



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Le contaminazioni nel laboratorio di PCR

1 DEFINIZIONE

2 CAUSE

3 PREVENZIONE/CONTROLLO

4 GESTIONE

La conoscenza in 30 minuti, III appuntamento, 19 giugno 2018



- I metodi di PCR sono (generalmente) caratterizzati da un basso “LOD” ed una elevata “sensibilità analitica”, cioè: poche molecole di DNA bersaglio (anche solo alcune decine di copie) possono essere portate al di sopra della soglia di rilevabilità' → **POSITIVITA' DEL CAMPIONE**
- Questa caratteristica diventa un limite se le molecole di DNA bersaglio non appartengono al campione in esame ma provengono da qualcosa che non siamo stati in grado di controllare... **UNA CONTAMINAZIONE!**
- In sintesi: l'introduzione accidentale di DNA nell'esecuzione di un metodo di PCR può determinare una **FALSA POSITIVITA' DEL CAMPIONE** → la sessione di lavoro o, peggio, l'intera attività diagnostica, sono compromessi!



DEFINIZIONE E NATURA DELLA CONTAMINAZIONE

- ✓ La contaminazione (nei metodi di PCR) è definita come un'introduzione accidentale di DNA esogeno nel campione;
- **CROSS CONTAMINAZIONE** : trasferimento di "DNA" dal campione positivo al campione negativo **nell'ambito della stessa sessione di lavoro**; le conseguenze (FALSE POSITIVITA') sono limitate alla sessione di lavoro interessata dall'evento
- **CONTAMINAZIONE AMBIENTALE** : trasferimento di DNA dall'"ambiente" ai campioni e dovuta alla presenza di ampliconi ottenuti in **precedenti sessioni di lavoro** (contaminazione da trasporto o da *carry over*) oppure, da attività legate alla produzione e manipolazione di controlli positivi "concentrati" (in particolare di vettori plasmidici); le conseguenze (FALSE POSITIVITA') si riflettono su diverse sessioni di lavoro e, nei casi più gravi, causano la totale compromissione dell'attività diagnostica interessata dall'evento





IMPATTO DELLA DELLA CONTAMINAZIONE

- GRAVE NELLA DIAGNOSTICA DEGLI AGENTI INFETTIVI (presenza/assenza patogeno)
- PUO' ESSERE MENO GRAVE NELLE CARATTERIZZAZIONI GENETICHE (nel caso in cui la concentrazione del DNA contaminante sia trascurabile rispetto al DNA genomico del campione in esame)*
- ✓ la prevenzione delle contaminazioni è IN OGNI CASO essenziale per garantire l'affidabilità dei risultati e l'operatività, **LE CONTAMINAZIONI (DA DNA) SONO GENERALMENTE CONSIDERATE PERMANENTI!** anche perché

*Si consulti, ad esempio:

"A Systematic Analysis of PCR Contamination" Carol A. Scherzinger et al. J Forensic Sci. 1999 Sep;44(5):1042-5



IL PRINCIPALE INDIZIATO NEI CASI DI CONTAMINAZIONE

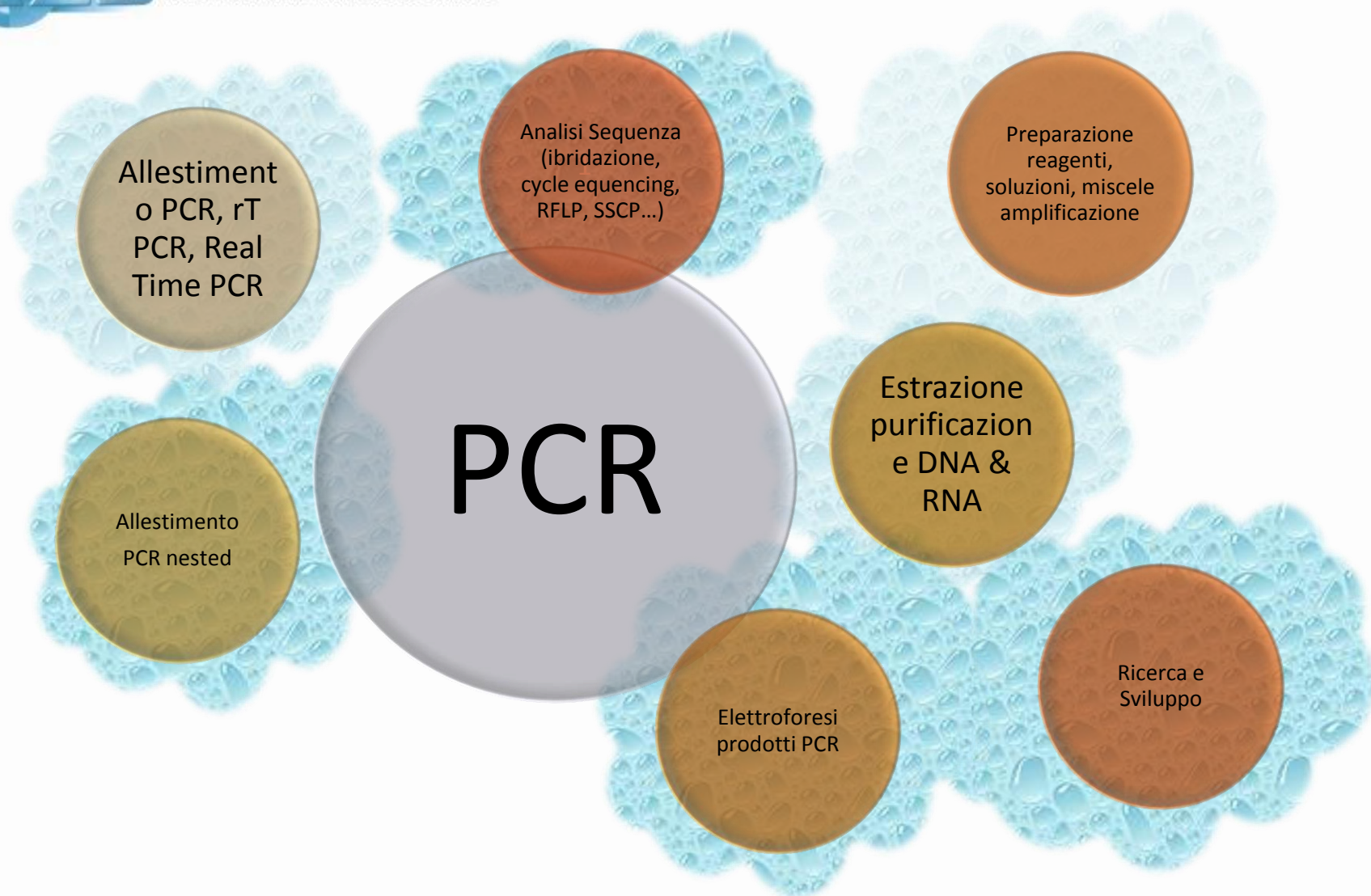


L'AREOSOL, GENERATO IN TUTTE LE ATTIVITA' COLLEGATE ALL'ESECUZIONE DEI METODI DI PCR

- NELLA PREPARAZIONE DEI REAGENTI
- NELLA LAVORAZIONE DEI CAMPIONI
- NELL'ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI DI PCR
- NELLA MANIPOLAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR
- NELLA COMUNICAZIONE ORALE CON IL COLLEGA....
-

PS: L'ENTITA'/GRAVITA' DELLA CONTAMINAZIONE DIPENDE ANCHE DALLA SENSIBILITÀ DEL SISTEMA IMPIEGATO PER RILEVARE LA PRESENZA DELL'AMPLICONE (DOT BLot, PCR REAL TIME, GEL AGAROSIO)





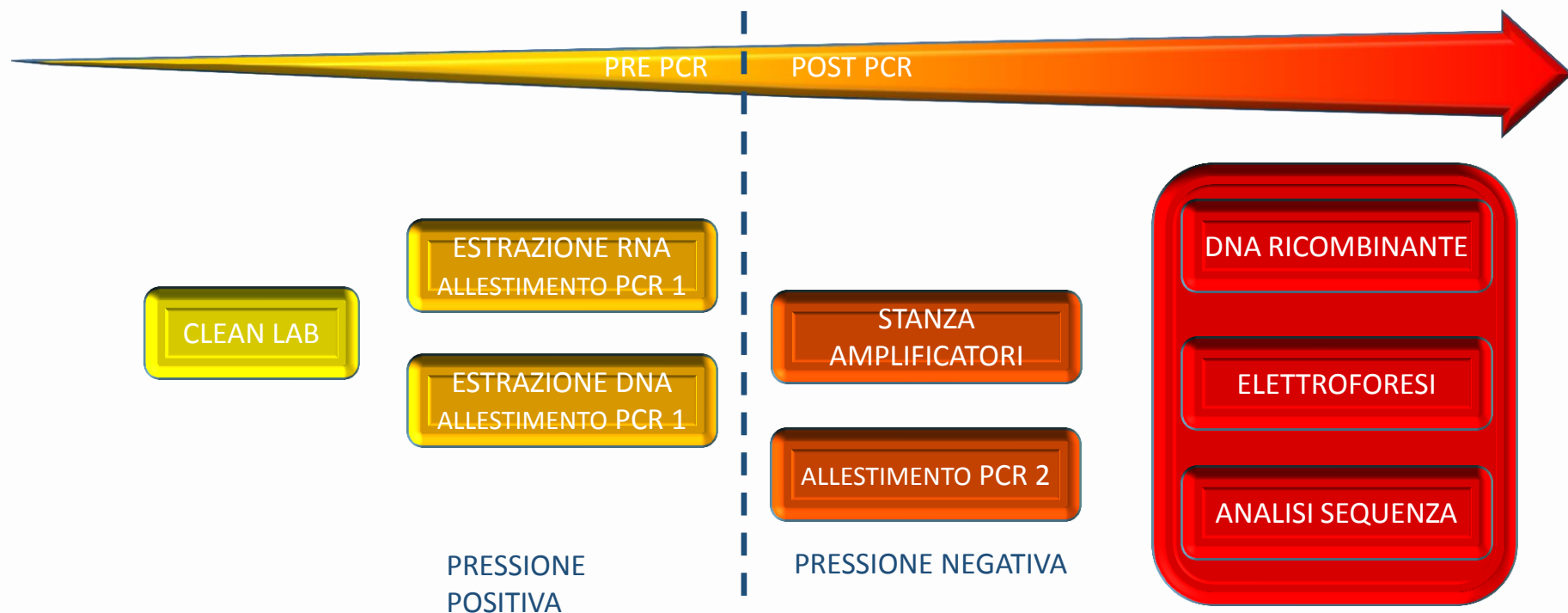
PREVENIRE/LIMITARE/CURARE LE CONTAMINAZIONI: COME/DOVE/QUANDO INTERVENIRE?

- ✓ Suddividendo opportunamente le aree di lavoro (prevenzione)
- ✓ Equipaggiando opportunamente le aree di lavoro (prevenzione)
- ✓ Programmando opportunamente le attività (prevenzione)
- ✓ Applicando le buone pratiche di laboratorio (prevenzione)
- ✓ Impiegando sistemi fisici, chimici e biochimici per la decontaminazione (cura)
- ✓ Eseguendo controlli periodici mediante sessioni di lavoro con soli campioni «NTC» (ed un controllo positivo) (verifica)
- ✓ Controllando il tasso di positività (verifica)
- ✓



AREE PRE E POST PCR + FLUSSO ATTIVITA' DA BASSO AD ALTO LIVELLO CONTAMINAZIONE

ORGANIZZARE IL LABORATORIO IN UNA SERIE DI SPAZI CHE CONSENTANO DI SEPARARE FISICAMENTE E TEMPORALMENTE LE ATTIVITA', SECONDO UN LOGICA CHE SEGUA UN «LIVELLO DI CONTAMINAZIONE» CRESCENTE





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

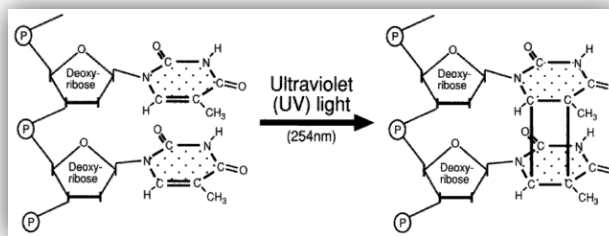
EQUIPAGGIAMENTO DEDICATO

- ✓ Dispositivi Protezione Individuale
- ✓ Pipette monocanale e puntali
- ✓ Vortex
- ✓ Centrifughe
- ✓ Pipettatrici
- ✓ Grossa strumentazione (cappe a flusso laminare, frigorifero, congelatore..)
- ✓ Spettrofotometro
- ✓ Personal Computer
- ✓ Bagni termostatici
- ✓




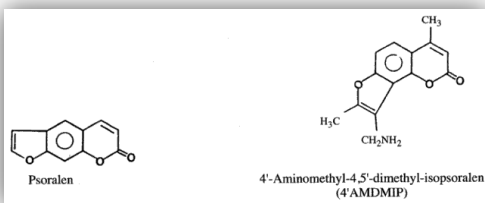
ALTRE BARRIERE E MEZZI FISICI

- ✓ Usare puntali con barriera areosol oppure a «*positive displacement*»
- ✓ Condurre le manipolazioni sotto cappa a flusso laminare
- ✓ Impiegare *rack* ed *opener* sviluppati per i protocolli di PCR
- ✓ Irraggiare con UV l'area di prova e la cappa a flusso laminare



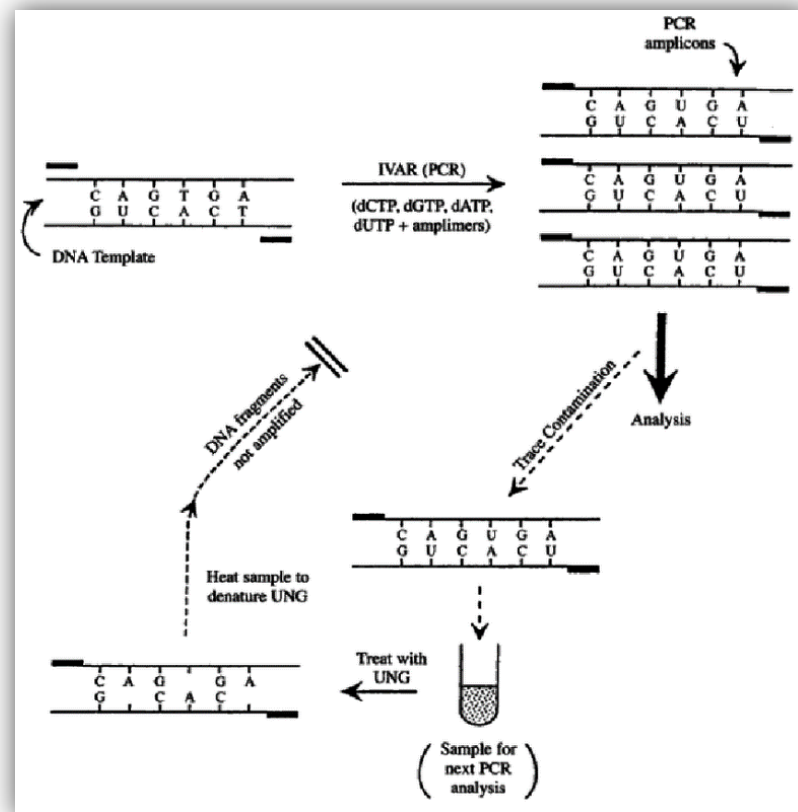
MEZZI CHIMICI

- ✓ Soluzioni a base di Ipoclorito di Sodio 10% (rispetto alla concentrazione dello *stock*) oppure soluzioni commerciali, da impiegare al termine di ciascuna sessione di lavoro per decontaminare i piani di lavoro (in particolare, della cappa a flusso laminare, sopra e sotto i ripiani!) e strumenti
- ✓  Non usare soluzioni a base di etanolo: PRECIPITA (FISSA) il DNA!
- ✓ PSORALEN/ISOPSORALEN



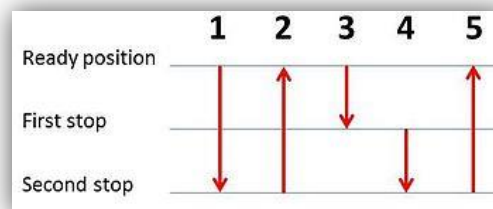
MEZZI BIOCHIMICI

- ✓ Preferire impiego di *Universal Master Mix* che prevedono la presenza di dUTP e dell'Uracil-N-Glicosilasi (UNG): utile per il controllo delle CONTAMINAZIONI DA TRASPORTO (*Carry Over*)
- ✓ Privilegiare l'impiego di protocolli di PCR *Real Time* rispetto agli *End Point*
- ✓ Evitare l'impiego di protocolli di PCR *nested*



BUONE PRATICHE DI LABORATORIO (E BUON SENSO)

- ✓ Individuare personale dedicato alle attività di PCR, limitando a questo l'accesso alle aree di prova
- ✓ Usare tappetini adesivi all'ingresso delle aree di prova
- ✓ Prevedere Dispositivi di Protezione Individuale separati per ciascuna area di prova
- ✓ Aliquotare i reagenti in piccoli volumi, idealmente monouso
- ✓ Centrifugare le provette prima di aprirle
- ✓ Richiudere le provette dopo ogni dispensazione
- ✓ Dispensare il DNA per ultimo
- ✓ Usare controlli positivi poco concentrati
- ✓ Cambiare frequentemente guanti
- ✓ Usare la tecnica del «*reverse pipetting*» →
- ✓



ED IN PRESENZA DI UNA CONTAMINAZIONE?

-le cross-contaminazioni, per definizione, si esauriscono con la sessione di prova...non occorre fare nulla, salvo ripetere la prova..
- Le contaminazioni ambientali, **in particolare quelle da DNA**, sono invece più ostiche. Più che ricercarne la causa (a volte incomprensibile), si risparmia tempo e denaro procedendo con un'approfondita decontaminazione di tutti i materiali e di tutte le superfici delle aree di prova (maniglie delle porte comprese) e, quindi, sostituendo tutto il set di reagenti, soluzioni, materiali (puntali etc etc..) etc.....ma....





BIBLIOGRAFIA

- ✓ Kwok and Higuchi «Avoiding false positives with PCR»
Nature; 1989 May 18;339(6221):237-8
- ✓ Mifflin «Setting up a PCR Laboratory»
Chapter 1, 2nd edition (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2003
- ✓ Lo and Chan «Setting up a polymerase chain reaction laboratory»
Methods Mol Biol; 2006;336:11-8.
- ✓ Brunstein “Strategies for avoiding amplicon contamination in the molecular laboratory” The Primer, January 25, 2018
- ✓ IZSLT PG VIR 003 «Gestione delle aree e delle attività per l’esecuzione dei protocolli di PCR»

