



DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

# RECOMENDACIONES PARA LABORATORIOS QUE REALIZAN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): ÁREAS Y FLUJOS DE TRABAJO.

## AUTORES

**Biol. Jorge Fernández Ordenes. PhD.**

Jefe Subdepto. Genética Molecular.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**TM. Berta Olivares Vicencio.**

Encargada de Calidad.  
Subdepto. Genética Molecular.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**BQ. Soledad Ulloa Urrutia.**

Profesional Subdepartamento de Genética Molecular.  
Subdepto. de Genética Molecular.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

---

## REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

**Winston Andrade Lillo. PhD.**

Profesional Sección Virus Respiratorios y Exantemáticos.  
Subdepto. de Enfermedades Virales.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**BQ. Pamela Araya Rodríguez.**

Jefe de Sección Bacteriología.  
Subdepto. Enfermedades Infecciosas.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**TM. Mitzy Celis Morales.**

Jefe Sección Coordinación de Redes de Laboratorios.  
Subdepto. Coordinación Externa.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**BQ. Rodrigo Fasce Pineda.**

Jefe Sección Virus Respiratorios y Exantemáticos.  
Subdepto. de Enfermedades Virales.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**Dr. Juan Carlos Hormazábal Opazo**

Jefe Subdepto. Enfermedades Infecciosas  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**Biol. Daniel Ibañez Cabrera.**

Profesional Sección Bacteriología.  
Subdepto. Enfermedades Infecciosas.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**TM. María Isabel Jercic Lara.**

Jefe Sección Parasitología.  
Subdepto Enfermedades Infecciosas.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**Dra. Paola Pidal Méndez.**

Jefe Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**Dra. Verónica Ramírez Muñoz.**

Jefe Subdepto Coordinación Externa.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

**T.M. Rodrigo Villarroel Venegas.**

Profesional Sección Parasitología.  
Subdepto. Enfermedades Infecciosas.  
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.  
Instituto de Salud Pública de Chile.

---

## REVISORES EXTERNOS

**Dra. Marcela Lagos Lucero.**

Jefe de Laboratorio de Biología Molecular y Citogenética.  
Departamento de Laboratorios Clínicos.  
Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

**Dra. Gabriela Muñoz Gómez.**

Unidad Biología Molecular.  
Laboratorio Clínico.  
Hospital Clínico Universidad de Chile.

---

## RECOMENDACIONES PARA LABORATORIOS QUE REALIZAN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): ÁREAS Y FLUJOS DE TRABAJO.

---

### RESUMEN

El siguiente documento entrega recomendaciones sobre las áreas y flujos de trabajo para los laboratorios que realizan técnicas de PCR, considerando principalmente dos elementos que se deben tener en cuenta al diseñar e implementar un laboratorio de PCR: la separación de áreas de trabajo con *sets* independientes de equipamiento, que no se comparten entre áreas, y el flujo unidireccional de trabajo desde el área más limpia hacia la más sucia. La rigurosa aplicación de las medidas presentadas en este documento permitirá un control efectivo de la contaminación con ácidos nucleicos, asegurando resultados confiables en laboratorios que realizan la técnica de PCR. Cabe destacar que, tanto la infraestructura y disposición de las áreas en el laboratorio como el entrenamiento que reciba el personal dedicado a realizar esta técnica, son fundamentales para el éxito en la aplicación de estas recomendaciones.

### ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a los laboratorios que realizan técnicas de PCR de punto final y de tiempo real. No incluye sistemas automatizados de PCR.

### INTRODUCCIÓN

La **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** fue descrita en el año 1986 por K. Mullis como una amplificación enzimática específica de ADN realizada *in vitro*, es decir, donde un segmento particular de ADN es copiado y específicamente amplificado al ser delimitado por un par de partidores (oligonucleótidos) que lo flanquean. El copiado se logra de forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes etapas y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN-polimerasa termoestable.

La PCR es una técnica rápida y versátil, convirtiéndose hasta la fecha en una técnica comúnmente utilizada en diversos laboratorios. Tiene ventajas tales como requerir una cantidad mínima de templado en la reacción, el cual no necesariamente debe estar puro, permitiendo una fácil y rápida obtención de resultados. Sin embargo, la experiencia ha permitido establecer una gran limitante, como es la alta susceptibilidad de contaminación en alguna de las etapas de la técnica: la extracción del templado, la preparación de reactivos, la dispensación o carga del templado y la etapa de electroforesis (sólo para el PCR de punto final).

Para minimizar este problema existen ciertas condiciones que deben ser controladas, tales como: separar áreas de trabajo *contaminadas* con templado de aquellas áreas libres de él con *sets* independientes de equipamiento que no se deben compartir entre áreas (micropipetas, gradillas, delantales, guantes, *coolers*, toalla absorbente, alcohol, lápices marcadores, microtubos, minicentrífugas, refrigeradores, etc) y mantener un flujo unidireccional de trabajo desde las áreas más limpias hacia las más sucias.

Este documento está dedicado a describir las recomendaciones de consenso a nivel internacional sobre cómo establecer un laboratorio de PCR con condiciones físicas óptimas para la obtención de resultados fiables y libres de contaminación. No incluye sistemas automatizados de PCR.

Muchas veces, algunos de los recursos necesarios ya están presentes, por lo que el proceso de conversión es más fácil. Sin embargo, es preciso mencionar que cada laboratorio de PCR tiene sus propios requisitos, los cuales deben ser cuidadosamente considerados cuando se evalúa lo necesario para iniciar y operar este tipo de laboratorio con éxito.

En cuanto al personal encargado de realizar ensayos de PCR, éste debe estar capacitado en el correcto uso de los implementos, reactivos, equipos y todo aquello que esté relacionado con la técnica.

## DEFINICIONES

### Amplicón:

Conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También se conoce como producto de PCR.

### Área limpia:

Espacio físico libre de amplicones, templados de ADN y de muestras biológicas que pudieran contaminar futuras PCR. Corresponde al área de preparación de reactivos, también llamada Pre-PCR.

### Área sucia:

Espacio físico donde existe presencia y manipulación de amplicones, ADN/ARN y/o muestras biológicas. Comprende las áreas de Extracción del templado, área de Carga ó dispensación del templado, área de Amplificación (donde están los termocicladores) y, para el caso de PCR de punto final, el área de Electroforesis.

### Mezcla de PCR:

Preparación y mezcla de los componentes necesarios para que ocurra una reacción de PCR tales como agua libre de nucleasas,  $Mg^{+2}$ , dNTPs, partidores y enzima polimerasa termoestable (Taq polimerasa).

### PCR de punto final:

También conocido como PCR convencional permite visualizar, mediante una electroforesis, la acumulación de amplicones generados al final de un número predeterminado de ciclos.

### PCR de tiempo real:

Permite detectar la cinética de la acumulación de amplicones durante cada ciclo inmediatamente, sin necesidad de una electroforesis posterior.

### Templado:

Ácido nucleico (ADN o ARN) utilizado como molde para la PCR, es decir, a partir de aquella molécula serán sintetizadas las copias idénticas conocidas como amplicones.

### Termociclador:

Equipo que permite realizar de forma automática los ciclos de temperatura necesarios para una PCR. El termociclador es diferente si se realiza una PCR de punto final o una PCR de tiempo real.

## DESARROLLO

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica se realiza en un equipo *Termociclador* y consta, regularmente, de tres etapas:

1. Denaturación inicial.
2. Una treintena de ciclos repetitivos.
3. Elongación final, si es PCR de punto final.

A su vez, cada uno de los ciclos repetitivos de la etapa 2 está conformado por 3 subetapas:

- i. Denaturación a  $94^{\circ}\text{C}$ - $96^{\circ}\text{C}$ , que provoca la ruptura de los puentes de hidrógeno y la separación de la doble hebra del ADN en simple hebra, quedando expuestas las bases nitrogenadas del templado.
- ii. Hibridación de los partidores, a una temperatura que oscila entre  $45^{\circ}\text{C}$ - $65^{\circ}\text{C}$  (que depende del contenido y proporción de nucleótidos de los partidores y/o de los amplicones). En esta etapa ocurre la hibridación de los partidores específicos con su región complementaria en el templado. La temperatura de esta etapa es variable, y es dependiente de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los partidores.
- iii. Elongación a  $68^{\circ}\text{C}$ - $72^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la que la polimerasa va añadiendo los diferentes nucleótidos libres, en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa templado, desde el extremo  $3'$  de los partidores.

Una vez finalizada la reacción en el termociclador, se obtienen millones de copias de amplicones. Si ha ocurrido contaminación durante la preparación de la PCR, podrían obtenerse amplicones inespecíficos, es decir, que no correspondan al ADN diana requerido, o bien **falsos positivos** por contaminación con templado o amplicones, alterándose la confiabilidad de los resultados.

## CONTAMINACIÓN

La contaminación de las reacciones de PCR es un problema constante para los laboratorios que realizan este procedimiento. Sin embargo, hay una serie de medidas para controlar esta contaminación, y el grado de rigor que se requiere en un laboratorio a menudo se determina según el ensayo que se va a realizar.

Antes de planificar el diseño del laboratorio es pri-

mordial conocer las fuentes y las vías comunes de contaminación:

- 1.- Fuentes de contaminación:  
Corresponden a templados y amplicones.
- 2.- Vías de contaminación:
  - Aerosoles  
La formación de estas microgotas con ácido nucleico puede originarse por la apertura de tubos que contengan: partidores, sondas (PCR en tiempo real), templado y amplicones. Los aerosoles son de fácil dispersión.
  - Derrame de soluciones  
El contacto de soluciones que contengan ácidos nucleicos (partidores, templado y amplicones) con la superficie de trabajo es una vía común de contaminación. Esto puede ocurrir ya sea por volcamiento de microtubos (y el consecuente derrame de la solución) o por la disposición de tapas de microtubos sobre la superficie, puntas de micropipeta ya utilizadas, etc que dejan residuos contaminantes.

Las fuentes de contaminación pueden provenir de las muestras biológicas que se manipulan durante la etapa de extracción y/o la etapa de carga o dispensación durante la preparación de la reacción de PCR, y de los amplicones manipulados en el área de Post-PCR, principalmente.

Elas pueden ser muy problemáticas debido a su gran estabilidad, contaminando: equipos, superficies, micropipetas, microtubos, soluciones, guantes, delantales, gradillas, *coolers* y lápices marcadores.

Para disminuir los riesgos de contaminación en esta metodología, debe realizarse un cuidadoso estudio de la ubicación de las diferentes áreas del proceso. A su vez, es fundamental el uso exclusivo de equipamiento, guantes y material de laboratorio en cada área. En caso de diseñar una nueva infraestructura, es recomendable considerar los flujos de aire con presiones positiva y negativa según el área, así como el uso de cabinas de PCR que posean luz ultravioleta.

### **Recomendaciones para disminuir la contaminación:**

- 1.- No deben almacenarse en un mismo refrigerador/congelador, reactivos libres de templado junto con ácidos nucleicos purificados y/o con muestras biológicas.

- 2.- Si se detecta contaminación en algún reactivo, partidador, sonda, agua, enzima, etc, éste debe ser eliminado. Para evitar pérdidas de los *stocks* de reactivos por contaminación, se recomienda preparar alícuotas previo a su uso, de manera de sólo eliminar la alícuota en uso si se detecta contaminación.
- 3.- Centrifugar brevemente (*spin*) los tubos que contengan ácidos nucleicos y luego abrirlos cuidadosamente para evitar contaminar los guantes y las superficies.
- 4.- La superficie utilizada para preparar las reacciones de PCR debe ser descontaminada con radiación ultravioleta antes y después de la preparación (15 a 30 min). Si se sospecha contaminación, adicionalmente, una vez terminado el trabajo, pueden limpiarse las superficies con una solución de 0,5- 1,0 % de hipoclorito de sodio, que luego debe ser removido con etanol 70%. También es posible utilizar soluciones comerciales para este fin: DNAZap® (Invitrogen), DNA Away® (VWR), DNA Remover® (Minerva Biolabs), entre otras.
- 5.- Es recomendable incorporar los siguientes controles negativos, para tener un mejor manejo de las contaminaciones:
  - a.- Control de extracción:  
Utilizar un reactivo, por ejemplo agua estéril libre de nucleasas, y manipularlo como una muestra biológica más durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos.
  - b.- Control de reactivos:  
Preparar el reactivo en el área limpia y mantener el tubo cerrado durante el resto del proceso. Luego incubarlo en el termociclador y realizar la electroforesis. Permite chequear los reactivos que se están utilizando para la preparación de las mezclas de PCR.
  - c.- Control de manipulación:  
Agregar agua en un microtubo en lugar de templado, cada 3-4 muestras dispensadas, durante el proceso de carga en la preparación de la PCR. Permite chequear la manipulación, por parte del operador, de las muestras con templados.
  - d.- Control de réplica:  
Para todo laboratorio que trabaje con PCR en tiempo real, además de utilizar los controles antes mencionados, es necesario trabajar cada muestra utilizando réplicas (al menos en duplicado) para descartar posibles falsos positivos, dada la alta sensibilidad de la técnica.

6.- Cada vez que un operador ingrese a un área diferente debe ponerse guantes y delantal nuevos, y utilizar sólo los equipos y materiales disponibles en esa área. Los delantales en cada área son exclusivos y no son intercambiables, es decir, el delantal utilizado para trabajar en un área sucia debe ser distinto al utilizado en un área limpia (lo mismo ocurre con los guantes). Para esto, es necesario disponer de percheros ubicados en las distintas áreas:

- Área limpia: una vez que se ha ingresado a esta área, el operador debe vestir inmediatamente un delantal exclusivo. Antes de retirarse, el delantal utilizado debe ser colgado en un perchero para que permanezca en esta área.

- Área sucia: siempre que el operador trabaje en un área sucia debe vestir un delantal exclusivo.

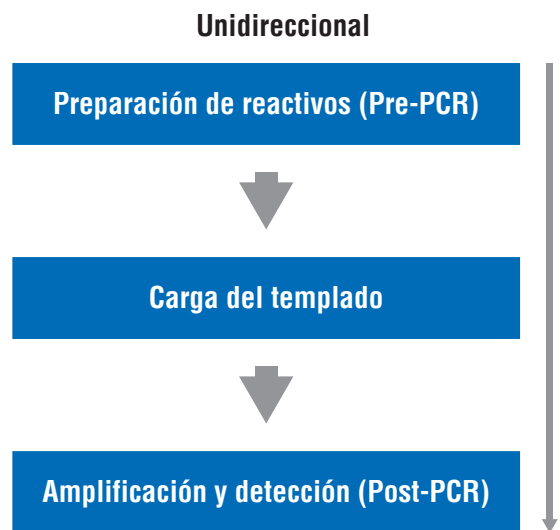
- Área de carga o dispensación de muestras: una vez que se ha ingresado a esta área, el operador debe vestir inmediatamente un delantal exclusivo. Antes de retirarse, el delantal utilizado debe ser colgado en un perchero para que permanezca en esta área y los guantes deben ser eliminados.

Antes de salir del área limpia, área de carga o salir del laboratorio, el delantal utilizado debe ser colgado en un perchero para que permanezca en esta área y los guantes deben ser eliminados.

Los delantales deben ser renovados permanentemente para asegurar la eliminación de contaminantes (delantales área sucia) y mantención de la limpieza (delantales área limpia). Por esta razón, es altamente recomendable el uso de delantales desechables.

7.- La adición de Uracil-N-Glicosilasa (UNG) en conjunto con dUTP (en lugar de dTTP) a la mezcla de PCR, permite inactivar enzimáticamente los amplicones para evitar que sean futuras fuentes de contaminación. Durante la PCR, los amplicones serán sintetizados utilizando dUTP en vez de dTTP; para una próxima PCR, en caso de haber contaminación por amplicones (contaminación *carry-over*), la previa incubación con enzima UNG degradará los productos que contengan dUTP, inactivándolos como templado.

## FLUJO DE TRABAJO UNIDIRECCIONAL



**Figura 1:**

*Esquema de trabajo, en un laboratorio de PCR, con flujo unidireccional.*

En la Figura 1 se resume el flujo de trabajo unidireccional que debe seguirse al realizar las actividades propias de un laboratorio de PCR, de manera de trabajar siempre desde el área más limpia hacia las áreas más sucias: Preparación de reactivos, Carga o dispensación del templado, Amplificación y Detección (tanto para PCR de punto final como para PCR de Tiempo Real).

El área de procesamiento de las muestras (Extracción de templado) debe estar separada del área de amplificación y detección. La extracción de ácidos nucleicos debe realizarse en un **gabinete de bioseguridad clase II**, de forma que el personal que manipule muestras biológicas se mantenga protegido y, al mismo tiempo, se aisle el templado de posibles contaminaciones externas.

Para mantener el flujo unidireccional de trabajo, y evitar retroceder desde áreas sucias hacia áreas limpias, cada una de las áreas debe contar con recursos exclusivos tales como: agua libre de nucleasas, centrifugas, vórtex, refrigeradores/congeladores, micropipetas, puntas para micropipetas y todo lo que sea necesario para la realización de la técnica. Se incluye además, elementos adicionales como computadores, lápices y calculadoras que deben ser exclusivos de cada área y no intercambiables. Asimismo, deberán mantenerse cantidades suficientes de guantes y delantales en cada área, de forma que su uso sea exclusivo en cada una de ellas y se disminuya al mínimo el riesgo de contaminación.



Todos estos elementos **deben estar rotulados** según el área a la que pertenezcan y no deben ser trasladados a otro espacio del laboratorio.

Cabe destacar que las puntas para micropipetas utilizadas en todas las áreas deben tener filtro para evitar la contaminación de las mismas por formación de aerosoles.

El personal, una vez finalizada su tarea en cada área, debe sacarse los elementos de protección (delantal, guantes y manguillas desechables) antes de moverse al área que el flujo unidireccional le indica.

### Área Limpia de Preparación de Reactivos

El área de preparación de reactivos se define como aquella área limpia donde se utilizan protocolos y equipamientos para preparar las mezclas de reacción que serán utilizadas en la PCR. Todo equipamiento de esta área es exclusivo y no se puede utilizar en otra área del laboratorio. En este lugar debe haber un congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$  de uso exclusivo para almacenar los reactivos utilizados para preparar reacciones de PCR, y nunca mezclarlos con cualquier tipo de material biológico (extractos de ADN o ARN, cultivos, material clonado y amplicones). Los *stocks* de partidores (oligonucleótidos) y los reactivos de PCR nuevos deben almacenarse en una ubicación diferente, dentro del mismo congelador, con respecto a los reactivos de uso diario, para evitar su posible contaminación.

Como se mencionó anteriormente, los delantales y guantes utilizados en esta área deben ser exclusivos, ya que no debe existir contaminación desde otras áreas. Por lo tanto, el personal que ingrese a esta sala debe sacarse previamente los elementos de protección que esté utilizando, y vestir elementos de protección limpios una vez dentro de esta área.

Este espacio debe contar con una cabina de PCR cerrada que posea luz ultravioleta. Dentro de esta cabina deben manipularse todos los reactivos para preparar mezclas de PCR. En su interior deben mantenerse la micropipetas, tubos y gradillas de uso diario.

La cabina cerrada va a permitir:

Irradiar la superficie de trabajo dentro de la cabina con luz ultravioleta **previo a su uso**, de forma que las pirimidinas de cualquier traza de ácido nucleico presente en la cabina formen dímeros entre sí (*cross-link*) bloqueando el paso de la polimerasa en una futura reacción de PCR.

### Área de Carga o Dispensación de Templado

En esta área deben dispensarse los templados a las mezclas de PCR que han sido preparadas en el área limpia. El personal debe ingresar y utilizar los elementos de protección exclusivos de esta área. Además, debe contar con cabina de PCR cerrada que posea luz ultravioleta, micropipetas, gradillas y microcentrífuga de uso exclusivo. Antes de abrir los tubos que contienen el ADN templado, debe realizarse una breve centrifugación (*spin*) para evitar el escape de aerosoles al abrir el tubo. Una vez adicionado el ácido nucleico templado, cerrar herméticamente los tubos y llevar al área de amplificación.

Una vez preparadas las mezclas de PCR, el personal nuevamente debe quitarse guantes y delantal (exclusivos de esta área) y dirigirse a los termocicladores para dar inicio a la reacción de PCR.

### Área de Amplificación y Detección (sólo para PCR de punto final)

Antes de entrar a esta área sucia, el personal debe vestir guantes y delantal exclusivos de este sector.

En el caso del PCR de punto final, al finalizar la reacción en el termociclador, los amplicones son manipulados en el sector de electroforesis para la verificación de resultados, el cual debe contar con cámaras de electroforesis, fuentes de poder y los materiales requeridos para su funcionamiento.

### Área de Extracción y Purificación de Templado

En este espacio deben realizarse las extracciones y/o purificaciones de ácidos nucleicos que luego serán utilizados como templado para las reacciones de PCR. El almacenamiento de este material debe realizarse en un congelador exclusivo ubicado dentro de este espacio. La extracción debe realizarse en un **gabinete de bioseguridad clase II**, de forma que el personal que manipule muestras biológicas se mantenga protegido y, al mismo tiempo, se aisle el templado de posibles contaminaciones externas.

El equipamiento de esta área es exclusivo y no puede ser usado en otra área del laboratorio. El personal, al ingresar, debe utilizar delantal y guantes exclusivos de esta área y no puede trasladarlos a otra área del laboratorio.

## FLUJOS DE AIRE AMBIENTAL

Las diferencias de presión del aire pueden usarse para inhibir el pasaje de contaminantes entre áreas: presiones más altas se utilizan en áreas limpias que se encuentren próximas o contiguas a áreas sucias a fin de minimizar las contaminaciones.

Por esta razón, las áreas de Pre y Post-PCR idealmente deben contar con presiones de aire distintas y controladas individualmente. Mientras el área limpia de Preparación de reactivos **debe tener una ligera presión positiva**, entre 5-20 Pa por sobre la presión existente en el pasillo de conexión entre áreas, las otras áreas **deben tener una ligera presión negativa** para ingresar aire desde el exterior y, por ende, prevenir el escape de contaminantes hacia otros lugares del laboratorio.

Es necesario, además, que los controladores de presión estén conectados a conductos de escape de aire separados, de forma que cada uno lleve el aire extraído/ingresado a lugares distintos y no exista contaminación por esta vía.

## CONCLUSIONES

La rigurosa aplicación de las medidas presentadas en este documento permitirá un control efectivo de la contaminación y la obtención de resultados confiables en laboratorios que realizan la técnica de PCR.

Cabe destacar que tanto la infraestructura y disposición de las áreas en el laboratorio como el entrenamiento que reciba el personal dedicado a realizar esta técnica, en el contexto de un sólido sistema de calidad, son fundamentales para el éxito en la aplicación de estas recomendaciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1.- Dieffenbach, CW and Dversler G.S. *Setting up a PCR laboratory*. Genome Res. 1993; 3 (2): S2-S7.
- 2.- Kwok, S. *Procedures to minimize PCR-product carry-over*. Academic Press Inc. Ltd. 1990; 142-145.
- 3.- Lo, Y.M. *et al. False-positive results and the polymerase chain reaction*. The Lancet. 1988; 2 (8612): 679.
- 4.- Mifflin, Th. E. *Control of contamination associated with PCR and other amplification reactions*. Molecular Bio-products, Inc. 1997: 1-20.
- 5.- Mifflin, Th.E. *Setting up a PCR Laboratory*. Cold Spring Harb Protoc. 2007; 2 (1): 5-10.
- 6.- Moia, E. and Wheeler, F. *The design criteria of a pharmaceutical clean room*. Ingeniería Química. 2000; 32: 65-82.
- 7.- Mullis, K. *et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986; 51 (1): 263-273.
- 8.- Mullis, K. and Faloona, FA. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol. 1987; 155: 335-350.
- 9.- Newton, C.R. *Setting up a PCR laboratory*. PCR: Essential data. 1995: 216.
- 10.- Scherczinger C.A. *et al. A systematic analysis of PCR contamination*. J Forensic Sci. 1999; 44 (5): 1042-1045.
- 11.- Standards Unit, Microbiology Services Division. *Good laboratory practice when performing molecular amplification assays*. Quality Guidance. 2010; 1 (4): 1-13.
- 12.- MM3-P2. *Molecular diagnostic methods for infectious diseases: proposed guideline, second edition: Laboratory Design and practices*. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA. 2006.
- 13.- MM05-A2. *Nucleic Acid Amplification assays for molecular hematopathology; approved guideline second edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA. 2012.