

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

ENERO, 2017 | VERSIÓN 1

AUTORES

Biol. Jorge Fernández Ordenes. PhD.

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

BQ. Soledad Ulloa Urrutia.

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

BQ. Pamela Araya Rodríguez.

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

BQ. Monserrat Balanda Apey.

Profesional Sección Virus Oncogénicos.
Subdepartamento Enfermedades Virales.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Rodrigo Fasce Pineda.

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

Dr. Juan Carlos Hormazábal Opazo.

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

Biol. Daniel Ibáñez Cabrera.

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

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.

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

BQ. Javier Tognarelli Santiago.

Profesional Subdepartamento de Genética Molecular.
Subdepartamento de Genética Molecular.
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.

Jefe de Laboratorio de Biología Molecular.
Servicio de 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 (Pre-PCR) hacia la más sucia (Post-PCR). 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. Se excluyen de estas recomendaciones aquellos formatos de PCR automatizados que realizan el proceso completo desde extracción a detección.

INTRODUCCIÓN

La **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** fue descrita en el año 1986 por Kary

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 identificar 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, mini-centrífugas, 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 el control de la contaminación y obtención de resultados confiables.

Muchas veces, algunos de los recursos necesarios para el óptimo desarrollo de las actividades 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

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

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, tampón (*buffer*), Mg²⁺, dNTPs, partidores, sondas (para PCR de tiempo real) y enzima polimerasa termoestable (Taq polimerasa, *Pfu*).

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. También conocido como PCR convencional,

donde la acumulación de amplicones generados se visualiza al final de un número predeterminado de ciclos, generalmente mediante electroforesis.

PCR de tiempo real: Permite detectar la cinética de la acumulación de amplicones durante cada ciclo inmediatamente, sin necesidad de una electroforesis posterior mediante la detección y cuantificación en cada ciclo de una señal de fluorescencia emitida por una molécula reportera: sonda (TaqMan, FRET, Scorpion, Molecular Beacons, etc), Primers (Amplifluor, D-Lux) ó intercaladores de ácidos nucleicos (SYBR-Green, Yoduro de propidio, etc).

Templado: Ácido nucleico (ADN o ARN) utilizado como molde para la PCR, es decir, a partir de esta 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, ya que este último debe detectar fluorescencia y en diferentes canales de absorción.

Fluoróforo: Molécula o parte de ella que emite fluorescencia luego de ser excitada con luz.

DESARROLLO

I.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

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

- 1.- Denaturación inicial.
- 2.- Amplificación, en 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°C-96°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 (y la sonda si es PCR de tiempo real) a una temperatura que oscila entre 45°C-65°C (que depende del contenido y proporción de nucleótidos de los partidores). 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. En el caso de la PCR de tiempo real realizada con sondas TaqMan (las más comunes), esta etapa generalmente se realiza a 60°C e incluye la hibridación y elongación junto con la lectura de la fluorescencia.
- iii. Elongación a 68°C-72°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 como 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.

II.- FLUORÓFOROS PARA PCR DE TIEMPO REAL

- 1.- SYBR Green: fluoróforo que es capaz de unirse a cualquier molécula de ADN de doble hebra (amplicón específico, amplicón inespecífico y dímeros de partidores). Por lo tanto, es una técnica menos específica y no se recomienda su uso en diagnóstico clínico, ya que puede producir falsos positivos.
- 2.- Sondas TaqMan: oligonucleótido que contiene un fluoróforo en su extremo 5' y un apagador (*quencher*) en su extremo 3'. Durante la PCR, la sonda se une al templado y luego es hidrolizada por la enzima Taq polimerasa durante la

síntesis o extensión de la cadena. Esto provoca la liberación del fluoróforo y su separación del apagador, produciéndose fluorescencia.

- 3.- Sondas Molecular Beacons: oligonucleótido que contiene un fluoróforo en su extremo 5' y un apagador (*quencher*) en su extremo 3'. Los extremos de esta molécula son complementarios entre sí, encontrándose en forma de horquilla y el fluoróforo apagado. Al unirse la sonda al templado, fluoróforo y apagador se alejan, produciéndose la fluorescencia.

Para diagnóstico clínico, se recomienda la utilización de sondas (puntos 2 y 3) dadas su alta especificidad.

III.- CONTAMINACIÓN DE LA PCR

La contaminación de las reacciones de PCR es un problema inherente para los laboratorios que realizan este procedimiento. Sin embargo, hay una serie de medidas para controlar o minimizar esta contaminación, y el grado de rigor que se requiere en un laboratorio a menudo se determina según el formato de PCR y de extracción que se utilice.

Antes de planificar el diseño del laboratorio es primordial conocer las fuentes y las vías comunes de contaminación:

- 1.- Fuentes de contaminación:
Corresponden a templados y amplicones. 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 en el caso de la PCR de punto final, de los amplicones manipulados en el área de Post-PCR. Ellas pueden ser muy problemáticas debido a su gran estabilidad, contaminando equipos, superficies, micropipetas, microtubos, soluciones, guantes, delantales, gradillas, coolers y lápices marcadores.
- 2.- Vías de contaminación:
 - Generación de Aerosoles
La formación de estas microgotas con ácidos nucleicos puede originarse por la

apertura de tubos que contengan: partidores, sondas (PCR en tiempo real), templados y/o amplicones. Los aerosoles son de fácil dispersión y pueden contaminar los materiales (guantes, gradillas, tubos) y las superficies de trabajo.

- 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 por volcamiento de microtubos (y el consecuente derrame de la solución) o por la disposición de tapas de microtubos y puntas de micropipeta ya utilizadas sobre las superficies, 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 en el caso de la PCR de punto final, de los amplicones manipulados en el área de Post-PCR.

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 sin polvo, soluciones descontaminantes y material de laboratorio en cada área. En caso de diseñar una nueva infraestructura, es recomendable considerar los flujos de aire con presiones positiva en el área limpia y negativa en el área sucia, así como el uso de cabinas de PCR que posean luz ultravioleta.

IV.- Recomendaciones para disminuir la contaminación:

1.- Generales

- 1.1 Limpiar las áreas de trabajo antes y después de su uso con Etanol 70%
- 1.2 Utilizar guantes (sin talco) durante todos los procedimientos
- 1.3 No tocar reactivos, tubos y/o equipos con las manos descubiertas (sin guantes)
- 1.4 No almacenar en un mismo refrigerador/congelador, reactivos libres de templado junto con ácidos nucleicos purificados y/o con muestras biológicas. Los refrigeradores/congeladores deben encontrarse en el área designada (sucia o limpia) para evitar el traslado de muestras o reactivos de un lugar a otro dentro del laboratorio.
- 1.5 Eliminar cualquier reactivo donde se detecte o sospeche contaminación: partidador, sonda, agua, enzima, etc. 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.
- 1.6 Centrifugar brevemente (*spin*) los tubos que contengan ácidos nucleicos y luego abrirlos cuidadosamente (sin tocar la zona interna de tapas y tubos) para evitar contaminar los guantes y las superficies.
- 1.7 Descontaminar la superficie utilizada para preparar las reacciones de PCR y los materiales (gradillas, micropipetas, lápices, contenedores de desechos, coolers, guantes) con soluciones descontaminantes como DNAZap® (Invitrogen), RNase Away™ (Ambion), DNA Away® (VWR), DNA Remover® (Minerva Biolabs), entre otras, con radiación ultravioleta 15 a 30 min (degrada ácidos nucleicos) y/o Etanol al 70% (alto poder germicida) antes y después de la preparación. 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%.

- 1.8 Mantener siempre un flujo de trabajo unidireccional.
- 1.9 Las puntas para micropipetas utilizadas en todas las áreas deben tener filtro para evitar la contaminación de las mismas por formación de aerosoles.

2.- Específicas

2.1.-Controles del proceso

Incorporar uno o más de los siguientes controles, para tener un mejor control y detección oportuna de las contaminaciones. Cada uno de los controles mencionados debe trabajarse en un tubo separado y ser sometido a PCR.

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. Luego de la PCR y electroforesis debe arrojar un resultado negativo.

b.- Control de reactivos:

Preparar la mezcla de reactivos en el área limpia y mantener el tubo cerrado durante el resto del proceso. Permite chequear los reactivos que se están utilizando para la preparación de las mezclas de PCR. Luego de la PCR y electroforesis debe arrojar un resultado negativo.

c.- Control de manipulación:

Agregar agua en uno o más microtubos en lugar de templado durante el proceso de carga en la preparación de la PCR. Permite chequear la manipulación, por parte del operador, de las muestras con templados. Luego de la PCR y electroforesis debe arrojar un resultado negativo.

d.- Control de réplica:

Para todo laboratorio que trabaje con PCR de tiempo real, además de utilizar los

controles antes mencionados, se sugiere trabajar cada muestra utilizando réplicas para descartar posibles falsos positivos, dada la alta sensibilidad de la técnica.

2.2- Degradación de contaminantes

Para la PCR de punto final, 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 de amplificaciones anteriores 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.

V.- INHIBICIÓN DE LA PCR

Existen diversas causas por las que se puede inhibir una reacción de PCR provocando resultados falsos negativos:

1.- Sustancias inhibidoras de la PCR

- 1.1 Sustancias de origen biológico presentes en la matriz de la muestra. Se han descrito muchas sustancias inhibidoras de la reacción de PCR dependiendo del material del cual proviene la muestra a testear como sales biliares y polisacáridos complejos de las heces; colágeno de tejidos animales; grupo *hem*, hemoglobina, lactoferrina e inmunoglobulina G de sangre; melanina y eumelanina de pelo y piel; mioglobina del tejido muscular; iones calcio de la leche y huesos; urea de la orina, entre otros, que pueden disminuir en distintas medidas la eficiencia de la PCR. Otras sustancias como la heparina también inhiben una PCR.
- 1.2 Sustancias químicas de uso común en los laboratorios. Fenol, SDS, el polvo de los guantes, fijadores a base de mercurio, detergentes como Tritón X-100, ditiotreitól, EDTA, filtros de nitrocelulosa, formaldehído, dicromato de

potasio, entre otros, se han descrito como inhibidores de la PCR.

Para evitar que esto ocurra es crucial utilizar un buen método de extracción de ácidos nucleicos, específico para cada tipo de muestra, que asegure la eliminación de tales compuestos.

2.- Degradación de ácidos nucleicos

La principal causa de degradación de los ácidos nucleicos es la presencia de nucleasas (ADNasas y ARNasas) provenientes de tejidos/organismos contaminantes, así como esporas de bacterias y hongos, fluidos corporales y las células muertas de las propias manos del operador de la técnica, que pueden contaminar micropipetas, gradillas, coolers, superficies y reactivos, destruyendo los partidores y/o las sondas de la reacción de PCR y el templado de la muestra, ocasionando como resultado falsos negativos. Otra causa de degradación es la mala conservación de las muestras: (a) a mayor temperatura ambiente hay mayor degradación y (b) a mayor número de congelaciones y descongelaciones sucesivas hay mayor degradación.

Para evitar estas degradaciones se recomienda:

- a.- Usar guantes en todo momento, los cuales deben ser libres de polvo (el polvo de los guantes inhibe también la PCR). Cambiarse de guantes de área en área, y/o ante cualquier sospecha de contaminación.
- b.- Limpiar con soluciones descontaminantes las superficies, guantes, gradillas, micropipetas, coolers, vórtex, etc. antes y después de usar el área. Hay soluciones que sólo degradan ARNasas, pero son más eficientes aquellas que degradan ARNasas, ADNasas, ADN y ARN, evitando también la posible contaminación.
- c.- Todas las soluciones a utilizar (*buffers*, enzimas, agua) deben ser certificadas libres de nucleasas.
- d.- Todos los materiales plásticos utilizados: tubos de reacción, puntas de micropipetas, tapas de tubos, placas ó tiras de tubos deben ser certificados libres de nucleasas.

- e.- Controlar las condiciones de conservación de las muestras desde su toma hasta su procesamiento.

VI.- FLUJOS Y ÁREAS DE TRABAJO

Durante el desarrollo de una PCR se reconocen diferentes áreas, limpias o sucias, según su potencial de contaminación, las que deben ser consideradas en el diseño del laboratorio y en el flujo de trabajo, para la obtención de resultados de PCR confiables.

Cada vez que un operador ingrese a un área de trabajo diferente debe ponerse guantes nuevos y delantal exclusivo, y utilizar sólo los equipos y materiales disponibles en esa área. Los delantales, guantes, gradillas, lápices, contenedores de desechos, papel absorbente, micropipetas, soluciones descontaminantes y etanol 70% presentes en cada área son exclusivos y no son intercambiables, es decir, los insumos utilizados para trabajar en un área sucia deben ser distintos a los utilizados en un área limpia. Para esto, es necesario disponer de percheros y un set de materiales ubicados en las distintas áreas de trabajo:

- 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.

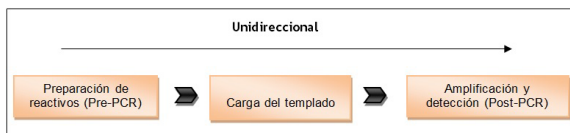
Los delantales deben ser renovados permanen-

temente (o lavados frecuentemente) 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 y, en lo posible, manguillas desechables.

1.- 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.

Para mantener el flujo unidireccional de trabajo, y evitar retroceder desde áreas sucias hacia áreas limpias, cada una de las áreas de trabajo 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.

2.- ÁREAS DE TRABAJO

2.1. 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.

2.2. Área de Preparación de Reactivos (Pre-PCR)

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°C de uso exclusivo para almacenar los reactivos utilizados para preparar reacciones de PCR, y nunca mezclarlos con 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 dife-

rente, dentro del mismo congelador, con respecto a los reactivos de uso diario (alícuotas), 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 exclusivos 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 las 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.

2.3. 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.

Al terminar este proceso, 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.

2.4. Área de Amplificación y Detección (Post-PCR)

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.

3. 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 en-

trenamiento 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.- De Lomas, JG et al. False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder. *Transfusion*. 1992; 32 (1): 83-85.
- 2.- Dieffenbach, CW and Dversler G.S. Setting up a PCR laboratory. *Genome Res*. 1993; 3 (2): S2-S7.
- 3.- Espy, MJ. et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19 (1): 165-256.
- 4.- Kwok, S. Procedures to minimize PCR-product carry-over. Academic Press Inc. Ltd. 1990; 142-145.
- 5.- Lo, Y.M. et al. False-positive results and the polymerase chain reaction. *The Lancet*. 1988; 2 (8612): 679.
- 6.- Mifflin, Th. E. Control of contamination associated with PCR and other amplification reactions. Molecular Bioproducts, Inc. 1997: 1-20.
- 7.- Mifflin, Th.E. Setting up a PCR Laboratory. *Cold Spring Harb Protoc*. 2007; 2 (1): 5-10.
- 8.- Moia, E. and Wheeler, F. The design criteria of a pharmaceutical clean room. *Ingeniería Química*. 2000; 32: 65-82.
- 9.- 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.
- 10.- Mullis, K. and Faloona, FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987; 155: 335-350.
- 11.- Newton, C.R. Setting up a PCR laboratory. *PCR: Essential data*. 1995: 216.
- 12.- Schrader C. et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012; 113 (5): 1014-1026.
- 13.- Scherczinger C.A. et al. A systematic analysis of PCR contamination. *J Forensic Sci*. 1999; 44 (5): 1042-1045.
- 14.- Standards Unit, Microbiology Services Division. Good laboratory practice when performing molecular amplification assays. *Quality Guidance*. 2010; 1 (4): 1-13.
- 15.- Viana, R and Wallis, C. Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories. *InTech*. 2011: 29-52.
- 16.- Wilson I. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63 (10): 3741-3751.
- 17.- MM3-P2. Molecular diagnostic methods for infectious diseases: proposed guideline, second edition: Laboratory Design and practices. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA. 2006.
- 18.- MM05-A2. Nucleic Acid Amplification assays for molecular hematopathology; approved guideline second edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA. 2012.