enfermedades infecciosas, es frecuente tener que buscar secuencias de ácido nucleico que posean cierta variabilidad con relación a la secuencia tipo buscada para tener en cuenta diferencias en secuencias entre individuos o especies. A este fin, a menudo es necesario recurrir a condiciones de menor severidad que permitan que la diversidad genética sea tenida en cuenta.

No obstante, los tests realizados en condiciones de severidad baja presentan el riesgo de amplificar secuencias que procedan de ácidos nucleicos residuales extraños a la muestra objeto de estudio. Resultado de esto es la aparición de "positivos falsos", lo cual puede distorsionar sustancialmente los resultados de los tests.

45 En el caso de la detección universal de microorganismos, el riesgo de positivos falsos ligado a la presencia de ácidos nucleicos residuales procedentes de los alrededores, es muy alto [Schmidt, T., Hummel, S., Hermann, B., 1995, Evidence of contamination in PCR laboratory disposables; *Naturwissenschaften* 82].

En las técnicas forenses, cuando se desea establecer la identidad de un criminal sobre la base de su huella genética, existe también un riesgo no nulo de que los tubos o el equipo utilizados en el laboratorio puedan estar contaminados por el DNA de otra persona, o incluso por el del operador. Por ello, es difícil establecer el perfil de DNA del criminal con certeza.

Por estas razones, es muy importante que los dispositivos dedicados a la amplificación de ácidos nucleicos estén completamente libres de los ácidos nucleicos residuales amplificables.

En general, los consumibles utilizados en las reacciones de biología molecular, que incluyen los implicados en reacciones de amplificación de DNA o RNA, se fabrican en una sala limpia, antes de ser sometidos a un paso final de esterilización convencional para asegurar la ausencia de microbios.

5 Sin embargo, estos métodos de esterilización convencionales no son suficientes para eliminar todos los ácidos nucleicos amplificables de las superficies de los consumibles.

Los consumibles exentos de DNA, RNA, DNasa, RNasa y otros inhibidores de PCR pueden recibir la marca "limpio para PCR". Esto no significa sin embargo que los mismos estén exentos de ácidos nucleicos bacterianos que procedan de los alrededores. Pueden utilizarse enzimas tales como endonucleasas o productos químicos tales como psoraleno a fin de hacer las moléculas de ácido nucleico residual no amplificables.

10 No obstante, tales productos o enzimas pueden tener una interacción negativa con los reactivos y las muestras utilizados en las reacciones de amplificación.

Otros métodos para la eliminación de ácidos nucleicos residuales amplificables utilizan radiación ionizante (ultravioleta (UV), gamma (γ), rayos X y beta (β)), pero, para ser más eficaces, la duración de la exposición tiene que ser varias horas, lo cual hace el proceso costoso, y, sobre todo, degrada o debilita los materiales de los que están hechos los consumibles. Adicionalmente, la manipulación de la radiación ionizante está sujeta a regulación estricta, lo cual limita su posibilidad de implementación.

Diversos métodos de descontaminación de consumibles han sido descritos en la técnica anterior.

La Solicitud de Patente Internacional WO 93/20241 describe el uso de complejos de quelatos metálicos de piridina y fenantrolina para desactivar las secuencias de ácido nucleico residual en superficies de laboratorio.

20 La Solicitud de Patente Internacional WO 2007/044520 describe el uso de una solución diluida de peróxido de hidrógeno para descontaminar consumibles de laboratorio.

En 2007, Shaw et al. ("Comparison of the effects of sterilization techniques on subsequent DNA profiling", Int. J. of Legal Medicine, vol. 122, no. 1, enero 2008, páginas 29-33,) describieron que, en una comparación de radiación UV, gamma y beta y tratamiento con óxido de etileno para descontaminar consumibles de laboratorio, el último tratamiento daba los mejores resultados.

25 EP 1.792.631 y WO 2005/007884 describen también el uso de óxido de etileno para descontaminar consumibles de laboratorio de DNA residual.

Archer et al. ("Validation of a dual cycle ethylene oxide treatment technique to remove DNA from consumables used in forensic laboratories", Forensic Science International: Genetics, Elsevier BV, Países Bajos, vol. 4, no. 4, 1 julio 2010, páginas 239-243) describen también cómo se utilizó el tratamiento con un ciclo dual de óxido de etileno para descontaminar consumibles de laboratorio.

Actualmente, para esterilizar sus consumibles, la solicitante utiliza un proceso para tratamiento con peróxido de hidrógeno comercializado bajo el nombre Sterrad® (Johnson & Johnson). El peróxido de hidrógeno es un gas oxidante que hace posible la destrucción por oxidación de los componentes celulares de microorganismos, en particular proteínas, y en menor proporción ácidos nucleicos. El proceso Sterrad® utiliza peróxido de hidrógeno al 90%, en forma gaseosa, a baja temperatura. Conforme a este proceso, se aplica una fase de vacío en la cámara en la cual están situados los consumibles a tratar, de tal modo que la fase gaseosa penetra y atraviesa todas las partes de los dispositivos a tratar. Al final del ciclo, se aplica de nuevo una fase de vacío, mientras que las moléculas de peróxido de hidrógeno se ionizan por aplicación de un campo eléctrico y formación de un plasma. Una de las ventajas del proceso Sterrad® es que los dispositivos pueden esterilizarse, mientras los mismos están pre-empaquetados en bolsitas de plástico. Las bolsitas comprenden una cara de un material sintético no tejido (Tyvek®) que es permeable al peróxido de hidrógeno.

35 Sin embargo, la solicitante encontró que este proceso no destruía totalmente los ácidos nucleicos residuales contenidos en los dispositivos. Así pues, el proceso Sterrad® satisface sólo parcialmente las necesidades de la solicitante.

Debería indicarse que la solicitante está especializada en la fabricación de dispositivos de filtración con membrana que comprenden membranas de filtración destinadas a tests de detección de microorganismos. Estos tests de detección de microorganismos se llevan a cabo típicamente por amplificación PCR después de filtrar una muestra líquida a través de dichos dispositivos que se han esterilizado.

50 Estos dispositivos consisten a menudo en dispositivos complejos que comprenden conducciones, tanques, y una membrana de filtración, lo que hace su tratamiento más difícil.

La solicitante ha aplicado repetidamente una y otra vez el proceso Sterrad® para tratar de eliminar por completo los ácidos nucleicos residuales que quedan en los dispositivos. Sin embargo, las amplificaciones seguían demostrando todavía que los ácidos nucleicos de los microorganismos no se habían eliminado por completo (Figura 3B).

La solicitante ha emprendido por ello investigaciones a fin de mejorar los procesos arriba mencionados, con el propósito de desarrollar un proceso para tratar los ácidos nucleicos residuales presentes en dichos dispositivos, con las condiciones de (i) no deteriorar los materiales de los que están hechos los dispositivos, en particular, las membranas y los filtros (por ejemplo: polipropileno, PES, PVDF) y (ii) no producir como consecuencia el efecto de inhibición de las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos, para las cuales están destinados tales dispositivos.

Después de numerosos ensayos, la solicitante ha determinado que un tratamiento de descontaminación en dos pasos de las superficies a tratar permite cumplir las condiciones arriba mencionadas.

El proceso desarrollado comprende un primer paso de tratamiento con óxido de etileno en fase gaseosa, seguido por un segundo paso de tratamiento con peróxido de hidrógeno en fase líquida a una concentración comprendida entre 25% y 70% y calentado a 50°C-70°C, o en fase gaseosa, en el cual el peróxido de hidrógeno se vaporiza, y se lleva luego a una concentración mayor que 30%. La solicitante ha encontrado que la combinación de estos dos pasos ha hecho posible una descontaminación más completa que las de las técnicas anteriores.

En particular, la solicitante ha encontrado, utilizando tests comparativos, que el efecto de los dos pasos para tratamiento del dispositivo era eliminar cualquier amplificación indeseable, incluso cuando los ácidos nucleicos residuales están contenidos inicialmente en microorganismos, lo cual no puede conseguirse cuando se lleva a cabo sólo uno de los pasos de tratamiento.

Los diferentes modos de la invención y las ventajas resultantes de los mismos se detallan a continuación.

Figura 1: Un gráfico que compara diferentes tratamientos de descontaminación aplicados a DNA residual contenido inicialmente en microorganismos (*S. epidermis*). Las superficies de los consumibles (tubos de 1,5 ml) estaban contaminadas con el mismo número de células de *S. epidermis* antes de recibir los tratamientos respectivos **NS** (gris claro): ausencia de tratamiento. **EO** (gris medio): tratamiento con óxido de etileno en fase gaseosa. **EO + H₂O₂ (I)** (negro): tratamiento conforme a la invención con óxido de etileno en fase gaseosa seguido por peróxido de hidrógeno en solución líquida (30%). **Neg** (gris oscuro): control negativo no contaminado por *S. epidermis*. Las superficies así tratadas se lavaron luego y se llevó a cabo una reacción PCR (40 ciclos) sobre los productos de lavado, para el propósito de detectar posible DNA residual procedente de *S. epidermis*. Las curvas representan la cantidad de DNA amplificado, detectada por fluorescencia.

Figura 2: Un gráfico que compara los diferentes tratamientos de descontaminación aplicados a RNA residual contenido inicialmente en microorganismos (*P. aeruginosa*). Las superficies de los consumibles (tubos de 1,5 ml) se contaminaron con el mismo número de células de *P. aeruginosa* antes de recibir uno de los tratamientos respectivos. **2A: EO** (gris medio): tratamiento con óxido de etileno en fase gaseosa. **γ** (gris oscuro): tratamiento con radiación gamma. **NS** (gris claro): ausencia de tratamiento. **2B: EO + H₂O₂ (I)** (negro): tratamiento con óxido de etileno en fase gaseosa y luego con peróxido de hidrógeno en solución (30%). **γ + H₂O₂ (I)** (gris oscuro): tratamiento por irradiación gamma y a continuación con peróxido de hidrógeno en solución (30%). **NS + H₂O₂ (I)** (gris claro): tratamiento con peróxido de hidrógeno en solución (30%) sólo. **NS** (gris claro): ausencia de tratamiento. Las superficies así tratadas se lavaron luego y se llevó a cabo una reacción TMA (76 ciclos) sobre los productos de lavado, con el propósito de detectar posible RNA residual procedente de *P. aeruginosa*. Las curvas representan la cantidad de RNA amplificado, detectada por fluorescencia.

Figura 3: Un gráfico que compara los diferentes tratamientos de descontaminación aplicados a RNA residual contenido inicialmente en microorganismos (*P. acnes*). Las superficies de los consumibles se contaminaron con el mismo número de células de *P. acnes* antes de recibir uno de los tratamientos respectivos. **3A: EO + H₂O₂ (I)** (negro): tratamiento por óxido de etileno en fase gaseosa seguido por peróxido de hidrógeno en fase gaseosa (Sterrad®). **NS** (gris claro): ausencia de tratamiento. **3B: H₂O₂ (g) + H₂O₂ (g)** (negro): tratamiento que comprende dos ciclos de tratamiento con peróxido de hidrógeno en fase gaseosa (Sterrad®). **NS** (gris claro): ausencia de tratamiento. Las superficies así tratadas se lavaron luego y se llevó a cabo una reacción TMA (76 ciclos) sobre los productos de lavado, con el propósito de detectar posible RNA residual procedente de *P. acnes*. Las curvas representan la cantidad de RNA amplificado, detectada por fluorescencia.

Figura 4: Un gráfico que compara diferentes tratamientos de descontaminación aplicados a DNA residual contenido inicialmente en microorganismos (*G. stearothermophilus*). Los consumibles (unidades de filtración que comprendían varios filtros) estaban contaminados con el mismo número de esporas de *G. stearothermophilus* antes de recibir uno de los tratamientos respectivos. **NS** (gris claro): ausencia de tratamiento. **H₂O₂ (g)** (negro): tratamiento conforme a la invención con óxido de etileno en fase gaseosa seguido por peróxido de hidrógeno en fase gaseosa (90%).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un método de tratamiento de los ácidos nucleicos amplificables residuales, que están presentes en la superficie de un objeto, por ejemplo, un consumible en biología molecular, combinando una fase de tratamiento con óxido de etileno gaseoso y una segunda fase de tratamiento con peróxido de hidrógeno en fase líquida o gaseosa.

Este método comprende preferiblemente los pasos siguientes:

- (i) tratamiento de la superficie de dicho consumible con óxido de etileno en fase gaseosa; y a continuación
- (ii) tratamiento de dicha superficie con peróxido de hidrógeno en fase líquida a una concentración comprendida entre 25% y 60% y en el que el peróxido de hidrógeno se calienta a una temperatura comprendida entre 50°C y 70°C, o en fase gaseosa, en el cual el peróxido de hidrógeno se vaporiza, y se lleva luego a una concentración mayor que 30%.

El término "consumible" se utiliza en esta memoria para significar cualquier objeto utilizado en la manipulación de los ácidos nucleicos, desde su recogida en el ambiente al laboratorio en el que se llevan a cabo las amplificaciones. El consumible puede estar hecho de materiales diferentes.

- 10 Los consumibles a los que está dirigida la invención son más particularmente dispositivos de filtración de plástico que comprenden membranas de filtración, preferiblemente de polipropileno, PES o PVDF, tales como los comercializados por la solicitante.

- 15 Los consumibles se implementan más particularmente en el contexto de las manipulaciones para el propósito de realizar amplificaciones de ácido nucleico, en particular por medio de técnicas tales como PCR que se lleva a cabo preferiblemente sobre la base de muestras de DNA, o TMA que se lleva a cabo preferiblemente sobre muestras de RNA.

- 20 El primer paso i) del proceso se lleva a cabo generalmente por medios convencionales [Pittet *et al.* 1997, *Swiss Noso*, 4(1)] en una cámara cerrada (v.g. Steri-Vac 5 XL, 3M) utilizando una concentración de óxido de etileno gaseoso preferiblemente mayor que 75%, más preferiblemente entre 60% y 99%, y todavía más preferiblemente entre 70% y 90% (v/v).

A no ser que se indique otra cosa, las concentraciones se expresan en porcentajes de volumen por volumen (% v/v).

- 25 Dado que el óxido de etileno es una molécula de pequeño tamaño, su capacidad de penetración es alta, lo cual, entre otras cosas, hace posible el tratamiento de consumibles pre-empaquetados en un empaquetamiento permeable al gas. Esta capacidad de penetración explica su alta eficacia en la esterilización de objetos complejos, que son de difícil acceso. El óxido de etileno alcanza también los constituyentes principales de la materia viva (DNA, proteínas, vitaminas, enzimas), lo cual le confiere alta capacidad de esterilización. El tratamiento con óxido de etileno es así activo contra todas las células vivas y por consiguiente tiene efecto esterilizante. La eficacia del tratamiento está influenciada por varios parámetros: la humedad relativa del gas, que es preferiblemente mayor que o igual a 30% y la temperatura, que está comprendida preferiblemente entre 40°C y 60°C, y más preferiblemente entre 50°C y 60°C.

La duración del contacto entre el óxido de etileno gaseoso y la superficie de los consumibles varía entre 1 y 6 horas, conforme a la concentración supuesta de esporas y microorganismos, y los materiales de los que están hechos los consumibles. El tratamiento en fase gaseosa es más eficaz cuando, previamente, se aplica vacío a la cámara de tratamiento, dentro o bien alrededor del consumible a tratar.

- 35 Conforme a la invención, el paso ii) de tratamiento con peróxido de hidrógeno se lleva a cabo en fase líquida, utilizando una solución acuosa, o en fase gaseosa.

Cuando el peróxido de hidrógeno en el paso ii) se encuentra en fase líquida, su concentración está comprendida entre 25% y 60%. Una concentración mayor que o igual a 30% ha demostrado ser óptima conforme a los experimentos realizados por los inventores (Tabla 3).

- 40 El tratamiento en fase líquida tiene la ventaja de solubilizar los ácidos nucleicos residuales. Adicionalmente, el paso de una corriente líquida a través de los filtros, si viene al caso, hace posible alcanzar más eficazmente los ácidos nucleicos residuales situados en los materiales porosos que constituyen dichos filtros.

El peróxido de hidrógeno en fase líquida se calienta a una temperatura entre 50°C y 70°C, preferiblemente mayor que 60°C.

- 45 Esta temperatura tiene la ventaja de no deteriorar los materiales de los que están hechos los consumibles.

El peróxido de hidrógeno, en fase líquida, se mantiene generalmente en contacto con la superficie a descontaminar, preferiblemente, durante un periodo de al menos 40 minutos, con preferencia entre 40 minutos y 1 hora. Este periodo es mayor que el correspondiente al tratamiento en fase gaseosa descrito más adelante, y por lo general requiere una fase de secado a fin de eliminar el peróxido de hidrógeno de la superficie de los consumibles.

- 50 El tratamiento con peróxido de hidrógeno del paso ii) en fase gaseosa se lleva a cabo por vaporización del peróxido de hidrógeno, que se lleva a una concentración mayor que 30%, preferiblemente mayor que 50%, y más preferiblemente mayor que 80% del gas total.

El peróxido de hidrógeno puede pasarse en estado de plasma por aplicación de un campo eléctrico, preferiblemente a una temperatura inferior a 70°C, más preferiblemente inferior a 60°C, lo cual hace posible que el mismo se degrade y se desactive por tanto al final del tratamiento.

- 5 Las temperaturas arriba indicadas son menores que para los procesos de esterilización convencionales, y conservan mejor la calidad de los materiales de los que pueden estar hechos los consumibles, en particular las membranas o filtros que pueden componer los mismos.

Un proceso de este tipo puede implementarse en dispositivos dedicados específicamente a tratamientos que utilizan peróxido de hidrógeno en fase gaseosa, tales como el proceso Sterrad® (ASP - Johnson & Johnson), conforme a las recomendaciones de los fabricantes de dichos dispositivos.

- 10 El proceso Sterrad® constituye una realización posible pero no limitante del paso ii). La implementación del peróxido de hidrógeno en fase gaseosa tiene la ventaja de poder ser aplicada a consumibles pre-empaquetados en empaquetamientos permeables a los gases. Así, cuando los dos pasos del proceso conforme a la invención se llevan a cabo en fase gaseosa, el consumible puede estar empaquetado o pre-empaquetado antes de ser sometido a estos dos pasos.
- 15 Análogamente, cuando el tratamiento con peróxido de hidrógeno se lleva a cabo en fase gaseosa, los pasos i) y ii) pueden suceder uno a otro en la misma cámara de tratamiento, lo cual limita el contacto de los consumibles con los ácidos nucleicos residuales de los alrededores.

- 20 Los resultados obtenidos por los inventores se ilustran a continuación en los ejemplos de la aplicación. Las Figuras 1 a 4 muestran que el proceso conforme a la invención hace posible obtener un tratamiento más eficaz de los ácidos nucleicos residuales, cualquiera que sea su origen (celular o libre), su naturaleza (RNA o DNA) o el modo de amplificación considerado (PCR o TMA). Tal nivel de eficacia es resultado de la combinación de los pasos i) y ii) conforme a la invención y del orden el que se llevan a cabo los mismos.

- 25 El proceso conforme a la invención da como resultado un consumible tratado, que está exento de ácidos nucleicos amplificables, lo que no era posible obtener con anterioridad, en particular en lo que respecta a los consumibles que comprenden uno o más filtros o membranas, preferiblemente de polipropileno, PES o PVDF.

La invención hace posible por tanto, en particular, la obtención de un consumible en biología molecular, sea el mismo simple o complejo, que está exento de ácidos nucleicos de origen bacteriano (garantizado exento de DNA).

Ejemplos

Protocolo 1

- 30 Varios consumibles constituidos por tubos de polipropileno de 1,5 ml se contaminaron en paralelo con una cantidad conocida de DNA, RNA o microorganismos. Estos consumibles se esterilizaron luego con radiación gamma (dosis de 0 a 60 kGy) o se trataron con óxido de etileno en fase gaseosa. Después de la esterilización, la presencia de ácidos nucleicos residuales se determina por PCR (respecto a DNA) y TMA (respecto a RNA) y se compara con un consumible de control no esterilizado.
- 35 Los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Eficacia de los tratamientos de ácido nucleico residual realizados por medio de óxido de etileno (EO) y por medio de radiación gamma

Type	Microorganismos testados	Gamma	EO
DNA (PCR)	<i>E. Coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	+++ Degradación del DNA (30-40kGy)	+ Degradación parcial
RNA (TMA)	<i>P. acnes</i> <i>P. aeruginosa</i>	+ Degradación parcial	+++ Degradación
Gérmenes (PCR)	<i>E. Coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	+ La dosis tiene que ser mayor que 60kGy	+ Degradación parcial
Gérmenes (TMA)	<i>P. acnes</i> <i>P. aeruginosa</i>	- Poco efecto (dependiendo de los microorganismos)	- Sin efecto

Estos resultados demuestran que el tratamiento gamma no degrada por completo el RNA contenido en los microorganismos, ni el que se encuentra en forma libre.

Respecto al DNA, este se degrada sólo parcialmente. El tratamiento con óxido de etileno es eficaz contra RNA en forma libre, pero no tiene efecto alguno sobre el RNA contenido en los microorganismos.

5 Protocolo 2

Varios consumibles del mismo tipo que los utilizados en el protocolo 1 se contaminaron con la misma cantidad conocida de DNA, RNA o microorganismos. Estos consumibles se trataron luego por un tratamiento con peróxido de hidrógeno realizado en solución líquida (respectivamente H₂O₂ al 3% y 30%). El peróxido de hidrógeno se evapora al final del proceso en virtud de un paso de secado a vacío a una temperatura de 60°C. Después del tratamiento, la presencia de ácidos nucleicos residuales se determinó por PCR (respecto a DNA) y TMA (respecto a RNA) y se comparó con una muestra sin tratar.

Los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla 2 siguiente, en la cual (-) significa efecto nulo, (++) significa una degradación parcial de los ácidos nucleicos y (+++) significa su degradación completa.

Tabla 2: Eficacia de los tratamientos de ácido nucleico residual realizados por medio de peróxido de hidrógeno en solución al 3% y 30%

	Microorganismos testados	H ₂ O ₂ 3%*	H ₂ O ₂ 30%*
DNA (PCR)	<i>E. Coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	++	+++
RNA (TMA)	<i>P. acnes</i> <i>P. aeruginosa</i>	++	+++
Gérmenes (PCR)	<i>E. Coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	—	—
Gérmenes (TMA)	<i>P. acnes</i> <i>P. aeruginosa</i>	—	—

* Tiempo mínimo de acción sobre los ácidos nucleicos 40 min a 60°C

Estos resultados demuestran que una concentración de H₂O₂ de 30% hace posible degradar los ácidos nucleicos libres más eficazmente que una concentración de H₂O₂ de 3%. Sin embargo, el tratamiento no tiene efecto alguno sobre los ácidos nucleicos contenidos en los microorganismos.

Protocolo 3 (conforme a la invención)

Varios consumibles del mismo tipo que los utilizados en el protocolo 1 se contaminaron con la misma cantidad conocida de DNA, RNA o microorganismos. Una parte de dichos consumibles se trató luego conforme a la invención con óxido de etileno gaseoso seguido por el peróxido de hidrógeno al 3% o 30%. Una parte adicional se trató con radiación gamma en lugar del óxido de etileno gaseoso y luego con peróxido de hidrógeno. En ambos casos, el peróxido de hidrógeno se evaporó en virtud de un paso de secado a vacío a una temperatura de 60°C. Después del tratamiento, se determinó la presencia de ácidos nucleicos residuales por PCR (para DNA) y TMA (para RNA) y se comparó con una muestra sin tratar.

Los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla 3 siguiente, en la cual (-) significa ausencia de efecto, (++) significa una degradación parcial de los ácidos nucleicos y (+++) significa su degradación completa. Estos resultados demuestran que, hasta cierto punto, el tratamiento gamma + H₂O₂ permite la degradación de los ácidos nucleicos, pero la eficiencia de este proceso es menos satisfactoria que el EO + H₂O₂ en particular para el RNA contenido en los microorganismos. El tratamiento con óxido de etileno seguido por solución de peróxido de hidrógeno al 30% permite que el DNA y RNA contenidos en los microorganismos se degraden completamente, mientras que el mismo tratamiento pero sólo con H₂O₂ al 3% es menos eficaz sobre el DNA y no actúa en absoluto sobre el RNA.

Tabla 3: Eficacia de los tratamientos de los ácidos nucleicos residuales obtenidos en los microorganismos

	Gamma + H ₂ O ₂ 3%*	Gamma + H ₂ O ₂ 30%*	Óxido de etileno + H ₂ O ₂ 3%*	Óxido de etileno + H ₂ O ₂ 30%*	Microorganismos testados
Gérmenes (PCR)	+ Reduce el ni- vel de positi- vidad	+++	+ Reduce el nivel de positividad	+++	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
Gérmenes (TMA)	+ Reduce el ni- vel de positi- vidad	++ Efectividad variable	- Poco o ningún efecto	+++	<i>P. acnes</i> <i>P. aeruginosa</i>

* Contacto durante 1 hora a 60°C

Protocolo 4

- 5 Varios consumibles complejos que comprendían varios filtros se contaminaron con la misma cantidad conocida de microorganismos (*G. stearothermophilus*). Una parte de dichos consumibles se trató luego conforme al proceso de la invención con óxido de etileno gaseoso y seguidamente con peróxido de hidrógeno gaseoso a aproximadamente 90%. Una parte adicional de los consumibles que servía como control no se trató. La presencia de ácidos nucleicos residuales (DNA) se determinó por PCR. La Figura 4 registra las cantidades de DNA amplificadas durante los diferentes ciclos de PCR. Puede observarse la ausencia de amplificación en las muestras tratadas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de descontaminación de los ácidos nucleicos residuales amplificables presentes en la superficie de un consumible, caracterizado por que el mismo comprende los pasos siguientes:
 - (i) tratamiento de la superficie de dicho consumible con óxido de etileno en fase gaseosa; y a continuación
 - 5 (ii) tratamiento de dicha superficie con peróxido de hidrógeno en fase líquida a una concentración comprendida entre 25% y 60% y en el cual el peróxido de hidrógeno se calienta a una temperatura comprendida entre 50°C y 70°C, o en fase gaseosa, en el cual el peróxido de hidrógeno se vaporiza, y se lleva luego a una concentración mayor que 30%.
- 10 2. Un método conforme a la reivindicación 1, en el cual el óxido de etileno en el paso i) se utiliza con una concentración comprendida entre 70% y 90% (v/v).
3. Un método conforme a la reivindicación 1 ó 2, en el cual el peróxido de hidrógeno en el paso ii) se encuentra en fase líquida a una concentración mayor que 30% (v/v).
4. Un método conforme a la reivindicación 3, en el cual el peróxido de hidrógeno en fase líquida se calienta a una temperatura mayor que 60°C.
- 15 5. Un método conforme a la reivindicación 2 ó 3, en el cual el peróxido de hidrógeno, en fase líquida, se encuentra en contacto en el paso ii) con la superficie a descontaminar durante un periodo de al menos 40 minutos.
6. Un método conforme a la reivindicación 1, en el cual el tratamiento con peróxido de hidrógeno se lleva a cabo en fase gaseosa.
- 20 7. Un método conforme a la reivindicación 6, en el cual el peróxido de hidrógeno se vaporiza, y se lleva luego a una concentración mayor que 50%, y preferiblemente mayor que 80%.
8. Un método conforme a la reivindicación 7, en el cual el peróxido de hidrógeno se hace pasar en estado de plasma por aplicación de un campo eléctrico a una temperatura inferior a 60°C.
9. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente un paso de evaporación entre los pasos i) y ii).
- 25 10. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual el consumible en biología molecular está empaquetado con anterioridad en un paquete parcialmente no tejido.
11. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual el vacío se aplica antes de uno de los pasos i) y ii).
- 30 12. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el cual el óxido de etileno residual se elimina mediante los pasos i) y ii).
13. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el cual el peróxido de hidrógeno residual se elimina de la superficie del consumible después del paso ii).

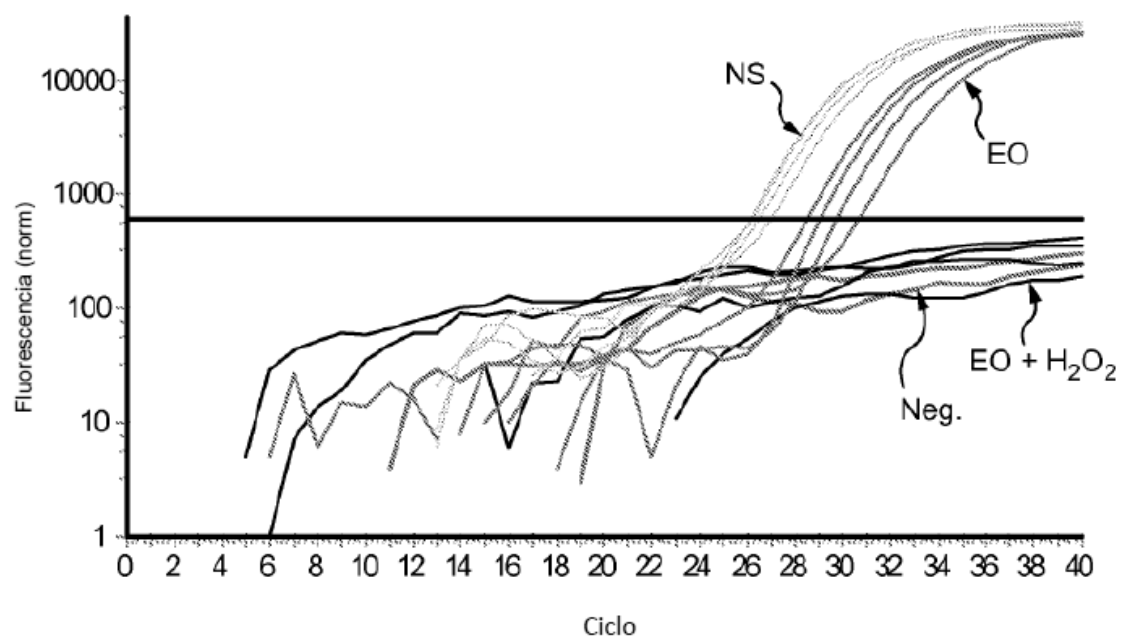


Fig. 1

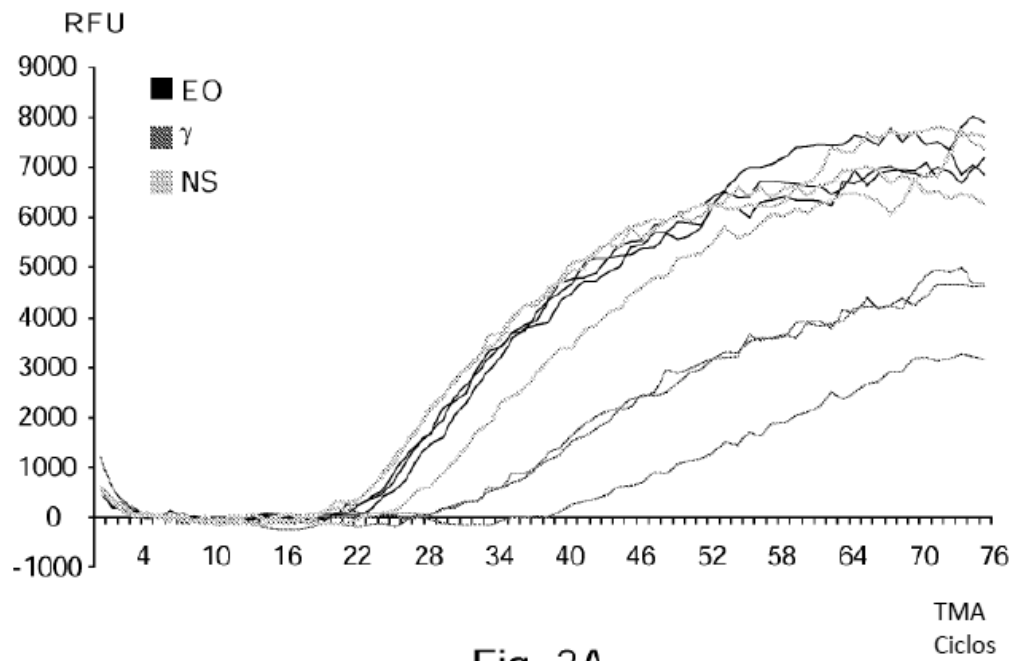


Fig. 2A

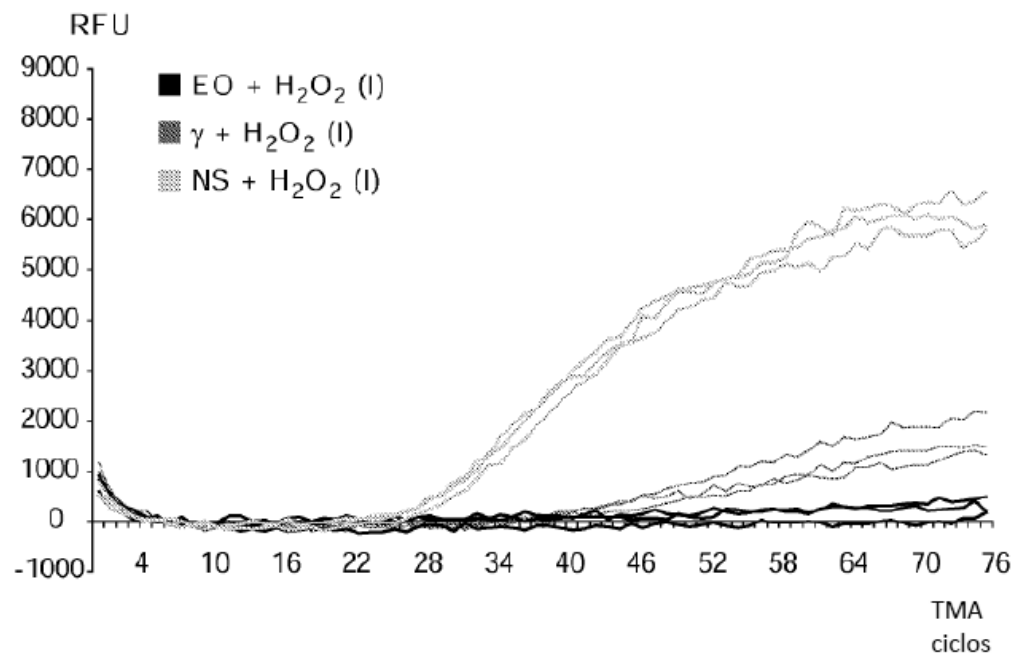
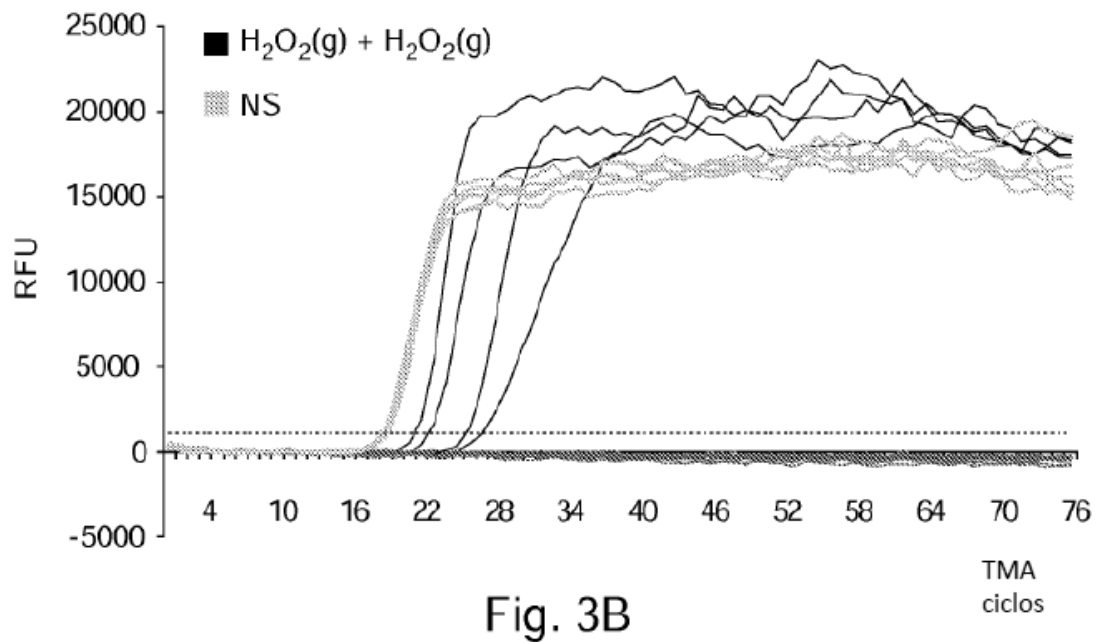
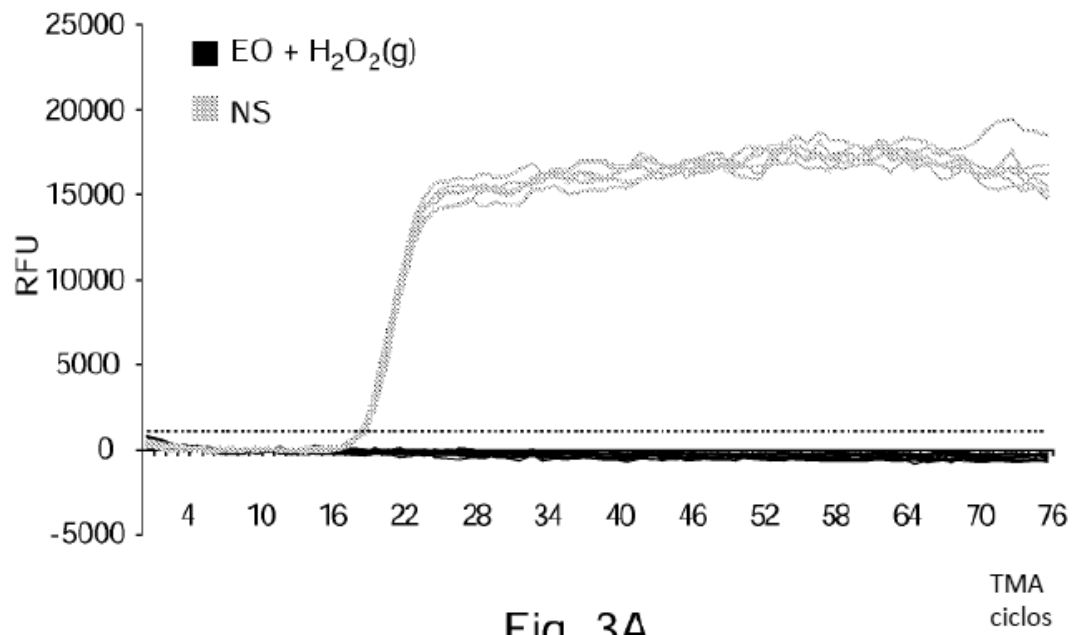


Fig. 2B



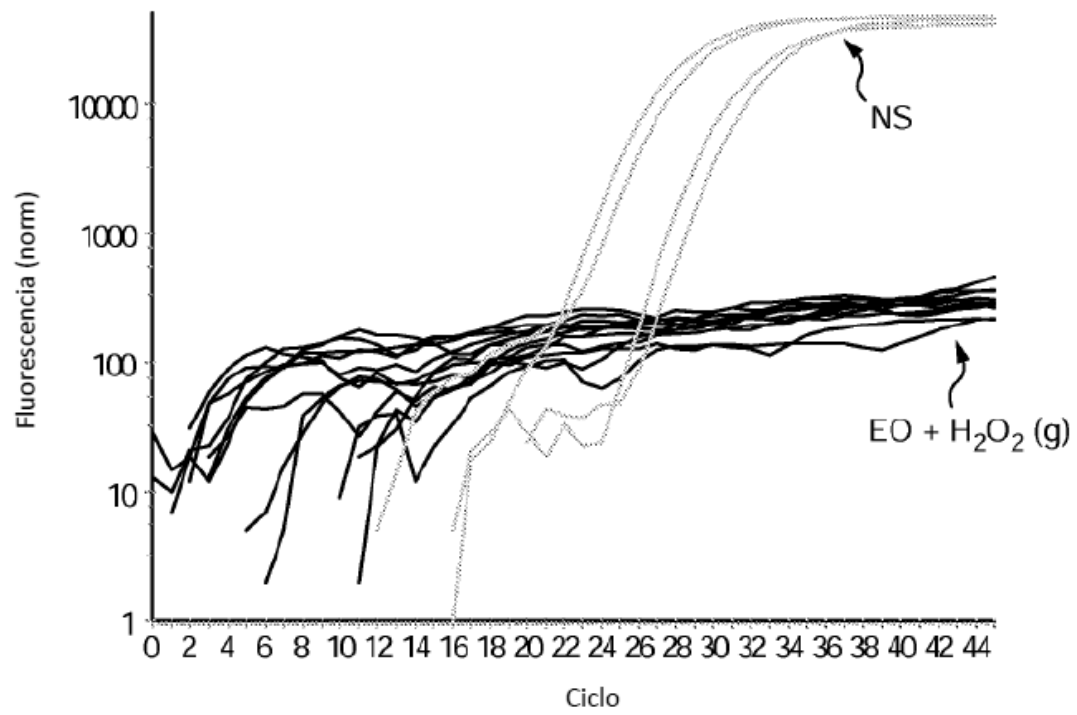


Fig. 4