

## 2.2 MOLEKULARPATHOLOGIE

G. Höfler, K. Zatloukal, F. Fend

### 3 TEILBEREICHE

- A) Erfordernisse molekularpathologischer Einrichtungen
- B) Räumliche Erfordernisse und Geräte
- C) Qualitätssicherung

#### A) Erfordernisse molekularpathologischer Einrichtungen

Die Erfordernisse decken sich im Wesentlichen mit den Anforderungen für das Zusatzfach Humangenetik für Pathologen oder vergleichbaren Ausbildungen. Es ist auch akzeptabel, Untersuchungen nur in Teilgebieten durchzuführen. In diesem Fall sind nur Erfahrungen in diesen Teilgebieten notwendig, eine enge Kooperation mit einer zentralen Untersuchungsstelle ist dann jedoch anzustreben.

**Folgende Erfahrungen und/oder Kenntnisse (mindestens 2 Jahre) sind erforderlich:**

#### ALLGEMEINE MOLEKULARPATHOLOGISCHE TECHNIKEN

- Erfahrungen mit Isolierung von totaler, „messenger“ RNA (mRNA) und genomischer DNA aus Zellen, Geweben (fixiert, unfixiert), Körperflüssigkeiten; reverse Transkription; Klonierung von DNA-Fragmenten; Transformation von Plasmiden; Präparation von Plasmid-DNA; Analyse von Nukleinsäuren mittels Agarose- und Polyacrylamid-gelelektrophorese, Southern-Blot, Northern-Blot, Polymerasekettenreaktion (PCR), RT-PCR, Sequenzierung von DNA, DGGE; SSCP; „Protein truncation test“.
- Erfahrungen mit der Auswahl von repräsentativen und für molekulargenetische Untersuchungen geeigneten Gewebeproben an Hand des makroskopischen und histologischen Bildes; Mikrodissektion.
- Erfahrung mit Zellkulturen (z.B. Fibroblasten und Amnionzellen).

#### SPEZIELLE ANALYSEN

- Nachweis von Genrearrangements bei neoplastischen hämatologischen Systemerkrankungen und soliden Tumoren (z.B. BCR-ABL Rearrangement, Immunglobulin-Schwerkettengen-Rearrangement, T-Zell-Rezeptor-Gen Rearrangement, Bcl-2/Immunglobulinen-Rearrangement).
- Amplifikationsnachweis und Mutationsanalysen von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA Reparaturgenen (z.B. *N-myc*, *ras*, *p53*, *APC*, *BRCA-1*, *BRCA-2*, *hMSH-2*, *hMLH-1*, *c-RET*).

- Nachweis des Knochenmarks-Chimärismus nach Knochenmarktransplantation (VNTR).
- Analyse von Mikrosatelliten und anderen repetitiven DNA-Elementen
- Mutationsanalyse bei Stoffwechselerkrankungen (z.B.: zystische Fibrose, GM1-Gangliosidose, Morquio B, Hämochromatose) und bei Störungen des Gerinnungssystems (z.B.: Faktor V „Leiden“-Mutation).
- Erregernachweis (z.B. Herpes simplex Virus [Typ 1 u.2], Epstein Barr Virus, HPV, Cytomegalie Virus, Parvovirus B19, Mycobacterium tuberculosis, Toxoplasma gondii, Tropheryma henselae).
- Nachweis von chromosomalen Veränderungen: Chromosomenpräparation, Färbetechniken (Banding, high resolution banding) Karyotypanalyse, Chromosomenanomalien (numerisch, strukturell), Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).

### AUSWERTUNG DER UNTERSUCHUNGEN

- Kenntnisse der molekularen Pathogenese von Erkrankungen, Kenntnisse über Vererbungsmechanismen und statistische Methoden in der Genetik, Kenntnisse über Behandlungsmöglichkeiten von genetisch bedingten Erkrankungen.
- Erfahrungen mit humangenetischen Beratungen im Sinne §69 GTG, Erfahrungen bezüglich Qualitätskontrolle, Sicherheitsmaßnahmen, Datenschutz, Kenntnisse der gesetzlichen und ethischen Grundlagen.
- Erfahrungen mit Indikationsstellung, Interpretation der Ergebnisse und Erstellung von Befunden.

## B) Räumliche Erfordernisse und Geräte

Institute, die molekularbiologische Diagnostik durchführen, sollten mindestens über folgende räumliche Ausstattung verfügen. Die Angaben stellen ein Basispaket dar, das bei höherem Bedarf entsprechend zu vergrößern ist.

### RÄUMLICHE AUSSTATTUNG

1. Raum für Probenaufbereitung, Ausstattung entsprechend Sicherheitsstufe II nach dem Gentechnikgesetz.
2. Raum für Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mindestens 6 m<sup>2</sup>, Ausstattung entsprechend Sicherheitsstufe II nach dem Gentechnikgesetz.
3. Raum für Probenanalyse, Ausstattung entsprechend Sicherheitsstufe II nach dem Gentechnikgesetz.

**Anmerkung:** Die Ausstattung der Labors entsprechend Sicherheitsstufe II nach dem Gentechnikgesetz wird empfohlen, um entsprechende Flexibilität zu

gewährleisten. Die meisten gentechnischen Arbeiten werden in der Sicherheitsstufe I liegen, könnten jedoch auch fallweise der Sicherheitsstufe II zugeordnet werden. Die Ausstattung nach Sicherheitsstufe II bedarf gegenüber der Sicherheitsstufe I keiner besonderen zusätzlichen Aufwendungen, da es sich hier im Grunde um einen normalen Laborstandard handelt. Nach dem Gentechnikgesetz sind für Labors der Sicherheitsstufe II folgende Maßnahmen vorgesehen: Abwaschbare Boden- und Wandoberflächen, Waschbecken mit Händedesinfektion, Kleiderablage für Labormäntel beim Eingang. Unabhängig von den Erfordernissen für die Sicherheitsstufe II wäre in dem Labor für die Probenaufbereitung ein Chemikalienabzug notwendig.

**Zusätzlich wäre empfehlenswert, folgende Einrichtungen zur gemeinsamen Benützung zur Verfügung zu haben:** Ein Labor für Arbeiten mit radioaktivem Material (Arbeitsplatz der Type C nach Strahlenschutzverordnung) und ein Zellkulturlabor (Sicherheitsstufe II).

**Gerätmäßige Ausstattung der Laboreinheiten:**

Basislaboreinrichtung wie Waagen, pH-Meter, Rührer, Kühlschränke, Zentrifugen, Bunsenbrenner, Wasserbäder und Brutschrank. Spezifische Laboreinrichtungen wie UV-Spektrophotometer, Vakuumkonzentrator, Agarosegelelektrophorese-Einrichtung (Gelkammer und Stromgeber), UV-Lampe mit Photoeinrichtung, Thermocycler für PCR, Schüttelinkubator, -70°C Kühltruhe.

Ein Autoklav muss in jedem Gebäude, in dem gentechnisches Arbeiten in der Sicherheitsstufe II durchgeführt werden, vorhanden sein.

**Als erweiterte Ausstattung wäre anzusehen:** Hybridisierungsöfen (für Northern und Southern Blot), S2 Lamina-Airflow Werkbank, Polyacrylamidgel-Elektrophoreseeinrichtung und Stromgeber (für Analyse kurzer PCR-Produkte, DNA-Sequenzierung und Mutationsanalysen mittels DDGE und SSCP). Bei entsprechender Anzahl an Untersuchungen ist eine automatische Sequenzierereinrichtung sinnvoll.

### C) Qualitätssicherung

Obligat ist die Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen. Bei der Erregerdiagnostik ist die Durchführung von Mehrfachbestimmungen nötig. Bei Diskrepanz zwischen molekularpathologischen und anderen Untersuchungsergebnissen ist die Analyse zu wiederholen. Die DNA-Sequenzanalyse muss in beide Richtungen erfolgen. DNA-Mutationen müssen durch Wiederholung der Sequenzierung bestätigt werden. Bei der Sequenzierung von subklonierten PCR Produkten müssen je nach Homogenität der untersuchten Probe mehrere Klone analysiert werden.

Die Teilnahme an Ringversuchen ist als objektivstes Mittel der externen Qualitätssicherung erforderlich. Derzeit werden von der Österreichischen Gesellschaft für Pathologie in Zusammenarbeit mit der Deutschen und Schweizer Gesellschaft für Pathologie Ringversuche zur Bestimmung des T-Zell-Rezeptor-

Gammakettengens sowie zum Nachweis von Mykobakterium Tuberkulosis-DNA durchgeführt.

Beim nächsten Ringversuch wird auch die Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität inkludiert werden. Bezüglich der Mutationsanalyse (z.B. Faktor V Leiden, HLA-H-Gen-Mutationsanalyse etc.) wird auch auf entsprechende Ringversuche der ÖQUASTA bzw. der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie verwiesen.